

Методы биохимии растительных продуктов. Петров К. П. Киев, издательское объединение «Вища школа», 1978, 224 с.

В учебном пособии описаны основные биохимические методы исследования органических азотистых веществ, белков, ферментов, витаминов, углеводов, жиров и жироподобных веществ, спиртов, альдегидов, органических кислот и дубильных веществ. Рассмотрен весовой метод определения углекислоты при дыхании зерна и комплексный метод определения водорастворимых, легкоокисляющихся сульфгидрильных соединений и восстановленного глутатиона. Особое внимание уделено исследованию процесса гликолиза (брожения) с применением оригинальной автоматически записывающей аппаратуры.

Предназначено для студентов технологических институтов пищевой промышленности. Им могут пользоваться и студенты сельскохозяйственных вузов.

Табл. 9. Ил. 52. Список лит.: 11 назв.

Редакция литературы по химии, химической технологии, горному делу и металлургии
Зав. редакцией Т. С. Антоненко

Константин Петроич Петров

МЕТОДЫ БИОХИМИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ

Редактор Г. М. Законь,
Литредактор Н. Г. Кириллова,
Обложка художника О. И. Родаченко,
Художественный редактор Е. Н. Прокофьев,
Технический редактор Т. И. Трофимова,
Корректор Р. П. Киевская

Информ. бланк № 1703

Сдано в набор 21.01.1977 г. Подписано в печать 5.08.1977 г. БФ 07522. Формат 60x90^{1/16}. Бумага типографская № 2. Литер. гарнитура. Высокая печать. 14 печ. л. 16,72 уч.-изд. л. Тираж 1000 экз. Изд. № 3248. Зак. № 7-526. Цена 75 коп.

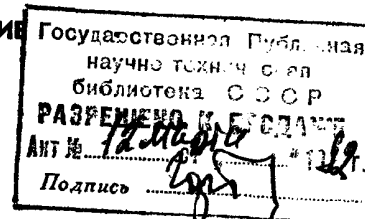
Главное издательство издательского объединения «Вища школа», 252054, Киев, 54, Гоголевская, 7.

Книжная фабрика «Коммунист» РПО «Полиграфкнига» Госкомиздата УССР, 310012, Харьков-12, ул. Энгельса, 11.

20504—25
ПМ211(04)—78 32—78

© Издательское объединение «Вища школа», 1978.

ПРЕДИСЛОВИЕ



В настоящем учебном пособии рассматриваются новые методы исследования, которые применяются в учебной и научной работе. Все опыты легко выполнимы в условиях студенческого практикума.

В начале каждого раздела дается краткая теоретическая предпосылка с целью введения в курс изучаемого предмета и обоснования излагаемых методов исследования. При изложении методов приводятся принципы, которые положены в их основу и уравнения химических определений.

В книге подробно описаны приборы и аппараты, специфические для биохимического анализа. Аппаратура для физико-химических исследований, имеющая общее назначение и применяемая в биохимической практике, описана кратко со ссылкой на литературные источники, в которых есть более подробное ее описание. Хроматография и электрофорез превратились в самостоятельные области биохимического анализа, а поэтому они в настоящей книге изложены только в связи с отдельными биохимическими определениями.

Работа над курсом общей биохимии и сопровождающим его практикумом, предусматривает знание студентами общей, аналитической, органической, физической и коллоидной химии. Данный курс знакомит студентов с составом и свойствами растительных пищевых продуктов, и биохимическими процессами, протекающими в них при обработке и хранении.

Работая над настоящей книгой, автор стремился при изложении в ней новых методов по возможности не увеличивать объем книги. Во избежание увеличения объема книги были опущены такие широко известные и редко используемые специальные методы как определение азота аминокислот по Ван-Слайку, исследование дыхания манометрическим способом (по Баркрофту и Варбург), а также некоторые другие методы, описанные в первом издании (см. Петров К. П. Практикум по биохимии пищевого растительного сырья. М., «Пищевая промышленность», 1965).

Методический материал, излагаемый в настоящей книге, может быть использован не только в студенческом практикуме, но и в научно-исследовательских студенческих кружках, а также специалистами пищевой промышленности и сельского хозяйства. Кроме того методы могут быть использованы аспирантами и работниками научно-исследовательских лабораторий.

В списке литературы автор не стремился приводить полную исчерпывающую рекомендацию. Отдельные литературные источники

приводятся в тексте в связи с методами биохимических исследований.

Автор стремился сделать изложение материала наиболее доступным для студентов и специалистов, и одновременно приблизить учебный материал к производству.

Особое внимание обращено на возможность использования результатов исследования при оценке качества пищевого растительного сырья и готовых пищевых продуктов.

Автор заранее выражает благодарность за критические замечания и советы, которые просит присылать по адресу: 252054, Киев-54, Гоголевская, 7, Головное издательство издательского объединения «Вища школа».

Автор

ОРГАНИЧЕСКИЕ АЗОТИСТЫЕ ВЕЩЕСТВА РАСТЕНИЙ

АЗОТ ЛЕТУЧИХ ОСНОВАНИЙ

В продуктах производства, а также в растительном сырье при хранении накапливается значительное количество летучих оснований, которые снижают их качество. Поэтому определение азотистых оснований имеет практическое значение.

Источники образования летучих оснований аммиак, метиламин, диметиламин и триметиламин различны. Аммиак образуется при дезаминировании аминокислот, при очистке и выпаривании диффузионного сока в сахарном производстве, в процессе разложения амидов кислот.

При хранении растительного сырья из бетаина образуется триметиламин, который вызывает «селечочный» запах, например, у пораженного головней зерна.

Много летучих оснований образуется при жизнедеятельности микроорганизмов. Например, дрожжи используют NH_3 для построения аминокислот и белков, входящих в состав их тела.

В настоящее время существует множество методов определения свободных летучих оснований. Учитывая возможность вытеснения летучих оснований из связанного состояния, необходимо быть очень осторожным при выборе реактивов и температурных условий. Нельзя, например, пользоваться едкими щелочами, так как они способствуют отщеплению NH_3 от амидных групп. То же самое может произойти, если определение проводить при повышенной температуре.

Определение азота летучих оснований

Метод Лонги основан на отгонке летучих оснований при пониженном давлении (обычно 2,00—2,67 кН/м²) и температуре 35—40° С.

Приготовление смешанного индикатора. 0,2 г метилрога растворяют в 60 мл этилового спирта и доводят водой до 100 мл, 0,012 г метиленового синего растворяют в 12 мл дистиллированной воды.

Оба образовавшихся раствора смешивают; индикатор хранят в темной склянке.

Методика опыта. Навеску хорошо измельченного растительного материала 3—10 г (в зависимости от его влажности) помещают при помощи воронки в колбу Кляйзена (рис. 1, 1). Воронку и горлышко колбы обмывают 100 мл дистиллированной воды. После того как навеска пропитается водой, к остывшей смеси добавляют прокипяченное и охлажденное 5%-ное магниезиальное молоко (приготавливают из свежeproкаленного оксида магния) до тех пор, пока среда не станет щелочной (определяют по лакмусовой бумажке). Обычно расход

оксида магния на одно определение составляет 2—10 г. Для предотвращения вспенивания добавляют 5 мл этилового спирта или лучше 10 мл вазелинового масла. Если вспенивание все-таки происходит, добавляют по каплям еще немного спирта. Колбу Кляйзена закрывают резиновыми пробками, в которые вставлены термометр 2 и трубка с

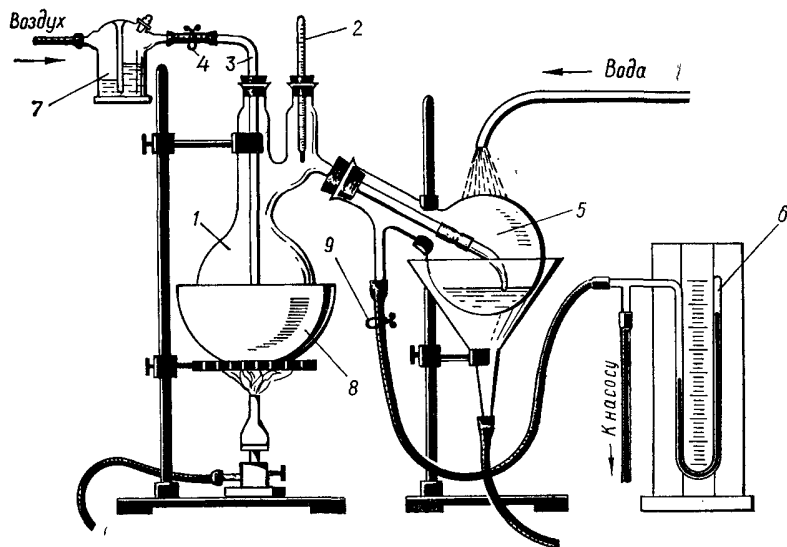


Рис. 1. Аппарат для отгонки азотистых летучих оснований под вакуумом.

капиллярным концом 3 и винтовым зажимом 4. Отводную трубку колбы Кляйзена резиновой трубкой соединяют с изогнутой, слегка оттянутой на конце трубкой, которую опускают в 0,1 н. раствор H_2SO_4 , налитый в приемную колбу Вюрца 5. Количество H_2SO_4 в приемнике обычно составляет 20—40 мл в зависимости от ожидаемого количества NH_3 .

Отводную трубку колбы Вюрца соединяют через ртутный манометр 6 с водоструйным или масляным насосом. Между манометром и насосом ставят склянку Тищенко или клапан Буизена (рис. 2). Собранный прибор предварительно испытывают на герметичность. Винтовой зажим 4 регулируют так, чтобы через оттянутую трубку, опущенную в H_2SO_4 приемной колбы, проходила слабая струя воздуха. Воздух, поступающий в капилляр, необходимо промывать H_2SO_4 в склянке Тищенко 7. Приемник 5 охлаждают струей воды из крана. Отгонную колбу Кляйзена помещают в водяную баню 8 и отгонку проводят при температуре 35—40° С. Когда в приемник

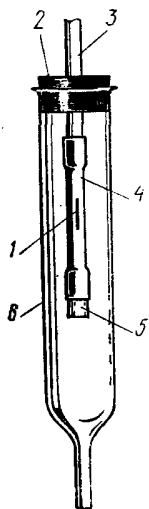


Рис. 2. Клапан Буизена:

1 — тонкий сквозной надрез, проделанный бритвой вдоль трубки; 2 — резиновая пробка; 3 — стеклянная трубка; 4 — резиновая трубка; 5 — стеклянная пробка; 6 — вытянутый в виде трубки стеклянный цилиндрок.

перейдет около 80 мл жидкости (обычно через 30—40 мин), отгонку прекращают. По окончании отгонки зажим 9 на каучуковой трубке приемной колбы закрывают. Не отставляя горелки, продолжают пропускать воздух в аппарат, вначале через капилляр, а затем слегка приоткрывая пробку с капилляром (в это время следят за манометром). При резком поступлении воздуха прибор может взорваться. После выравнивания давления вынимают пробку сначала из отгонной колбы, а затем — из приемной. Тщательно промывают дистиллированной водой отводную трубку, которая была погружена в раствор H_2SO_4 , и промывные воды присоединяют к кислоте, находящейся в приемнике. Затем туда же добавляют 3—5 капель смешанного индикатора и титруют 0,1 н. раствором $NaOH$. Индикатор иногда прибавляют и до перегонки. Титровать в колбе Вюрца неудобно, поэтому дистиллят надо количество перенести в колбу Эрленмейера емкостью 500 мл.

Количество азота летучих оснований (x) в исследуемом образце (в мг%) определяют по формуле

$$x = \frac{(a - b) K \cdot 1,4 \cdot 100}{g},$$

где a — количество 0,1 н. раствора H_2SO_4 , взятого для опыта, мл; b — количество 0,1 н. раствора H_2SO_4 , оттитрованного после опыта, мл; K — поправочный коэффициент к 0,1 н. раствору H_2SO_4 ; g — навеска исследуемого вещества, г; 1,4 — количество азота летучих оснований, связываемых 1 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 , мг.

Метод отгонки летучих оснований отличается высокой точностью, однако конструкция прибора сложна, а определение требует квалифицированного постоянного наблюдения.

Ряд исследователей предложили упрощенные модифицированные методы, описание которых приводится ниже.

Метод Конвей и Байрна. Прибор Конвей и Байрна для определения NH_3 пригоден для определения азотистых летучих оснований. Он состоит из стеклянной чашки, напоминающей чашку Петри (рис. 3), внутри которой впаило небольшое, не доходящее до верхнего уровня, стеклянное кольцо. Чашка закрывается крышкой, представляющей собой хорошо шлифованную стеклянную пластинку. Для более точной работы прибора между внутренним и наружным кольцом впаивают стеклянную перегородку. Прибор Конвей и Байрна обычно делают из стекла, иногда из парафина (чашки при этом отливают в металлических формах).

Металлика опыта. В чашку, слегка наклоняя ее в сторону перегородки, наливают 5 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 . В наружную часть чашки с одной стороны перегородки наливают 3 мл испытуемой жидкости, предварительно осадив в ней белки, с другой стороны — 2 мл насыщенного раствора карбоната калия. Затем чашку накрывают крышкой и ставят в горизонтальное положение. Слегка покачивая чашку, испытуемую жидкость смешивают со щелочным раствором карбоната калия. Чашку оставляют при комнатной температуре на ночь или ставят на 2 ч в термостат при температуре 38° С. После этого оставшуюся H_2SO_4 оттитровывают 0,1 н. раствором $NaOH$.

Количество азота летучих оснований (x) в исследуемом образце (мг на 100 мл раствора) определяют по формуле

$$x = \frac{(a - b) K \cdot 1,4 \cdot 100}{v},$$

где a — количество 0,1 н. раствора H_2SO_4 , взятого для опыта, мл; b — остаток 0,1 н. раствора H_2SO_4 , оттитрованный после опыта, мл; K — поправочный коэффициент к 0,1 н. раствору H_2SO_4 ; 1,4 — количество азота летучих оснований, связываемое 1 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 , мг; v — объем жидкости, взятой для опыта, мл.

Метод Балаховского и Брунса. За несколько лет до Конвей и Байриа Бала-

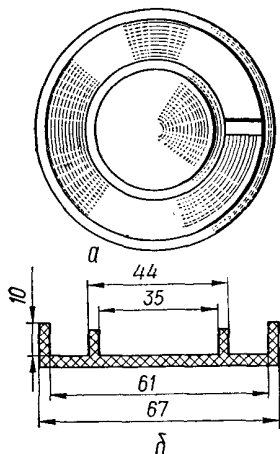


Рис. 3. Прибор Конвей и Байриа: а — вид сверху; б — разрез.

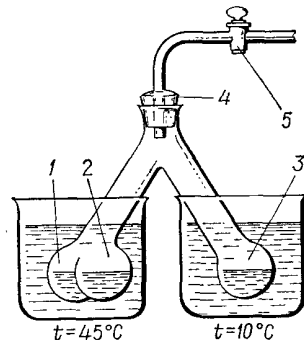


Рис. 4. Аппарат Балаховского и Брунса.

ховский и Брунс разработали простой аппарат (рис. 4) для отгонки и поглощения NH_3 в вакууме, который можно применять также для определения летучих азотистых оснований.

Аппарат состоит из трех сообщающихся сосудов (1, 2, 3), два из которых находятся рядом, а третий — на расстоянии, что позволяет сосуды 1 и 2 подогревать, а 3 — охлаждать. Реакция проходит в вакууме.

Методика опыта. В сосуд 1 вводят исследуемую жидкость, в сосуд 2 — насыщенный раствор карбоната калия или магниальное молоко, в сосуд 3 — 0,1 н. раствор H_2SO_4 . Прибор закрывают насадкой 4, смазанной вазелином, и откачивают воздух до тех пор, пока жидкость не закипит при комнатной температуре. Закрыв кран 5, аппарат наклоняют из стороны в сторону, смешивая таким образом содержимое сосудов 1 и 2. Затем сосуды 1 и 2 помещают в стакан с теплой водой ($45^\circ C$), а сосуд 3 — в стакан с холодной ($10^\circ C$). Реакцию ведут до тех пор, пока жидкость в сосудах 1 и 2 полностью не испарится (около 40 мин).

Остаток H_2SO_4 в сосуде 3 оттитровывают 0,1 н. раствором $NaOH$, добавив 2 капли 0,04%-ного раствора бромтимола синего и 1 каплю

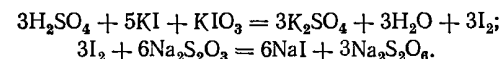
0,5%-ного раствора фенолфталеина. Титруют до сине-фиолетового окрашивания.

Количество летучих оснований в исследуемом образце определяют по формуле, приведенной на стр. 8.

Иодометрическое определение. Если в исследуемом образце летучих азотистых оснований очень мало, применяют иодометрическое определение. Метод основан на определении остатка H_2SO_4 после ее связывания с летучими основаниями иодометрическим титрованием.

Методика опыта. В приемник для дистиллята помещают отмеренное количество смеси H_2SO_4 с KIO_3 . Смесь готовят следующим образом: в мерную колбу на 100 мл отмеряют 5 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 и 20 мл 0,1 н. раствора KIO_3 . Содержимое колбы доводят водой до метки. По окончании перегонки в приемник добавляют в равных отношениях со смесью 5%-ный раствор иодида калия, а через 5 мин — 2-3 капли 1%-ного раствора крахмала (жидкость приобретает темно-синий цвет). Титруют 0,005 н. раствором $Na_2S_2O_3$ до полного обесцвечивания. Если в течение 3 мин появляется синяя окраска, прибавляют еще некоторое количество $Na_2S_2O_3$. Если окраска появляется через более длительное время, то ей не придают значения.

Выделяющиеся летучие азотистые основания связываются в приемнике H_2SO_4 . Остаток кислоты после связывания оттитровывают иодометрически. Реакция иодометрического титрования идет по уравнениям:



Из приведенных уравнений видно, что 1 мл 0,005 н. раствора $Na_2S_2O_3$ эквивалентен 1 мл 0,005 н. H_2SO_4 , что отвечает 0,070 мг азота.

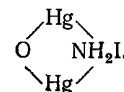
Содержание азота летучих оснований в процентах (x) рассчитывают по формуле

$$x = \frac{(a - b) 0,07 \cdot 100}{g \cdot 1000},$$

где $(a - b)$ — разность объемов при титровании в контрольном и рабочем опытах, мл; 0,070 — количество азота, отвечающее 1 мл 0,005 н. раствора $Na_2S_2O_3$, мг; g — навеска исследуемого растительного продукта, г.

Колориметрическое определение аммиака

1. Одним из методов, часто применяемых в лабораторной практике, является колориметрическое определение NH_3 с реактивом Несслера. Этим методом нередко пользуются при определении азота и по Кьельдалю. Аммиак определяют непосредственно в минерализате. Кроме того, колориметрически определяют содержание NH_3 и его солей в различных растворах. Метод основан на том, что ртуть в щелочном растворе образует с NH_3 иодистый меркураммоний желтого цвета:



При небольших количествах NH_3 окраска появляется лишь спустя некоторое время после добавления реактива Несслера, а при больших — раствор окрашивается немедленно, при этом желтое окрашивание переходит в оранжевое. Если содержание NH_3 или солей аммония очень большое, иодистый меркураммоний выпадает в виде бурого осадка.

При определении необходимо учитывать, что реактив Несслера дает окрашивание не только с NH_3 , но и с аминами, креатинином и некоторыми другими продуктами распада белков.

Приготовление некоторых реактивов. Реактив Несслера готовят следующим образом: 15 г иодида калия растворяют в 10 мл дистиллированной воды, к раствору прибавляют 11,25 г кристаллического иода и перемешивают до полного растворения. К охлажденному раствору иода в KI прибавляют 15 г металлической ртути и взбалтывают, пока не исчезнет желтое окрашивание. Жидкость декантируют с осадка, декантат переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, проверяя в отдельной капле наличие свободного иода (реакция с крахмалом). Если синего окрашивания нет, добавляют раствор иода в иодиде калия до появления слабой реакции. Раствор доводят дистиллированной водой до 100 мл и смешивают с 485 мл 10%-ного раствора NaOH , дают отстояться (8—10 дней), чтобы выпал избыток солей ртути. Затем фильтруют и хранят в темной склянке, герметично закрывающейся хорошей корковой пробкой (нельзя использовать притертую стеклянную, ибо заедает).

Стандартный раствор хлорида аммония получают, растворяя 153 мг химически чистого NH_4Cl в мерной колбе на 100 мл. Отбирают 25 мл полученного раствора в мерную колбу на 1 л, прибавляют 10 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 и доводят водой до метки. Этот раствор содержит 0,01 мг азота в 1 мл (можно использовать также и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Методика опыта. Отбирают пипеткой испытуемый раствор так, чтобы в данном объеме содержалось от 0,01 до 0,06 мг азота, и количественно с дистиллированной водой переносят в мерную колбу на 50 мл. Затем в колбу добавляют 0,3 мл 30%-ного раствора NaOH и 0,5 мл реактива Несслера, содержимое колбы доводят водой до метки. Параллельно берут стандартный раствор NH_4Cl , содержащий такое же количество азота, как и в пробе, и к нему также добавляют NaOH и реактив Несслера, сохраняя условия опыта. Окрашенные растворы анализируют при помощи фотоэлектроколориметра.

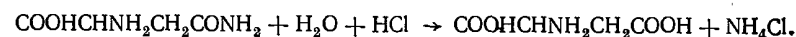
2. Небольшие количества NH_3 можно определять колориметрически также по фенол-гипохлоритному методу. Раствор окрашивается при смешении NH_3 с фенолом и гипохлоритом. В этой реакции образуется синее вещество. Полагают, что оно принадлежит к классу индофенолов. Этим методом можно определить NH_3 с точностью до 0,5 мкг.

АМИДНЫЙ АЗОТ

Определение амидного азота

Аспарагин и глутамин в больших количествах накапливаются в растениях. Из них они попадают в продукты производства и, таким образом, нередко оказывают большое влияние на ход технологического процесса.

Содержание аспарагина и глутамина в растительном материале определяют по азоту амидной группы, отщепляемому в виде солей аммония при кипячении раствора этих соединений с HCl или с H_2SO_4 . Например, реакция аспарагина и HCl протекает по уравнению



Количество аммиака определяют одним из описанных ранее методов.

Глутамин и аспарагин можно определять также по методу Креговича и Евстигнеевой. Метод основан на более легком отщеплении амидной группы от глутамина, чем от аспарагина. Разложение глутамина на NH_3 и глутаминовую кислоту происходит при $\text{pH} = 6,4 \div 6,8$ в течение часа на кипящей водяной бане. Одновременно расщепляется и около 2,5% аспарагина. Но полное расщепление аспарагина происходит лишь при гидролизе его с 5%-ным раствором H_2SO_4 в течение 3 ч на кипящей бане.

Приготовление некоторых реактивов.

Фосфатный буфер $\text{pH} = 6,47$, или смесь Зеренсена — 300 мл $1/15$ М раствора Na_2HPO_4 смешивают с 700 мл $1/15$ М KH_2PO_4 . Метилрот — 0,1 г метилрота растворяют в 30 мл спирта и разбавляют водой до 50 мл.

Методика опыта. Навеску 3—10 г воздушно-сухого растительного продукта помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, добавляют 50 мл теплой воды и смесь 1 ч встряхивают в шуттель-аппарате. По окончании встряхивания смесь охлаждают и добавляют к ней по каплям 4%-ный раствор таннина (обычно 3—5 мл). Таннин необходим для осаждения азотистых алкалоидных группировок белков. Осаждение происходит за счет образования нерастворимых солеобразных соединений. Таннин добавляют до прекращения выпадения осадка, избегая избытка реактива. После осаждения смесь доводят водой до метки и оставляют на 12 ч в холодильнике (от 2 до 4° С) для отстаивания. Осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера с отсасыванием или центрифугируют. Полученный фильтрат или центрифугат используют для определения NH_3 , глутамина и аспарагина. Пипеткой Мора отмеряют 10 мл раствора и определяют в нем содержание NH_3 одним из описанных способов.

Определение глутамина. 10 мл раствора помещают в колбу, прибавляют 2—3 капли метилрота и фосфатный буфер до появления желтой окраски индикатора. Колбу соединяют с обратным холодильником и погружают в кипящую водяную баню на 1 ч. После охлаждения в гидролизате определяют азот NH_3 .

Содержание глутамина в исследуемом продукте рассчитывают по формуле

$$G_a = \left[a - b - \frac{(a - b) 2,5}{100} \right] 10,42,$$

где G_a — количество глутамина, мг%; a — количество азота, определенного после расщепления глутамина, мг%; b — количество азота NH_3 в исследуемом материале, мг%; $\frac{(a - b) 2,5}{100}$ — поправка на

частичное расщепление аспарагина; 10,42 — коэффициент пересчета азота на глютамин.

Расчет с применением определенного коэффициента условный, для более точных определений необходимо знать, какой амид присутствует в исследуемом продукте.

Пример расчета. В исследуемом продукте было определено 26,3 мг% азота NH_3 . После гидролитического расщепления глютамина определено 72,5 мг% азота. Таким образом, количество глютамина (в мг%) в исследуемом продукте составит:

$$\left[72,5 - 26,3 - \frac{(72,5 - 26,3) 2,5}{100} \right] 10,42 = 469 \text{ мг \%}.$$

Определение аспарагина. В небольшую колбу отмеряют 10 мл из оставшейся части раствора и прибавляют 30%-ный раствор H_2SO_4 с таким расчетом, чтобы содержание ее в смеси было равно 5%. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане 3 ч. Затем колбу охлаждают, раствор нейтрализуют сухим Na_2CO_3 до слабокислой реакции и в нем определяют аммиак.

Содержание аспарагина рассчитывают по формуле

$$Ac = [c - (a + b)] 9,42,$$

где Ac — количество аспарагина, мг%; c — количество азота, определенного в гидролизуемой жидкости, мг%; a — количество азота NH_3 , мг%; b — количество азота глютамина, мг%; 9,42 — коэффициент пересчета азота на аспарагин.

Пример расчета. В гидролизате определено 112,0 мг% азота, в исследуемом продукте 26,5 мг% азота NH_3 . Содержание азота в глютаmine составляет 45,0 мг%. Подставляем полученные величины в формулу и определяем содержание аспарагина в продукте:

$$Ac = 112,0 - (26,5 + 45,0) 9,42 = 381,5 \text{ мг \%}.$$

АМИНОКИСЛОТЫ

Аминокислотами называются химические соединения, обладающие амфотерными свойствами, и содержащие аминные (основные свойства) и карбоксильные группы (кислотные свойства).

Аминокислоты являются основой молекулы белка. Кроме того, они самостоятельно выполняют ряд жизненно важных функций. В растительных продуктах всегда содержатся аминокислоты в свободном состоянии. Например, в муке злаковых в свободном состоянии есть почти все те аминокислоты, что и в белке зерна.

Накопление аминокислот в продуктах производства сопровождается образованием ряда соединений, определяющих их цвет, вкус и аромат. Производными аминокислот являются такие соединения, как меланины, меланоиды, сивушные масла и др. Эти соединения в значительной мере определяют качество получаемых пищевых продуктов. Аминокислоты при определенных условиях влияют на ход технологических процессов: например, в сахарном производстве они являются меласообразователями и увеличивают потери сахара.

Подготовка пробы к анализу. Отбор средней пробы. Величина средней пробы зависит от условий опыта, особенностей исследуемого объекта и массы образца.

Перед отбором средней пробы образец тщательно перемешивают, а затем способом квартования (для сыпучих веществ) отбирают пробу для анализа.

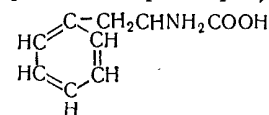
Приготовление водной вытяжки. В колбу емкостью 100—200 мл помещают 5—10 г размолотого высушенного растительного материала, приливают 50—100 мл дистиллированной воды, плотно закрывают резиновой пробкой и взбалтывают 30 мин в шуттель-аппарате. Осадок отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр или центрифугируют.

Клубни, корнеплоды и другие виды растительного сырья, содержащие много воды, предварительно тщательно измельчают, извлекая сок отжатием и фильтрацией.

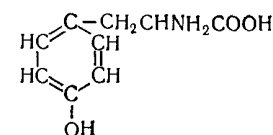
В водных вытяжках не должно содержаться взвешенных веществ. Это же требование предъявляют и к жидким продуктам. Если цвет растворов очень темный, их разбавляют водой.

Качественные реакции на аминокислоты

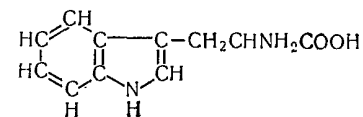
Ксантопротеиновая реакция (от греч. xanthos — желтый). Циклические аминокислоты, содержащие бензольное кольцо (фенилаланин, тирозин и триптофан),



Фенилаланин
(α -амино- β -фенилпропионовая кислота)



Тирозин
(α -амино- β -параоксифенилпропионовая кислота)



Триптофан
(α -амино- β -индолилпропионовая кислота)

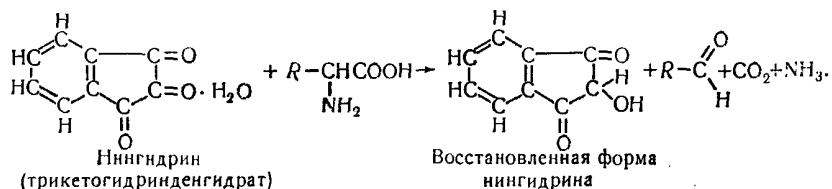
при действии концентрированной HNO_3 нитруются с образованием нитросоединений желтого цвета.

Ксантопротеиновой реакцией определяют не только свободные, но и связанные в белках циклические аминокислоты. Большинство белков под действием концентрированной HNO_3 окрашиваются в желтый цвет.

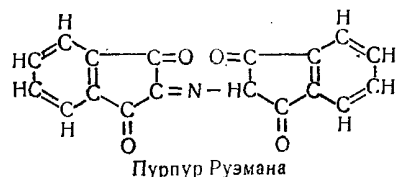
При осторожном прибавлении к реакционной смеси раствора NH_3 или другой щелочи появляется красно-оранжевая окраска, обусловленная образованием нитроновых кислот. Ксантопротеиновая реакция обладает высокой чувствительностью.

Методика опыта. К 3 мл испытуемого раствора прибавляют по каплям 1 мл (20 капель) концентрированной HNO_3 и осторожно нагревают. Если исследуют белок, то выпадает осадок вследствие образования **метанпротеина**. Осадок и раствор окрашиваются в желтый цвет.

Реакция с нингидрином. Большинство аминокислот реагирует с нингидрином, образуя CO_2 , NH_3 и соответствующий альдегид:



Образовавшиеся NH_3 , CO_2 и альдегид можно использовать для количественного определения. Кроме того, можно определить колориметрически интенсивность сине-фиолетовой окраски образующегося при этом «пурпура Рузмана»:



С нингидрином дают интенсивную синюю или фиолетовую окраску белки и полипептиды.

Методика опыта. Чтобы определить белковые вещества в растительных продуктах, полученную белковую вытяжку разбавляют в 10 раз дистиллированной водой и к 2 мл этого раствора добавляют 0,5 мл 0,1%-ного раствора нингидрина. Смесь вначале окрашивается в фиолетовый или фиолетово-розовый цвет, а через некоторое время в синий.

Методика опыта. К раствору аминокислот или белков прибавляют $\frac{1}{5}$ объема реактива Миллона (см. стр. 19) и слегка нагревают: образующийся осадок или раствор окрашивается в красный цвет. Через 30 мин красное окрашивание раствора наблюдается и без нагревания.

Чтобы убедиться, что фенолы и их производные при добавлении реактива Миллона образуют ртутные соединения красного цвета, проводят реакцию Миллона с раствором карболовой кислоты. После осторожного нагревания карболовой кислоты с реактивом Миллона появляется розовое окрашивание.

Следует заметить, что при добавлении реактива Миллона раствор окрашивается в желтый цвет вследствие взаимодействия фенольных групп с HNO_3 , дающей ксантопротеиновую реакцию, которая маскирует реакцию Миллона.

Реакция Адамкевича является характерной реакцией на триптофан, который в кислой среде образует со многими альдегидами цвет-

ные продукты конденсации. Триптофан или белок, содержащий его,

с глиоксиловой кислотой ($\text{H}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{OH}$) в присутствии концентрированной H_2SO_4 образует продукт красно-фиолетового цвета. Глиоксиловая кислота содержится в ледяной уксусной кислоте.

Методика опыта. В пробирку наливают несколько капель испытуемого раствора аминокислоты или белковой вытяжки и прибавляют около 1 мл (20 капель) CH_3COOH . Наклонив пробирку, осторожно (по стенке) приливают 1 мл (20 капель) концентрированной H_2SO_4 ($d = 1,84 \text{ г/см}^3$). На границе двух несмешивающихся жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо.

Реакция на содержание серы. Цистин, глутатион и другие серусодержащие соединения легко отщепляют серу в виде H_2S , который с ацетатом свинца образует черный осадок.

Методика опыта. К испытуемому раствору приливают равный объем 20%-ного раствора NaOH и несколько капель 10%-ного раствора ацетата свинца. Смесь осторожно нагревают до кипения. Раствор или образовавшийся белый осадок вначале буреет, а затем чернеет, что указывает на содержание серы.

Реакция на аргинин. С гипохлоритом (или гипобромитом) и α -нафтолом в щелочной среде аргинин образует соединение красного цвета.

Приготовление некоторых реактивов. 0,2%-ный раствор α -нафтола — 0,5 г α -нафтола растворяют в 50 мл этилового спирта. Перед употреблением 5 мл указанного раствора разбавляют в 5 раз водой. Г и п о б р о м и д н а т р и я — 300 г NaOH растворяют в 1 л воды. Раствор охлаждают и (под тягой) осторожно при постоянном помешивании прибавляют к нему 50 г брома (около 16 мл). Раствор хранят в темной склянке. Он не портится в течение трех месяцев. 0,01%-ный раствор аргинина в 0,1 н. растворе H_2SO_4 — в 100 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 растворяют 10 мг аргинина.

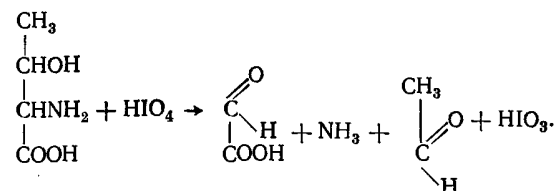
Методика опыта. В пробирку наливают 1—2 мл испытуемого раствора, добавляют 1—2 капли раствора NaOH и 1—2 капли раствора α -нафтола. Перемешивают содержимое и прибавляют каплю раствора гипобромита. Раствор белка окрашивается в малиново-красный цвет, а раствор аргинина — в кирпично-красный.

Реакция Паули на гистидин и тирозин. Гистидин с диазотированной сульфаниловой кислотой в щелочном растворе образует соединение красного цвета. Кроме гистидина с диазореактивом дают оранжево-красное окрашивание тирозин и триптофан. Диазореакция используется и для количественного определения тирозина и гистидина.

Методика опыта. В пробирку вносят 3 капли 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты в 2%-ном растворе HCl , добавляют 3 капли раствора NaNO_2 и перемешивают. В полученный диазореактив вводят 5 капель испытуемого раствора. Появление красного окрашивания указывает на присутствие гистидина и тирозина или одной из этих аминокислот. Красное окрашивание объясняется образованием азокрасителя.

Реакция на треонин и серин. Треонин и серин с иодной кислотой образует глиоксиловую кислоту, NH_3 и муравьиный или

соответственно уксусный альдегид по уравнению



Этой реакцией можно пользоваться и для количественного определения указанных аминокислот.

Количественное определение аминокислот

Для количественного определения аминокислот существует много методов. Эти методы делят на химические, хроматографические, микробиологические, ферментативные и методы с применением изотопов.

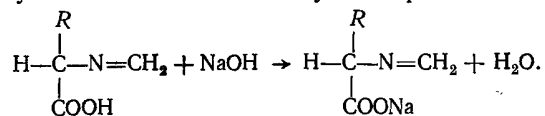
Метод формольного титрования со смешанными индикаторами. Это один из лучших, простых и быстрых методов. При формольном титровании в качестве смешанных индикаторов используют бромтимол синий и фенолфталеин, которые позволяют вести титрование до $\text{pH} = 9,2$. Известно, что в присутствии формальдегида точка эквивалентности лежит вблизи $\text{pH} = 9$.

При определениях аминокислот в окрашенных растворах, а также с целью дальнейшего уточнения метода следует применять более сложное потенциометрическое титрование. Потенциометрическое титрование можно вести до $\text{pH} = 9,5$, учитывая, что метиленовые производные аминокислот являются слабыми кислотами. Для потенциометрического титрования нужно использовать pH -метр.

Сущность реакции формольного титрования заключается в том, что аминные группы взаимодействуют с формальдегидом (так же, как и с другими альдегидами) и образуют метиленовые производные. При этом аминогруппы теряют свои основные свойства, карбоксильная группа оттитровывается едкой щелочью. Реакция с формальдегидом следующая:



Полученную метиленаминокислоту оттитровывают щелочью:



При этом условно считают, что количество титруемых карбоксильных групп эквивалентно количеству связанных формальдегидом аминных групп (оправдывается в основном для моноаминомонокарбоновых кислот). Чтобы ввести поправку для дикарбоновых аминокислот (глю-

таминовой, аспарагиновой и др.), раствор предварительно нейтрализуют до $\text{pH} = 7,0$.

Приготовление некоторых реактивов. 0,04%-ный раствор бромтимолола синего — 0,1 г бромтимолола синего растирают в ступке с 3,2 мл 0,05 н. раствора NaOH. Смесь переносят количественно дистиллированной водой в мерную колбу емкостью 250 мл и полученный раствор доводят до метки. Формольная смесь — 50 мл 40%-ного раствора формальдегида смешивают с 2 мл 0,5%-ного раствора фенолфталеина, полученную смесь титруют 0,2 н. раствором NaOH до слабо-розового окрашивания. Формалин с повышенной кислотностью использовать для анализа нельзя. Его следует предварительно в течение суток обработать мелом. Формольную смесь готовят каждые 2—3 дня, и после приготовления фильтруют. При исчезновении розовой окраски перед использованием в смесь добавляют одну-две капли 0,2 н. раствора NaOH до появления слабо-розовой окраски. Буферный буферный раствор с $\text{pH} = 9,2$ — 23,30 мл 0,1 М раствора KCl смешивают с 26,70 мл 0,1 М раствора NaOH и 50 мл 0,1 М раствора H_3BO_3 (приготовление 0,1 М растворов и очистку реактивов для этих растворов, см. стр. 47). Буферный раствор с $\text{pH} = 7$ — 50 мл 0,2 М раствора KH_2PO_4 в мерной колбе на 200 мл смешивают с 29,63 мл 0,2 М раствора NaOH и доводят водой до метки.

Методика опыта. Берут два стакана одинакового диаметра емкостью по 100 мл (1 и 2) из бесцветного стекла. В первый стакан наливают 20 мл буферного раствора с $\text{pH} = 9,2$, во второй — 20 мл буферного раствора с $\text{pH} = 7,0$. В оба стакана добавляют по 5 капель 0,04%-ного раствора бромтимолола синего, а в первый еще 3 капли 0,5%-ного раствора фенолфталеина. В первом стакане жидкость окрасится в сине-фиолетовый цвет, во втором — в слабо-зеленый. Если эталоны герметически закрыть, то они могут храниться 15 дней, не изменяя цвета.

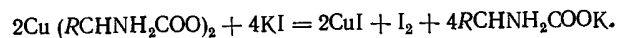
2 мл исследуемой вытяжки аминокислот смешивают с 18 мл воды и 5 каплями 0,04%-ного раствора бромтимолола синего. Смесь нейтрализуют: если она синяя, осторожно по каплям добавляют 0,05 н. раствор HCl, если желтая — 0,05 н. раствор NaOH до образования желто-зеленой окраски ($\text{pH} = 7,0$). Цвет титруемого раствора сравнивают с эталоном (стакан 2) на белом листе бумаги или на молочном стекле. Цвет, толщина стекла и диаметр сравниваемых стаканов должны быть одинаковыми.

После доведения кислотности опытного раствора до $\text{pH} = 7,0$ добавляют из мерного цилиндра (не пипеткой) 2 мл формольной смеси и титруют (из бюретки от нуля) 0,05 н. раствором NaOH, сравнивая с эталоном (стакан 1, $\text{pH} = 9,2$), до хорошо выраженной сине-фиолетовой окраски раствора. Желаемый цвет раствора обычно появляется от прибавления одной избыточной капли раствора NaOH. Нередко достаточно и полкапли, так как реакция весьма чувствительна. Для введения поправки в таких же условиях титруют дистиллированную воду (контрольный опыт).

Разность между количествами, 0,05 н. раствора NaOH, использованного для титрования опытного и контрольного растворов, умноженная на 0,7, соответствует количеству миллиграммов азота аминокислот в 2 мл исследуемой жидкости. При определении содержания азота аминокислот в 100 мл вытяжки или гидролизата полученный результат умножают на 50. Если азот необходимо определить в миллиграмм-процентах, полученный результат пересчитывают на 100 г исследуемого

продукта. Для повышения точности определения при небольшом содержании аминокислот в исследуемых растворах следует пользоваться микробюреткой. Если раствор аминокислот прозрачный и бесцветный, то для титрования берут не 2 мл, как указано выше, а значительно больше, что также повышает точность определения.

Метод Попе и Стивенса. Этот метод основан на том, что образующаяся растворимая соль меди при взаимодействии с KI в присутствии CH_3COOH восстанавливает иод. Выделившийся иод определяют титрованием раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Реакция выделения иода идет по следующему уравнению:



При титровании иода раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ учитывают, что 1 мл 0,01 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ соответствует 0,28 мг аминного азота при условии, что в растворе содержатся только аминокислоты. Известно, что кроме аминокислот растворимые соли могут образовать и различные пептиды, что вносит ошибку в определение.

Приготовление некоторых реактивов. Раствор CuCl_2 (27,3 г в 1 л воды). Раствор Na_3PO_4 — 64,5 г Na_2HPO_4 в мерной колбе на 1 л растворяют в 500 мл воды, не содержащей CO_2 , добавляют 7,2 г NaOH и полученный раствор доводят водой до метки. Буферный раствор — 57,21 г буры растворяют в 1,5 л воды, добавляют 100 мл 1 н. раствора HCl и доводят водой в мерном цилиндре до 2 л. Суспензия фосфата меди в буферном растворе — один объем раствора CuCl_2 смешивают с двумя объемами раствора Na_3PO_4 и прибавляют два объема буферного раствора. Суспензию готовят на 2—3 дня. Раствор тимофталена — 9,25 г тимолфталена растворяют в 100 мл 50%-ного раствора этилового спирта. 0,01 н. раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ готовят непосредственно перед использованием из 0,1 н. раствора.

Методика опыта. В мерную колбу емкостью 50 мл помещают от 1 до 5 мл вытяжки или раствора, добавляют 4 капли индикатора и нейтрализуют вытяжку 1 н. раствором NaOH до слабо-голубой окраски. К нейтральному раствору приливают из цилиндра 30 мл суспензии фосфата меди, доводят водой содержимое колбы до метки и хорошо перемешивают. Смесь фильтруют через складчатый фильтр из плотной фильтровальной бумаги или центрифугируют. По ходу работы полученный раствор может быть оставлен до следующего дня.

Из полученного центрифугата (фильтрата) отбирают 10 мл раствора, прибавляют 0,5 мл 80%-ного раствора CH_3COOH и 1 г KI (в порошок). Выделившийся иод титруют 0,01 н. раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ с 5 каплями крахмала в качестве индикатора. Наличие мути в центрифугах или фильтратах может привести к ошибкам в определении, а поэтому необходимо следить, чтобы они были прозрачны. Кроме того, необходимо учитывать, что не все аминокислоты образуют растворимые соли меди, например соль цистина труднорастворима.

Для внесения поправки на чистоту реактивов ставят контрольный опыт.

Количество азота аминокислот (в мг%) вычисляют по формуле

$$x = \frac{(a - b) 0,28 \cdot 5 \cdot 100}{v},$$

где a — количество 0,01 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, израсходованного для титрования рабочего раствора, мл; b — количество 0,01 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, израсходованного для титрования в контрольном опыте, мл; v — объем раствора (или гидролизата), взятый для определения, мл; 0,28 — коэффициент для пересчета данных титрования на азот аминокислот.

Метод колориметрии. Определение тирозина (формулу см. на стр. 13). Окисление тирозина при обработке растительных продуктов сопровождается образованием темноокрашенных меланинов. В процессе окислительного дезаминирования из тирозина образуется спирт тирозол, который влияет на качество продуктов, полученных в процессе брожения, в частности тирозол входит в состав веществ, определяющих букет пива и сообщающий ему горький вкус. В процессе метилирования тирозина в солоде образуется алкалоид горденин, поэтому определение этой аминокислоты весьма важно.

В основу метода положена реакция тирозина с реактивом Миллона, в результате которой образуется соединение ртути красного цвета.

Приготовление некоторых реактивов. Реактив Миллона — в 100 мл концентрированной HNO_3 ($d = 1,40 \text{ г/см}^3$) вначале на холоду, а затем при осторожном слабом нагревании растворяют 50 г ртути. После растворения ртути прибавляют два объема воды. Если образуется осадок, то жидкость сливают только после отстаивания.

Стандартный раствор — 0,05 г тирозина растворяют в 100 мл 2,5%-ного раствора H_2SO_4 . Водную вытяжку из растительного материала готовят так же, как для определения аминокислот формальным титрованием с применением смешанных индикаторов (см. стр. 17).

Методика опыта. В одну пробирку наливают 5 мл испытуемой вытяжки, в другую — 5 мл стандартного раствора тирозина, затем в каждую добавляют по 1 мл реактива Миллона и хорошо перемешивают. Если выпадает осадок, то его отделяют центрифугированием. Через 45 мин стояния при комнатной температуре окрашенный раствор анализируют в фотоэлектроколориметре (ФЭК), сравнивая со стандартным раствором тирозина. Количество тирозина можно определять также по калибровочной кривой, на которой нанесена плотность нескольких стандартных растворов. График строят на миллиметровой бумаге, откладывая на оси абсцисс концентрацию (в миллиграммах, молях или процентах), а на оси ординат — оптическую плотность соответствующих растворов.

Определение аргинина (по Сакагуши). Аргинин $\text{NH}=\text{C}-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NHCOOH}$ — незаменимая аминокислота — принадлежит к группе основных аминокислот (лизина и гистидина), называемых гексоновыми основаниями, наличие которых определяет белковую ценность пищевого продукта.

Методика опыта. К 5 мл испытуемого водного раствора добавляют по 1 мл 10%-ного раствора NaOH, 0,1%-ного раствора α -нафтола.

Охлаждают холодной водой под краном в течение 5 мин. Автоматической пипеткой добавляют 1 мл разбавленного раствора NaOCl и измеряют интенсивность красной окраски в ФЭКе. Количество аргинина определяют по калибровочной кривой.

Определение метионина (по Салливану — Мак-Карту). Метионин $\text{H}_3\text{C}-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{NH}_2\text{COOH}$ (α -амино- γ -метилтиол-*n*-масляная кислота) является незаменимой обязательной аминокислотой, определяющей полноценность белков и играющей важную роль в метаболизме. Он является источником метильных групп при синтезе лектиновых веществ, а также имеет большое значение при синтезе холина, который относится к группе витаминов В. В сахарном производстве холин играет отрицательную роль как антикристаллизатор сахара (вредный азот). При переносе сульфгидрильных групп метионин является источником образования цистеина.

Методика опыта. Предварительно готовят 10%-ный раствор нитропруссид натрия. Для этого навеску нитропруссид натрия растирают в ступке и растворяют в воде при комнатной температуре. Хранят в темной склянке в холодильнике.

1—2 мл раствора, содержащего около 0,2—1,0 мг метионина, наливают в пробирку и доводят объем раствора до 7,5 мл. Затем добавляют 1,5 мл 5 н. раствора NaOH, 1,5 мл 1%-ного раствора гликокола и 0,3 мл 10%-ного раствора нитропруссид натрия. После добавления каждого реагента раствор перемешивают. Пробирку помещают в водяную баню при 37—40° С на 15 мин, затем в течение 5—7 мин охлаждают в смеси воды со льдом. Потом после удаления пробирки из ледяной бани в нее добавляют 3,0 мл 6 н. раствора HCl (приливают по стенке не перемешивая). Пробирку закрывают пробкой. Встряхивают в течение 1 мин и ставят в штатив. Далее оставляют стоять при комнатной температуре 15 мин и измеряют интенсивность красной окраски раствора, сравнивая его с водой, используя для этого светофильтр с длиной волны 520 нм.

Если проба окрашена, то вводят поправку следующим образом. К пробе добавляют все реактивы, кроме нитропруссид, и измеряют окраску, сравнивая ее с водой. Результаты плотности окраски вычитают из результатов опыта.

Хроматографический анализ аминокислот

В 1903 г. профессор Воронежского университета М. С. Цвет впервые разработал хроматографический адсорбционный метод разделения смесей различных веществ, содержащихся в растворе. Хроматография, исключительная по точности и простоте, нашла широчайшее применение в различных областях химической практики. Дальнейшая разработка хроматографического анализа позволила не только разделять (фракционировать) смеси сложнейших химических веществ, но и определять их количество.

При помощи хроматографического метода разделяют растительные пигменты (хлорофилл, ксантофилл, ликопин, каротины и др.), аминокислоты, сахара, различные жирные кислоты, ферменты, вита-

мины, антибиотики и многие другие сложнейшие органические вещества, обладающие близкими свойствами, если эти вещества принятыми методами (разгонка, кристаллизация, осаждение и др.) не удастся разделить.

Адсорбционная хроматография. Этот вид хроматографии основан на разделении растворенных веществ в колонке, наполненной каким-либо адсорбентом. В качестве адсорбента могут быть использованы карбонат кальция, крахмал, оксид алюминия и многие другие вещества. Разделение веществ является следствием их различных адсорбционных свойств.

В зависимости от способа извлечения веществ, поглощенных адсорбентом, различают элюатный, фронтальный и вытеснительный анализы.

Элюатный анализ основан на извлечении поглощенного вещества из адсорбента путем вымывания его тем или иным растворителем.

При фронтальном анализе раствор пропускают через колонку, наполненную соответствующим адсорбентом. Адсорбируемые вещества разделяются в колонке по зонам (фронтам), которые по мере поступления раствора постепенно продвигаются к нижней части ее, а затем поступают в приемник. Фракцию каждой зоны (фронта) собирают в отдельный приемник, измеряют ее объем и определяют количество содержащегося в ней вещества. При этом происходит неполное разделение, так как какая-то часть вещества одной фракции попадает в другую фракцию.

Вытеснительный способ разделения веществ сводится к тому, что через адсорбент, содержащий адсорбированные соединения, пропускают раствор, в котором содержится вещество с большей адсорбционной способностью. Вводимое вещество вытесняет адсорбированное из колонки в приемник.

Распределительная хроматография на бумаге. При этом методе вещество распределяется между двумя жидкими растворителями (фазами), одна из которых — органический растворитель — перемещается по фильтровальной бумаге (подвижная фаза), а вторая — вода — адсорбирована носителем, бумагой (неподвижная фаза).

Коэффициент скорости перемещения веществ по фильтровальной бумаге R_f (отношение расстояния, пройденного аминокислотой, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя) является постоянной величиной для каждого вещества при определенных растворителях, сортах бумаги, температуре, а также при сохранении других условий.

Для разделения веществ пользуются одномерной и двумерной, восходящей и нисходящей бумажной хроматографией.

Одномерную хроматограмму получают, используя только один растворитель. Вещества распределяются в одном направлении, причем разделяется ограниченное число компонентов. Если разделяемых веществ много, они распределяются группами (по 2—3 вещества и более).

При помощи двумерной хроматограммы можно разделить те компоненты, которые не разделяются одним растворителем. Этот вид хроматографирования выполняют на квадратном листе бумаги с применением двух органических растворителей. Разделение ведут последовательно в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Таким

способом можно разделить большое количество компонентов, так как коэффициент скорости перемещения веществ R_f для различных растворителей разный.

По технике получения хроматограммы делят на нисходящие и восходящие. При получении нисходящей хроматограммы растворитель перемещается по бумаге сверху вниз, восходящей — снизу вверх. При нисходящей хроматограмме достигается больший коэффициент скорости перемещения вещества R_f , но пятна получаются более размытые, чем при восходящей хроматограмме, где пятна меньше и более компактные. Поэтому первую хроматограмму обычно применяют для качественной оценки состава смеси, а вторую — для количественного определения ее компонентов. Кроме того, применяют круглую (радиальную) хроматограмму, при которой бумага находится в горизонтальном положении, а растворитель перемещается от центра к периферии. Для такой хроматограммы вырезают круг из фильтровальной бумаги диаметром 250—300 мм. В центре круга простым карандашом вычерчивают дополнительный круг диаметром 20 мм и на маленький круг наносят 8—10 капель (по 2—3 мкг) испытуемой смеси. Бумагу высушивают на воздухе, а затем зажимают между крышками эксикатора или крышками чашки Петри, которые служат хроматографическими камерами. Растворитель непрерывно подают в центр круга, обычно опуская в растворитель нарезанные полоски бумаги, соединенные с центром этого круга. Для хроматографии используют специально приготовленную фильтровальную бумагу, которая должна удовлетворять следующим требованиям: не адсорбировать хроматографируемых веществ; быть однородной по плотности и содержать минимум солевых, а также других примесей, растворимых в данных растворителях.

Обычно применяют фильтровальную бумагу производства Ленинградской фабрики им. Володарского или безольную «синюю ленту».

Органическими растворителями служат фенол, насыщенный водой, различные смеси, состоящие из бутанола, C_2H_5OH , H_2O , CH_3COOH и др. Соотношения растворителей в каждом отдельном случае различны.

Методом распределительной хроматографии на бумаге разделяют и количественно определяют различные, часто весьма сложные по составу, вещества. Этот метод позволяет определить ничтожно малые количества веществ, сотые и тысячные доли миллиграмма. При исследовании различных растительных продуктов в каждом случае применяют специфические приемы хроматографического анализа, в зависимости от состава белков и содержания в них аминокислот.

Определение аспарагиновой и глутаминовой кислот (по В. Л. Кретовичу и А. А. Бундель). Большие количества аспарагиновой $COONCH_2CHNH_2COOH$ (α -аминоянтарной) и глутаминовой $COONCH_2CH_2CHNH_2COOH$ (α -аминоглутаровой) дикарбоновых моноаминокислот содержатся в белках растений. Содержание аспарагиновой кислоты в отдельных белках достигает 10%, а глутаминовой более 40%. Эти аминокислоты содержатся в белках как в свободном

виде, так и в виде моноамидов — аспарагина $NH_2OCCH_2CHNH_2COOH$ и глутамина $NH_2OCCH_2CH_2CHNH_2COOH$.

Дикарбоновые аминокислоты играют важную роль в метаболизме растительного организма, в синтезе и взаимопревращении аминокислот, в синтезе белка и его превращениях при диссимиляции.

Большое количество аспарагиновой кислоты накапливается в этиолированных (выросших в темноте) ростках бобовых в виде аспарагина.

Глутаминовая кислота и глутамин накапливаются в корнях сахарной свеклы (около 50% всех аминокислот сахарной свеклы).

Аспарагиновая и глутаминовая кислоты, а также их амиды являются антикристаллизаторами, мелассообразователями, в связи с чем они снижают выход сахара в сахарном производстве. Вследствие разложения амидов дикарбоновых кислот происходит выделение аммиака и образование солей этих кислот. Аспарагиновая и глутаминовая кислоты накапливаются в патоке.

Глутаминовая кислота имеет большое промышленное значение как ценный побочный продукт сахарного производства. Эта кислота и ее натриевая соль могут быть получены из мелассы или из барды спиртовых заводов. В настоящее время освоено промышленное получение глутаминовой кислоты.

Глутаминовая и аспарагиновая кислоты используются в медицине, микробиологии и в пищевом производстве.

В. Л. Кретович и А. А. Бундель разработали быстрый метод определения аспарагиновой и глутаминовой кислот, который основан на том, что активированный, подкисленный оксид алюминия адсорбирует аспарагиновую, глутаминовую кислоты и цистин. Другие аминокислоты, которые проходят через хроматографическую колонку, этим адсорбентом не задерживаются. Цистин вымывают из колонки дистиллированной водой, насыщенной H_2S (цистин при этом восстанавливается в цистеин, а оставшиеся дикарбоновые кислоты последовательно элюируют). Установлено, что глутаминовая кислота, адсорбированная на Al_2O_3 , при элюировании слабым раствором кислоты быстрее передвигается по колонке, чем аспарагиновая. В полученных элюатах определяют азот методом Кьельдаля.

В суженную часть стеклянной трубки 1 длиной 50 см и внутренним диаметром около 10 мм (рис. 5) помещают маленький кусочек гигроскопической ваты 2. Трубку резиновой пробкой соединяют с колбой Бунзена. Стеклообразную трубку наполняют адсорбентом 3 — безводным оксидом алюминия. Активность безводного оксида алюминия проверяют следующим образом: 4 г адсорбента, предварительно обработанного HCl , взмучивают с водой, а затем переносят в колонку, вода при этом

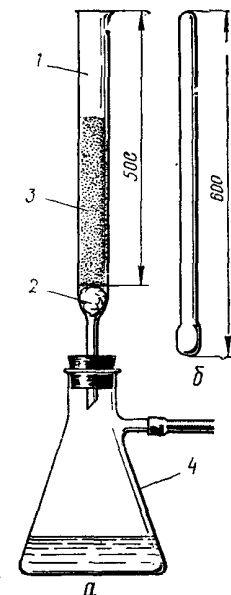


Рис. 5. Хроматографическая колонка (а); пестик (б) для заполнения колонки адсорбентом.

стекает самотеком. Поверхность адсорбента на протяжении всего опыта должна быть покрыта слоем жидкости. Через колонку пропускают (с легким просасыванием) 40 мл нейтрализованного 0,2%-ного раствора глютаминовой кислоты, который предварительно нейтрализуют 0,05 н. раствором КОН по фенолфталеину до слабо-розового окрашивания.

Когда на поверхности колонки останется слой жидкости толщиной 2—3 мм, адсорбент промывают 100 мл воды. Воду выливают, приемник (колбу Бунзена 4) споласкивают и подставляют для приема элюата глютаминовой кислоты. Для элюирования сначала берут 5 мл 3 н. раствора КОН, а затем 40 мл 0,05 н. раствора КОН. Элюат количественно переносят в колбу Кьельдаля и определяют азот. Адсорбент после элюации количественно переносят в бюкс, сливают воду и высушивают до постоянной массы, затем рассчитывают его активность. Адсорбент считают активным и пригодным для анализа, если 1 г его связывает 2—3 мг глютаминовой кислоты. Обычно активность адсорбента проверяют, если берут большое количество Al_2O_3 , необходимое для серии анализов.

Если активность Al_2O_3 недостаточна, ее повышают, нагревая с $AlCl_3$. При нагревании 30 г Al_2O_3 с 25 г $AlCl_3$ в течение 24 ч до $700^\circ C$ активность ее повышается приблизительно в 3,5 раза.

Методика опыта. Навеску взвешивают на аналитических весах (1—2 г исследуемого сухого материала), помещают в маленькую фарфоровую чашечку (диаметром 5—7 см) и обрабатывают кипящим 96%-ным раствором этилового спирта¹. Часть спирта при кипячении с пробой испарится, остаток же его высушивают, продувая теплый воздух. Полученный сухой материал растирают в небольшой ступке (диаметром 10—12 см). Затем добавляют 30 мл воды и оставляют на 30 мин при $20^\circ C$. Содержимое ступки количественно переносят, смывая небольшими порциями воды, в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят водой до метки. Затем смесь хорошо перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр на воронке Бюхнера. При получении достаточного количества фильтрата пипеткой Мора отбирают 3—5 мл раствора в маленький химический стакан, прибавляют 1—2 капли фенолфталеина и нейтрализуют 0,05 н. раствором КОН до слабо-розового окрашивания. Нейтрализованный фильтрат количественно переносят в адсорбционную трубку, заполненную оксидом алюминия. Вытяжку просасывают через колонку со скоростью одной капли в 2 с. Когда на поверхности адсорбента останется слой жидкости толщиной 2—3 мм, промывают колонку вначале 50 мл воды, насыщенной сероводородом, затем 50 мл обычной дистиллированной воды. Промывные воды выливают, приемник споласкивают и вновь присоединяют к колонке.

Глютаминовую кислоту элюируют, последовательно промывая колонку 55 мл 0,5 н. раствора CH_3COOH и 20 мл дистиллированной воды. Элюат, содержащий глютаминовую кислоту, количественно пере-

¹ Если исследуется жидкий продукт, то его высушивают в сушильном шкафу или растирают в ступке с безводным гидрофосфатом натрия марки «х. ч.», не содержащим азота. Затем сухую смесь количественно, смывая спиртом, переносят в фарфоровую чашку. Такое же количество Na_2HPO_4 вводят в контрольный опыт.

носят в колбу Кьельдаля (емкостью 150 мл) для сжигания. Приемник вновь присоединяют к адсорбционной колонке и элюируют оставшуюся в ней аспарагиновую кислоту 5 мл 3 н. раствора КОН и затем 40 мл 0,05 н. раствора КОН. Жидкость из колонки отсасывают до суха. Элюат, содержащий аспарагиновую кислоту, также количественно переносят в другую колбу Кьельдаля.

Элюаты сжигают с 3 мл химически чистой H_2SO_4 ($d = 1,84$ г/см³), 1 г K_2SO_4 и 1—2 кристалликами $CuSO_4$ (3—4 мг). Много K_2SO_4 добавлять не следует, так как при чрезмерном повышении температуры кипения H_2SO_4 образующийся $(NH_4)_2SO_4$ может разложиться и тем самым увеличить потери азота. После добавления H_2SO_4 осторожно выпаривают воду, при вспенивании добавляют (в охлажденную колбу) 1 мл этилового спирта. Сжигание вначале ведут на слабом пламени, после прекращения вспенивания нагрев усиливают. Минерализацию считают законченной, когда жидкость в колбе станет совершенно прозрачной.

Количество азота после сжигания элюатов определяют микрометодом, описанным ниже¹.

Параллельно ставят контрольный опыт для определения поправки на содержание азота в применяемых реактивах и в воде. В контрольном опыте все операции с адсорбцией повторяют, но вместо вытяжки берут такой же объем дистиллированной воды. Промывные воды так же, как и в опыте, не используют. При этом вносят поправку на реактивы, употребляемые для каждой дикарбоновой кислоты отдельно. Количество азота дикарбоновых кислот вычисляют по формуле

$$DK = \frac{v\varepsilon}{ag},$$

где DK — количество азота дикарбоновых кислот в 1 г исследуемого продукта, мг; a — объем отобранного фильтрата, пропускаемого через колонку; v — общий объем смеси воды с навеской, мл; g — навеска растительного материала, г; ε — количество азота, определенного в элюате, мг.

Умножая полученное число миллиграммов азота на 9,5, получают содержание аспарагиновой кислоты, а умножая на 10,505, — содержание глютаминовой кислоты. При необходимости содержание азота выражают в процентах или миллиграмм-процентах.

Пример расчета. Для анализа взято 2,5689 г растительного продукта. Через колонку пропустили 10 мл фильтрата. Общий объем воды с навеской (в мерной колбе) 50 мл. По Кьельдалю определили 2,5 мг азота глютаминовой кислоты. Таким образом, в 1 г исследуемого продукта азота будет:

$$\frac{50 \cdot 2,5}{10 \cdot 2,5689} = 4,87 \text{ мг.}$$

Глютаминовой кислоты в 1 г соответственно будет:

$$4,87 \cdot 10,505 = 51,2 \text{ мг,}$$

т. е. в исследуемом продукте содержится глютаминовой кислоты 5,12%. Так же рассчитывают и количество аспарагиновой кислоты.

¹ Аспарагиновую и глютаминовую кислоты в элюатах можно определять и колориметрически, используя для этого их реакцию с нингидрином.

Этот метод достаточно точен, его относительная ошибка равна приблизительно 5%. Применяя данную методику, можно разделить и количественно определить до 10 мг глютаминовой и столько же аспарагиновой кислоты.

Метод одномерной хроматографии на бумаге. Хроматография на бумаге является одним из модифицированных методов хроматографического анализа, предложенного М. С. Цветом.

С помощью бумажной распределительной хроматографии легко разделить аминокислоты и определить их в смеси. Этот метод основан на том, что органический растворитель, перемещаясь

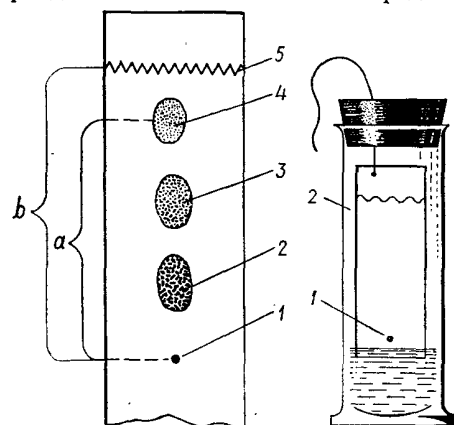


Рис. 6. Хроматограмма аминокислот на бумаге: 1 — место нанесения раствора; 2 — глютаминовая кислота; 3 — аланин; 4 — лейцин; 5 — фронт растворителя.

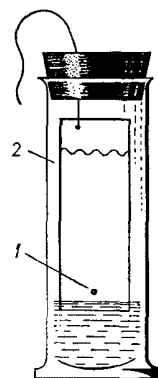


Рис. 7. Прибор для восходящей хроматографии: 1 — место нанесения раствора; 2 — фронт растворителя.

вдоль полос хроматографической (фильтровальной) бумаги, увлекает за собой растворенные в нем аминокислоты. Каждая аминокислота в своем движении достигает определенного уровня. Этот уровень характеризуется коэффициентом R_f , который является отношением расстояния от середины пятна до места нанесения раствора к состоянию расположения фронта растворителя, например, R_f лейцина равен $\frac{a}{b}$ (рис. 6). Бумага практически не адсорбирует аминокислот. В воздушно-сухом состоянии она содержит некоторое количество воды. Таким образом, есть две фазы для распределения аминокислот: одна — неподвижная (вода), другая — подвижная (органический растворитель). Фильтровальная бумага служит как бы водной колонкой, через которую проходит растворенная в органическом растворителе смесь аминокислот. Чем больше растворимость аминокислоты в органическом растворителе, тем ближе ее пятно подойдет к фронту растворителя и, наоборот, чем лучше она растворяется в воде, тем дальше ее пятно будет находиться от фронта растворителя.

Для хроматографии лабораторию оборудуют специальными хроматографическими камерами нужных размеров и форм. При эпизодическом определении аминокислот, в особенности с помощью одномерных хроматограмм, в лабораториях используют сосуды различной формы — цилиндры, эксикаторы, вегетационные сосуды, а для небольших хроматограмм — широкие пробирки. Все хроматографические камеры должны быть герметически закрыты.

Хроматографическую бумагу нарезают в виде полос так, чтобы волокна ее располагались вдоль полосы. Длина и ширина полос зависит от размеров хроматографической камеры и количества точек, наноси-

мых на стартовой линии. Полосы бумаги не должны прикасаться к стенкам камеры. Каждую полосу хроматографической бумаги подвешивают в камере так, чтобы один конец ее был погружен в растворитель.

На расстоянии 1—2 см от края бумаги проводят стартовую линию, на которой делают отметки длиной от 0,5 до 1 см на расстоянии 15—20 мм одна от другой. На бумагу, проводя капиллярами вдоль отметок, наносят капли разделяемых смесей.

При качественной хроматографии объем капли не имеет существенного значения. При количественной хроматографии нужно наносить исследуемую жидкость градуированным капилляром или микропипеткой емкостью 5—10 мкл. Нанесенные капли высушивают.

Если по условиям исследования необходимо идентифицировать разделяемые аминокислоты, то на стартовую линию хроматограммы наносят также «свидетелей» — искомую аминокислоту или смесь аминокислот известного состава, которые легко разделяются при хроматографировании. В качестве «свидетелей» применяют раствор 40 мг аланина, 50 мг лейцина и 60 мг глютаминовой кислоты в 10 мл воды или раствор 40 мг серина, 40 мг гликокола и 60 мг аспарагиновой кислоты в 10 мл воды.

Хорошим растворителем аминокислот является фенол, насыщенный водой. Для приготовления растворителя берут фенол и воду в соотношении 2 : 1. Раствор энергично перемешивают в делительной воронке и оставляют на 7—10 ч для расслоения. Нижний насыщенный водой слой фенола сливают в банку и используют в качестве растворителя.

При восходящей хроматограмме фенол наливают на дно сосуда или в кювету, установленную на дне камеры, а полоску бумаги подвешивают на специальной палочке или нитке в верхней части камеры так, чтобы нижний конец ее был погружен в фенол (рис. 7).

При нисходящей хроматограмме в кювету с растворителем, закрепленную в верхней части сосуда, опускают полоску бумаги, свешивая через борт кюветы вниз и закрепляя ее в таком положении, как на рис. 8.

Продолжительность хроматографирования различна. При небольшой длине полоски бумаги и малом числе компонентов (например, при работе в пробирках) хроматографирование может быть закончено за 1,5—2 ч, а при работе с большими сосудами и при большом количестве компонентов разделение длится 18—24 ч. Когда фронт растворителя продвигается достаточно далеко, разделение компонентов на хроматограмме считают законченным. Хроматограмму вынимают и высушивают 10—15 мин в сушильном шкафу при температуре 100° С.

Аминокислоты проявляют 0,1%-ным раствором нингидрина в спирте, для чего высушенную хроматограмму опрыскивают проявителем и помещают на 5—10 мин в сушильный шкаф при температуре 100° С.

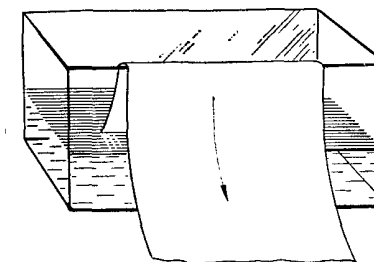


Рис. 8. Кювета для нисходящей хроматограммы.

Аминокислоты образуют с нингидрином окрашенные соединения и проявляются на бумаге в виде сине-фиолетовых пятен.

Для обнаружения аминокислот на хроматограммах помимо нингидрина могут быть использованы и другие характерные проявители. Так, гистидин и другие имидозольные производные можно обнаружить с помощью дезореакции по Паули (появляются красные пятна). Пролин и оксипролин обнаруживаются после обработки хроматограмм изотином (синие пятна). Оксипролин окрашивается в фиолетовый цвет реактивом Эрлиха (*n*-диметиламинобензальдегид) после предварительной обработки хроматограммы H_2O_2 . Серин и треонин можно обнаружить на хроматограммах при помощи раствора периодата, содержащего реактив Несслера (NH_3 , выделяющийся при реакции оксиаминокислот с периодатом, образует с реактивом Несслера соединение желтого цвета). Аргинин проявляется на хроматограмме в виде красных пятен после обработки ее щелочным раствором α -нафтола и опрыскивания раствором гипохлорита (реакция Сакагуши). Нитропруссидную реакцию можно применить для обнаружения цистеина и цистина. При опрыскивании хроматограмм нитропруссидом образуются красные пятна, которые вскоре исчезают: для фиксации пятен хроматограммы предварительно обрабатывают цианидом калия. Триптофан обнаруживается реактивом Эрлиха (диметиламинобензальдегидом) по пурпурной окраске после прогревания хроматограммы при $100^\circ C$ в течение нескольких минут. Таким образом можно идентифицировать аминокислоты на хроматограммах, используя цветные реакции, характерные для каждой аминокислоты. Для осуществления цветных реакций при идентификации аминокислот готовят специальные реактивы (см. Аналитические методы белковой химии. Под ред. В. Н. Ореховича. М., Изд-во иностр. лит., 1963, с. 478—482).

Хроматограммы опрыскивают в вытяжном шкафу, подвесив бумагу на рейку с помощью зажимов для белья. Пульверизатор рекомендуют держать на расстоянии 30—35 см от бумаги и медленно, равномерно перемещать слева направо, начиная с верхней части листа бумаги и вниз. Необходимо следить за тем, чтобы на бумагу не попало слишком много реактива, так как при этом пятна размазываются и смещаются.

Пятна аминокислот на хроматограммах можно обнаружить также, если поместить высушенную хроматограмму на влажный лист бумаги, пропитанный соответствующим реактивом.

Метод двумерной бумажной хроматографии. На одномерной хроматограмме, в одной системе растворителей, несколько аминокислот могут иметь одни и те же значения R_f . Поэтому при исследовании смеси многих аминокислот желательно использовать несколько различных систем растворителей.

Двумерным хроматографированием удается разделить почти все природные аминокислоты. При этом способе через хроматографическую бумагу пропускают два растворителя в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

После подбора растворителей составляют диаграмму: на оси абсцисс откладывают значение R_f для каждой аминокислоты в одном рас-

творителе, на оси ординат — в другом растворителе. Таким образом, на диаграмме получают относительное расположение всех исследуемых аминокислот. Чаще всего применяют системы фенол — вода — аммиак, а затем коллидин с последующим опрыскиванием нингидрином для выявления расположения аминокислот. При обработке нингидрином большинство аминокислот проявляется на хроматограммах в виде пурпурных пятен. Лейцин, валин, метионин и фенилаланин дают близкие пятна. Эти четыре аминокислоты можно разделить на двумерной хроматограмме, применив в качестве растворителя смесь *n*-бутанола и бензилового спирта (в соотношении 1 : 1) и коллидин. Для определения аминокислотного состава исследуемого образца готовят не менее двух различных двумерных хроматограмм.

Если вещество исследуется впервые, то предварительно опытным путем устанавливают величину необходимой навески. Далее на лист хроматографической (фильтровальной) бумаги (обычно 600×800 мм) наносят градуированной капиллярной пипеткой смесь аминокислот (точно 0,003—0,010 мл пробы, что соответствует 0,6—2 мг азотистых веществ).

Обычно готовят две хроматограммы, на одну из них наносят 0,003—0,005 мл исследуемого вещества, содержащего 0,6—1 мг азотистых веществ, на другую — 0,007—0,01 мл пробы, содержащей 1,4—2 мг азотистых веществ. Хроматограмму с меньшей навеской выдерживают в растворителе дольше обычного времени для более четкого разделения аминокислот с близким R_f . камерой для хроматографирования может служить стеклянный аквариум соответствующего размера или же специально изготовленная камера, которую насыщают парами воды и растворителя и герметически закрывают. Когда растворитель переместится на 350—450 мм, бумагу вынимают из камеры широкими щипцами (не прикасаясь к ней пальцами) и высушивают в сушильном шкафу при $100^\circ C$. Сухую бумагу поворачивают на 90° и ту часть, на которой распределились аминокислоты, опускают во второй растворитель, который желательно помещать в другую камеру. Когда он продвинется на 400—450 мм, бумагу вынимают из камеры, вторично высушивают уже на воздухе при комнатной температуре. Аминокислоты проявляют 0,5%-ным раствором нингидрина в насыщенном растворе *n*-бутанола в течение 5—10 мин при $100^\circ C$. Положение искомого аминокислот устанавливают по найденному R_f аминокислот.

Если положение какой-либо аминокислоты на двумерной хроматограмме вызывает сомнение, хроматограмму проявляют реактивами, специфическими для искомой аминокислоты, что позволяет более точно установить ее наличие.

Количественное хроматографическое определение аминокислот при разделении их на бумаге. Количество веществ, учитываемых в хроматографическом разделении, весьма мало, а количество аминокислот в каждом отдельном пятне на хроматограмме просто ничтожно. Естественно, для определения количества отдельных аминокислот при хроматографическом разделении их на бумаге нужно применять фотоэлектроколориметры и фотометры. Наиболее точно определяют количество аминокислот следующим способом: на проявленной нингидрином

хроматограмме обводят карандашом окрашенные пятна на расстоянии 3—5 мм от пятна, вырезают их, измельчают на мелкие кусочки и помещают в градуированную пробирку емкостью 5—10 мл, заполненную растворителем. Продолжительность экстрагирования слабоокрашенного пятна 0,5—1 ч, а интенсивно окрашенного — 2—3 ч. Содержимое пробирки доводят растворителем до метки и измеряют оптическую плотность раствора фотоэлектроколориметром. Содержание аминокислот находят по калибровочной кривой для данной аминокислоты.

Содержание аминокислот в пятнах хроматограмм можно также определять другим, сравнительно простым способом. Хроматограмму, проявленную нингидрином, обрабатывают раствором нитрата меди, при этом фиолетовая окраска переходит в алую вследствие образования комплекса меди, который экстрагируют спиртом. Оптическую плотность определяют в фотоэлектроколориметре. Количество аминокислот в исследуемом образце определяют по калибровочной кривой.

Растворы чистого препарата исследуемой аминокислоты с известной концентрацией наносят на хроматографическую бумагу так, чтобы получить ряд пятен, содержащих разные количества кислоты. Диапазон изменения количества аминокислоты должен охватывать ожидаемое содержание ее в исследуемом веществе. Затем проводят все операции по хроматографированию, проявлению, экстракции и колориметрированию исследуемой аминокислоты. На основании полученных данных строят кривую зависимости между количеством кислоты и изменением оптических свойств ее растворов, окрашенных проявителем.

Полученную калибровочную кривую используют для определения количества аминокислоты в исследуемом продукте. Точность фотоэлектроколориметрического определения количества аминокислот составляет 5—10%. Количество аминокислот можно также определить денситометром с последующим измерением площади кривых планиметром.

Анализ аминокислот с помощью электрофореза

Электрофорезом называется процесс передвижения заряженных частиц в поле постоянного электрического тока. Разница в скоростях движения заряженных частиц к катоду и аноду дает возможность разделить сложные смеси органических веществ.

Передвижение аминокислот и белков к катоду или к аноду зависит от pH среды, в которой происходит электрофорез. В кислой среде молекулы проявляют себя как катионы и движутся к отрицательному полюсу — катоду, в щелочной среде они имеют отрицательный заряд и движутся к аноду.

Для осуществления электрофореза имеется большое количество приборов различной конструкции.

Примерная схема прибора для электрофореза на бумаге (рис. 9). Прибор состоит из двух кювет 1, выпрямителя, стабилизатора тока и двух угольных электродов 2. Каждая кювета разделена продольной

перегородкой 3 на две части. В наружное отделение погружают электроды, а во внутренние — концы полоски хроматографической бумаги 4 с исследуемым веществом.

Кюветы разделяют перегородками, чтобы предохранить бумажную полоску от изменения pH среды, которое может наступить вокруг электродов. Таким образом, перегородки предохраняют от непосредственного влияния электродов на бумагу. В отдельных конструкциях рекомендуют электроды для изоляции помещать в специальные трубки с отверстиями для прохождения буферного раствора.

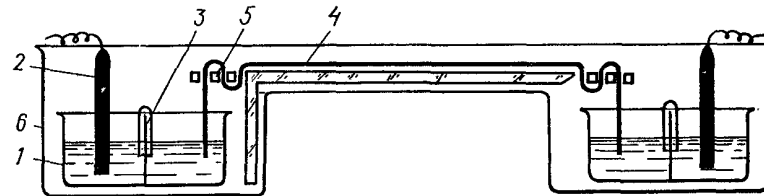


Рис. 9. Схема прибора для электрофореза.

Электрическая связь между отделениями осуществляется полосками хроматографической бумаги, перекинутыми из одной кюветы в другую и закрепленными в лабиринтах 5. Кюветы закрываются общей крышкой для предохранения испарения жидкости. В камере 6 должна поддерживаться определенная влажность.

Методика опыта. В кюветы наливают требуемый буферный раствор. Жидкость кювет приводят к одинаковому уровню сифоном, наполненным буферным раствором. На перекладину кладут полоски хроматографической бумаги для установления электрической связи между кюветами. В камеру укладывают обычно до 6 полос бумаги. Полосы должны лежать горизонтально и не провисать (для регулирования используется пружина). Полосы бумаги берут чистым пинцетом или руками в резиновых перчатках. Размеры бумажных полос обычно $2,0 \times 2,5$.

На каждой полосе в центре проводят простым карандашом поперечную линию. Вдоль проведенной линии наносят при помощи микропипетки 0,02 мл испытуемого раствора.

Камеру для электрофореза закрывают крышкой, а электроды присоединяют к выпрямителю и стабилизатору тока. Выпрямитель подключают к электросети и постепенно увеличивают напряжение.

По окончании электрофореза электрофореграммы вынимают чистым пинцетом, с концов, погружаемых в буферный раствор, удаляют избыток жидкости фильтровальной бумагой.

Полосы сушат в сушильном шкафу при температуре $100-105^\circ \text{C}$ в течение 15—20 мин, а затем опрыскивают тем или иным проявителем в зависимости от исследуемого образца, применяя характерную для него цветную реакцию.

Количество вещества на электрофореграммах определяют так же, как и на хроматограммах: колориметрически с помощью ФЭКа или же денситометром с вычислением площади планиметром.

Определение аспарагиновой и глутаминовой кислот методом электрофореза на бумаге (по модификации М. И. Барабанова и И. М. Литвака). Сравнительно простой метод определения аспарагиновой и глутаминовой кислот в растительных продуктах при помощи электрофореза на бумаге разработали Ф. Шнайдер, К. Рейфельд, Х. Грове и др.

Настоящий метод был модифицирован М. И. Барабановым и И. М. Литваком применительно к мелассе сахарных заводов, однако его можно применять и в других случаях. При этом значительно ускоряется распределение аминокислот на хроматографической бумаге.

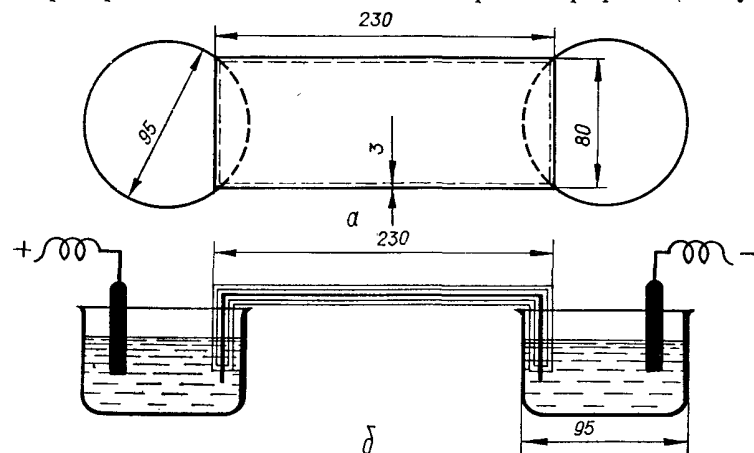


Рис. 10. Схема прибора для электрофореза:
а — вид сверху; б — вид сбоку;

Благодаря простому устройству (рис. 10) камера может быть смонтирована в обычных лабораторных условиях. Прибор состоит из двух стеклянных сосудов, между которыми помещают хроматографическую камеру в виде *n*-образно изогнутых двух стеклянных крышек длиной 280 мм. Концы полос опускают в буферный раствор. Одинаковый уровень буферного раствора в сосудах устанавливают сифоном. Полоску хроматографической бумаги закладывают между двумя стеклянными крышками, глубина которых около 2—3 мм. Таким образом, бумага находится во влажной камере и изолирована от непосредственного влияния электродов. Бумага не касается стенок камеры. Продольные края бумаги зажимаются бортиками крышек; концы бумаги погружены на 15—20 мм в сосуды с буферным раствором. В сосуды опускают два угольных электрода — катод и анод. Ток в прибор подают силой 2—4 мА при напряжении 270—300 В.

Приготовление ацетатного буфера с $pH=3,8$. Смешивают 1760 мл 0,5 н. раствора CH_3COOH и 240 мл 0,5 н. раствора ацетата натрия. Проверяют pH буфера иономером или потенциометром.

Методика опыта. На технохимических весах взвешивают три навески патоки, каждая по 25 г, с точностью до 0,01 г, затем помещают их в колбы Эрленмейера емкостью 300 мл, приливают по 100 мл 8 н. раствора HCl и перемешивают. Колбы вместе с содержимым взвешива-

ют, закрывают пробками с обратным холодильником и ставят на 8 ч в кипящую баню. После гидролиза пиррилизонкарбоновой кислоты содержимое колб охлаждают под краном и доводят дистиллированной водой раствор до начальной массы. Гидролизат фильтруют через складчатый фильтр, чтобы отделить осадок гуминовых веществ.

Берут полоску фильтровальной бумаги размером 70×320 мм, простым карандашом проводят вдоль нее прямую, разделяющую полосу на две части. Поперек бумаги на расстоянии 140 мм от анода и 180 мм от катода также проводят линию. На эту линию микропипеткой наносят две пробы фильтрата по 7,5—10 мкл в виде двух симметричных полосок на каждую половину листа. После нанесения проб бумагу высушивают на воздухе, оставив ее на ночь на лабораторном столе (для испарения соляной кислоты). Затем ее смачивают с обоих концов буферным раствором с $pH = 3,8$, оставив сухим лишь место нанесения пробы (в дальнейшем этот участок смачивается раствором вследствие капиллярности бумаги). Бумагу помещают в камеру электрофоретического аппарата так, чтобы края ее не выступали за пределы камеры, а были зажаты между стеклянными кромками. Стеклокромки должны плотно прилегать одна к другой; этим предотвращается высыхание бумаги. Бумага в рабочей части камеры не должна касаться стекла. Концы камеры погружают на 15—20 мм в буферный раствор.

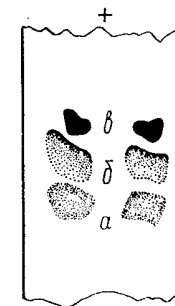


Рис. 11. Электрофореграмма аминокислот:
а — нейтральные аминокислоты; б — глутаминовая кислота; в — аспарагиновая кислота.

Электрофорез ведут 2 ч. Аминокислоты на бумаге распределяются в следующем порядке: дикарбоновые кислоты передвигаются к аноду (при этом аспарагиновая кислота передвигается быстрее, чем глутаминовая), нейтральные и щелочные аминокислоты (моноаминомонокарбоновые и диаминомонокарбоновые) — к катоду.

По окончании электрофореза электрофореграмму в течение 5 мин высушивают в сушильном шкафу при $90-100^\circ C$. Бумага должна быть слегка влажной, иначе пятна получаются не достаточно четкие. При пересушивании бумага желтеет и пятна слабо окрашиваются.

Высушенную электрофореграмму осторожно, избегая затеков, опрыскивают из пульверизатора 0,1%-ным раствором нингидрина в *n*-бутаноле, насыщенном водой. Электрофореграмму снова высушивают в сушильном шкафу до появления лилово-фиолетовых пятен (рис. 11). Пересушивать электрофореграмму нельзя, так как при этом происходит обесцвечивание пятен.

Пятна очерчивают простым карандашом, несколько захватив чистое поле фильтровальной бумаги. Очерченные участки вырезают и помещают в градуированные пробирки емкостью 10 мл. Затем в них добавляют 3 мл 0,1%-ного раствора нингидрина в *n*-бутаноле, насыщенном водой, и кипятят в водяной бане 10 мин для элюирования глутаминовой кислоты. Раствор охлаждают, доводят до 10 мл этиловым спиртом, а затем колориметрируют в фотоэлектроколориметре ФЭК-М. Параллельно проводят контрольный опыт без аминокислот.

Как показали исследования, интенсивность окраски растворов соответствует закону Ламберта — Бера, пользуясь которым авторы метода для глютаминовой кислоты установили, что

$$g = 0,24D,$$

где g — количество глютаминовой кислоты, мг; D — оптическая плотность цветного раствора в бутаноле и ацетоне при длине кюветы 20 мм (ее определяют фотозлектроколориметром при зеленом светофильтре). Количество глютаминовой кислоты (в мг%) вычисляют по формуле

$$ГК = \frac{100 \cdot 125}{v \cdot 25},$$

где v — количество гидролизата, наносимого на электрофореграмму, мкл; 125 — масса гидролизата, г. Относительная ошибка определения содержания глютаминовой кислоты в продукте этим методом составляет 5—10%.

Кроме приведенных методов в лабораторной практике применяют микробиологические методы определения различных аминокислот. Эти методы основаны на изменении интенсивности развития определенных видов микроорганизмов в зависимости от количества аминокислот в исследуемой среде.

БЕЛКИ

Белками называются специфические высокомолекулярные органические азотистые соединения, находящиеся в растительных, животных и бактериальных организмах в коллоидном состоянии.

Молекулы белков построены из 20—22 остатков в основном α -аминокислот, связанных пептидной связью в полипептидные звенья, которые в свою очередь могут быть соединены между собой дисульфидными, водородными, пиро- и ортофосфорными, фосфоамидными связями, солевыми мостами и другими связями.

Название «белок» было дано веществу птичьих яиц, свертывающемуся при нагревании в белую массу. Позднее этот термин был распространен и на другие подобные вещества, выделенные из различных животных и растительных тканей и клеток.

Это название не отвечает многочисленным функциям, которые выполняются белками. Для белков характерно многообразие физических и химических превращений. Бесконечное разнообразие структуры белков является отражением эволюционного развития живых существ. Жизненная роль белков связана с повсеместным нахождением их в природе: в глубинах морей и океанов, в недрах Земли, в пластах каменного угля, в атмосфере и стратосфере. В. И. Вернадский в своих исследованиях показал, что белки принимают участие в жизни Земли, являются важнейшими веществами в преобразовании нашей планеты. Достаточно отметить, что при участии только 20 разных аминокислот может образоваться 10^{1300} различных белков, однако и это не предел.

В 1927 г. Международная комиссия по реформе биолого-химической номенклатуры предложила более широкое название белков — протиды (от греч. *protos* — первый). Однако исторически сложившееся привычное название «белки» очевидно нет смысла изменять.

Белки являются самыми сложными соединениями, их молекулярная масса может достигать нескольких миллионов. Наименьшая молекулярная масса белка около 10 000.

Белки кроме углерода, водорода и кислорода содержат азот; почти во всех белках есть сера, а в некоторых и фосфор.

Белки являются основным материалом протоплазмы клеток. Белки в живых организмах обладают каталитическими свойствами, осуществляющими характерные обменные процессы.

Молекула белка является амфотерным соединением, т. е. содержит карбоксильные (кислотные) и аминные (основные) группы.

Белковая молекула очень лабильна, легко денатурирует, в результате чего изменяются ее биологические и физико-химические свойства. Под действием ферментов, а также кислот белки расщепляются, образуя ряд промежуточных продуктов дезагрегации (протеозы, пептоны, пептиды) и конечные продукты гидролиза — аминокислоты.

Белки разделяют на две большие группы: простые белки — протеины и сложные — протеиды. Простые белки не содержат небелковых групп, они в основном состоят из аминокислот. Сложные белки содержат, кроме собственно белка, еще и небелковую (простетическую) группу. К простым белкам относятся альбумины, глобулины, проламины, глютелины, протамины, гистоны и протеиноды. Больше всего альбуминов — в зеленых частях растений. Глобулины являются самой распространенной группой природных тел. В растениях глобулины встречаются в основном как отложения в семенах. Глобулины в отличие от альбуминов нерастворимы в воде. В семенах пшеницы и ржи из проламинов содержится глиадин, в семенах ячменя — гордеин. В семенах злаковых и в зеленых частях растений наряду с другими белками есть глютелины. Глиадин и глютеин составляют белки клейковины.

К сложным белкам относятся хромопротеиды (соединения белка с пигментами), нуклеопротеиды, простетической частью которых являются нуклеиновые кислоты, фосфопротеиды (белки, содержащие фосфор), глюкопротеиды (соединения белка со сложными углеводами), липопротеиды (белки, соединенные с жироподобными веществами) и металлопротеиды (белки, соединенные с металлами).

В хромопротеиды входят такие жизненно важные, близкие по химической структуре вещества, как хлорофилл и гем. В зародышах семян и в ядерном веществе клеток много нуклеопротеидов. Они обладают высокой специфичностью, участвуют в синтезе белка, в передаче наследственности и в ряде других важных жизненных функций растительных и животных организмов. В этих процессах большую роль играют нуклеиновые кислоты, которых, полагают, в природе не меньше, чем индивидуальных белков.

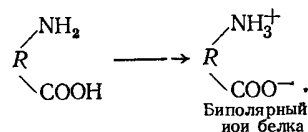
Нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, состоящие из различных связанных между собой мононуклеотидов,

которые в свою очередь состоят из пуриновых и пиримидиновых оснований, рибозы, дезоксирибозы и фосфорной кислоты. К мононуклеотидам относится аденозинмонофосфат, играющий большую роль в обмене веществ, в дыхании и брожении. Аденозинмонофосфат (адениловая кислота), сокращенно АМФ, может присоединять к своему радикалу один или два остатка фосфорной кислоты, образуя при этом аденозиндифосфат (АДФ) или аденозинтрифосфат (АТФ). В макроэргических связях этих соединений аккумулируется большое количество энергии, используемой в реакциях биосинтеза и в процессах дыхания и брожения.

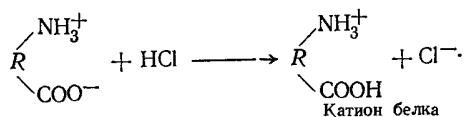
АТФ синтезируется в митохондриях клетки, которые образно называют «кочегарками клеток». Белки дают ряд характерных реакций, которые используются для их распознавания.

Некоторые свойства белков

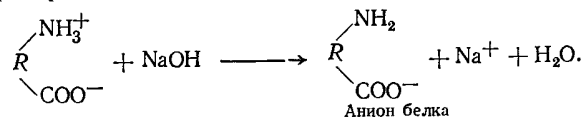
Определение изоэлектрической точки белка. Белки являются амфотерными электролитами, т. е. они могут диссоциировать как кислоты и как основания. Часть молекул белка в воде находится в ионизированной форме, в виде биполярных ионов (амфионов). Ионы H^+ (протоны), освобождающиеся в результате диссоциации кислотной группы, присоединяются к NH_2 -группе, и таким образом молекула белка переходит в ионизированную форму:



При добавлении к раствору белка разбавленной кислоты его молекулы перезаряжаются в результате подавления диссоциации кислотных групп, т. е. молекулы белка получают положительные заряды и превращаются в катионы:



При добавлении к раствору белка щелочи его молекулы соответственно перезаряжаются, превращаясь в анионы:



Изменяя реакцию среды, можно менять заряд белка; при определенном рН заряд белка будет равен нулю. Такое состояние белка (равенство кислотной и основной диссоциаций) называется изоэлектрической точкой, которая является константой для белка.

В изоэлектрической точке раствор белка неустойчив: белок теряет один из факторов стабилизации — заряд. В этом случае прекращается отталкивание одноименно заряженных молекул, повышающее устойчивость коллоидного раствора. В качестве стабилизирующего фактора действует лишь гидратация (гидросфера, т. е. водная оболочка) белка.

Каждый белок имеет изоэлектрическую точку при характерном для него рН среды. Для большинства белков изоэлектрическая точка наступает в слегка кислой (почти нейтральной) среде. Такой сдвиг кислотности объясняется тем, что в большинстве белков кислотные свойства преобладают над щелочными и при $pH = 7,0$ в них больше свободных карбоксильных групп, чем щелочных. Однако часть белков содержит больше аминных, чем карбоксильных групп, т. е. в белках больше диаминомонокрбонных кислот. Поэтому такие белки при $pH = 7,0$ ведут себя как слабые основания. К ним относятся гистоны и протамины. Изоэлектрическая точка у гистонов и протаминов наступает при слабощелочной реакции.

Методика опыта. Это определение требует особой тщательности в приготовлении реактивов. Реагенты необходимо добавлять с соблюдением высокой точности, пользуясь микропипеткой. Отклонения от методики приводят к грубым искажениям результатов.

В шесть пробирок наливают по 1 мл испытуемого раствора белка (например, 1%-ный раствор желатина) и по 0,1 мл 0,1 н. раствора CH_3COONa , в каждой пробирке создают разную реакцию среды, добавляя 0,1 н. раствор уксусной кислоты (табл. 1). Потом прибавляют вещество, обладающее большей гидрофильностью, чем белок (обычно этиловый спирт).

Содержимое пробирок взбалтывают, а затем в четвертую пробирку медленно при помешивании добавляют из пипетки 90%-ный раствор этилового спирта, пока не появится едва заметная, некоторое время не исчезающая муть.

Если муть исчезает, то количество добавляемого спирта следует увеличить. Такой же объем спирта, который добавлен в четвертую пробирку, добавляют в другие пробирки. После 30-минутного отстаивания отмечают пробирку с максимальным помутнением. рН содержимого этой пробирки будет соответствовать изоэлектрической точке исследуемого белка.

С целью повышения точности определения применяют потенциометрическое титрование, используя рН-метр. Отмеряют 5 мл испытуемого раствора, добавляют 5 мл 0,1 н. раствора CH_3COONa и 5 мл 95—96%-ного раствора этилового спирта. Титруют 0,1 н. раствором CH_3COOH до появления осадка белка, и рН, при котором появился осадок, считают изоэлектрической точкой (константой) белка.

Таблица 1. Шкала для определения изоэлектрической точки белка

Номер пробирки	рН смеси	Раствор уксусной кислоты, мл		Ди-стальли-рованная вода, мл
		0,1 н.	1 н.	
1	5,6	0,125	—	1,875
2	5,3	0,25	—	1,75
3	5,0	0,5	—	1,50
4	4,7	1,0	—	1,0
5	4,4	2,0	—	—
6	4,1	—	0,4	1,6

Изменение белков при нагревании. Почти все белки при нагревании коагулируют. Большинство белков свертывается при 50—55° С. При продолжительном нагревании белки денатурируют и переходят в нерастворимое состояние. Кратковременное же нагревание может не привести к свертыванию. Реакция денатурации белка протекает постепенно и ускоряется с повышением температуры. Тепловая денатурация белка связана с изменениями в его молекуле, в результате чего он теряет свои нативные (природные) свойства и растворимость. Быстрее всего белки свертываются и осаждаются в изoeлектрической точке.

Устойчивость белковых мицелл наблюдается в сильноокислых или щелочных растворах, так как в этих условиях молекулы положительно или отрицательно заряжены и поэтому не выпадают в осадок при нагревании. В сильноокислых растворах белки могут коагулировать только при нагревании и добавлении к ним достаточного количества той или иной нейтральной соли. Для изучения этих свойств белка проводят следующий опыт.

Методика опыта. В пять пробирок наливают приблизительно по 2 мл белковой вытяжки. Содержимое первой пробирки нагревают и наблюдают, через какой промежуток времени образуется осадок. Во вторую пробирку добавляют каплю 1%-ного раствора CH_3COOH и также нагревают. В этой пробирке осадок выпадает быстрее; он более обильный, чем в первой, так как белок во второй пробирке находится ближе к изoeлектрической точке, чем в первой. В третью пробирку добавляют 0,5 мл 10%-ного раствора CH_3COOH и нагревают. В данном случае осадок белка не образуется не только при нагревании, но даже при кипячении. Это объясняется тем, что белок сильно заряжен, его мицеллы несут положительный заряд (являются катионами). Одновременно заряженные молекулы отталкиваются одна от другой, что стабилизирует раствор.

В четвертую пробирку, так же как и в третью, добавляют 0,5 мл 10%-ного раствора CH_3COOH и несколько капель насыщенного раствора NaCl . При нагревании образуется осадок. Выпадение осадка в этом случае связано с тем, что добавляемый хлорид натрия, как и другие соли щелочных и щелочноземельных металлов, адсорбируется на белковых частицах, делая их электронейтральными (снимая заряд) и понижая их устойчивость в растворе. Кроме того, при достаточной концентрации солей происходит дегидратация белковых мицелл.

В пятую пробирку прибавляют 0,5 мл 10%-ного раствора NaOH . Осадок при этом не образуется не только при нагревании, но и при кипячении: белок заряжен отрицательно, его мицеллы являются анионами. Таким образом, ни катионы, ни анионы белка при нагревании и кипячении в осадок не выпадают.

Осаждение белков трихлоруксусной и сульфосалициловой кислотами. Белки осаждают трихлоруксусной кислотой CCl_3COOH , если необходимо получить кислый фильтрат, чтобы удержать в растворе ионы Ca^{2+} или PO_4^{3-} . Преимущество этого метода в том, что трихлоруксусная кислота легко устранивается из фильтрата кипячением. Осаж-

дение белков трихлоруксусной кислотой применяют для полного удаления их из раствора; при этом продукты распада белков (пептоны, аминокислоты, аммиак, мочевина и др.) не осаждаются. Аналогичными свойствами в отношении белков обладает сульфосалициловая кислота.

Методика опыта. В пробирку наливают 1—2 мл раствора белковой вытяжки и добавляют несколько капель 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. В результате этого выпадает осадок. В другой пробирке белок осаждают 20%-ным раствором сульфосалициловой кислоты при тех же условиях.

Осаждение белков минеральными кислотами. Концентрированные минеральные кислоты, за исключением H_3PO_4 , осаждают белки. Осаждение белков в этом случае объясняется дегидратацией белковых молекул, образованием солей в белке и др.

При добавлении избытка кислот (исключение составляет азотная кислота) происходит растворение выпавшего осадка, что, очевидно, связано с частичным разложением белка и перезарядкой его частиц.

Методика опыта. В три пробирки осторожно наливают по 1 мл концентрированной минеральной кислоты: в I — H_2SO_4 , во II — HCl и в III — HNO_3 . К кислотам осторожно по стенке пробирки приливают по 1 мл раствора белка. На границе двух жидкостей появляется осадок белка в виде небольшого кольца.

Пробирки осторожно встряхивают и наблюдают исчезновение осадка в избытке кислоты. В HNO_3 осадок не растворяется.

Высаливание белков. Осаждение белков из растворов солями называется высаливанием. Принцип высаливания заключается в следующем. Молекула белка удерживается в растворе вследствие действия на нее стабилизирующих факторов: электрического заряда и водной оболочки (гидросферы). Ионы щелочных и щелочноземельных металлов несут заряд, противоположный заряду белковой мицеллы, и обладают большей гидрофильностью, чем белок. Поэтому при добавлении соответствующего количества солей в раствор белка он осаждается. При уменьшении количества солей в растворе, что достигается диализом или разбавлением водой, белки могут вновь перейти в раствор.

Для высаливания различных белков требуются разные количества одних и тех же солей. Это позволяет высаливать белки по фракциям и таким образом разделять их. В изoeлектрической точке белки выпадают из растворов в осадок при более низких концентрациях солей, так как в этом случае соль удаляет только один фактор стабилизации — гидросферу.

Осаждение белков NaCl и MgSO_4 . Хлорид натрия и сульфат магния в отличие от сульфата аммония осаждают глобулины из насыщенного раствора. В изoeлектрической точке глобулины эти же солями осаждаются при более низкой концентрации.

Методика опыта. В две пробирки наливают по 5 мл раствора белковой вытяжки. В одну из них добавляют порошок NaCl , в другую — MgSO_4 до полного насыщения раствора, т. е. до прекращения растворения солей. В обеих пробирках появляется осадок глобулинов, которые отфильтровывают или отделяют центрифугированием. Фильтрат (или

центрифугат) испытывают на содержание белков при помощи биуретовой реакции. Если реакция положительная, то в фильтрате содержатся альбумины, которые в нейтральных растворах солей NaCl и MgSO₄ в осадок не выпадают. При добавлении к фильтрату (или центрифугату) нескольких капель 1%-ного раствора уксусной кислоты альбумины также выпадают в осадок. Альбумины отфильтровывают или отделяют центрифугированием, а фильтрат (или центрифугат) снова исследуют на содержание в нем белков при помощи биуретовой реакции.

Осаждение белков алкалоидными реактивами. В белки и алкалоиды входят следующие азотистые группировки: пирролидиновая, имидазольная, пуриновая, пиридиновая, индольная и др.



Эти азотистые группировки обуславливают способность белков и алкалоидов осаждаться так называемыми алкалоидными реактивами: K₄[Fe(CN)₆] растворами HgI₂ и BiI₃ в растворе KI, а также некоторыми другими веществами. Осаждение происходит в результате образования нерастворимых солеобразных соединений с основными азотистыми группировками белков. Белок осаждается в кислой среде, так как алкалоидные реактивы являются анионами, т. е. несут заряд, противоположный заряду белка (катиона). В щелочной среде мицеллы белка перезаряжаются и осадок белка растворяется. Многие из этих реакций весьма чувствительны. Так, танин в слабых кислотах растворов осаждает белки в разбавлении 1 к 100 000, желтая кровяная соль и сульфосалициловая кислота — в разбавлении 1 к 50 000.

Приготовление некоторых реактивов. Раствор HgI₂ в растворе KI — в мерной колбе емкостью 1 л растворяют 5 г KI в 50 мл дистиллированной воды и насыщают полученный раствор 12 г HgI₂, затем содержимое колбы доводят водой до метки.

Методика опыта. В четыре пробирки наливают по 2 мл белковой вытяжки из муки. В три пробирки добавляют по 3 капли 1%-ного раствора CH₃COOH для подкисления. В одну пробирку добавляют 3 капли насыщенного раствора танина, в другую — 6 капель насыщенного раствора пикриновой кислоты, в третью — 2 капли раствора HgI₂ в растворе KI. Наблюдают выпадение осадка. В четвертую пробирку для подкисления прибавляют 3 капли 10%-ного раствора CH₃COOH и 3 капли 5%-ного раствора K₄[Fe(CN)₆], после добавления каждой капли раствор перемешивают и наблюдают выпадение осадка.

Осаждение белков солями тяжелых металлов. С солями тяжелых металлов (ртути, серебра, свинца, меди и др.) белки образуют металлоорганические соединения, нерастворимые в воде. Чтобы осадить белки солями тяжелых металлов в отличие от высаливания белков солями щелочных и щелочноземельных

металлов, требуются небольшие количества солей. Избыток таких солей, как (CH₃COO)₂Pb и PbSO₄ вызывает растворение выпавшего осадка, поскольку избыток ионов металла перезаряжает белковый комплекс. То же самое происходит при добавлении NaCl к осадку ртутного соединения белка.

Белковые осадки, полученные при действии солей тяжелых металлов, нерастворимы в первоначальном растворителе (в воде и слабых растворах солей), т. е. реакция необратима. Соли тяжелых металлов полностью осаждают и денатурируют белки. Этими реакциями пользуются для освобождения растворов от белков. Соли тяжелых металлов одновременно с белками осаждают и другие азотистые вещества. Доказано, например, что ряд аминокислот (лейцин, фенилаланин, метионин, триптофан, цистеин) образуют с медью труднорастворимые соли.

Методика опыта. В четыре пробирки наливают по 2 мл белковой вытяжки из муки и по каплям прибавляют растворы: в первую пробирку сулемы (яд!), во вторую — CuSO₄, в третью — AgNO₃, в четвертую — (CH₃COO)₂Pb. После добавления реактивов наблюдают за образованием осадков. В пробирки с осадками, полученными под действием (CH₃COO)₂Pb и CuSO₄, добавляют избыток этих солей. Осадки растворяются. В пробирку с осадком, полученным от прибавления сулемы, добавляют 7—10 капель насыщенного раствора NaCl. Осадок растворяется.

Осаждение белков вольфраматом натрия. Более полно осаждают белки вольфрамат натрия Na₂WO₄, фосфорновольфрамовая и фосфорномолибденовая кислоты. Они осаждают белки в присутствии минеральных кислот. Так, в большинстве лабораторий для отделения белка от продуктов его распада (небелкового азота) пользуются Na₂WO₄.

Методика опыта. В пробирку наливают 3 мл вытяжки из муки или другого растительного материала, 0,5 мл 1 н. раствора HCl (для подкисления) и несколько капель 10%-ного раствора Na₂WO₄. Выпадает осадок. В белках определяют связанные в них аминокислоты, применяя цветные реакции.

Исследование аминокислотного состава белков. Определение аминокислотного состава белков обычными химическими методами, их разделение в виде солей, сложных эфиров и других соединений — одна из самых трудоемких и сложных работ. Применение хроматографического анализа позволяет значительно облегчить и упростить определение аминокислотного состава белков.

Хроматографическое разделение аминокислот осуществляется при помощи различных адсорбентов: активированного угля, оксида титана, силикагеля, ионообменных смол и др. В последнее время широко применяют метод распределительной хроматографии на бумаге.

Методика опыта. Взвешенную на микровесах навеску (8—10 мг) белка помещают в капилляр и добавляют к нему 0,3 мл 6 н. раствора HCl. Капилляр заплавляют и нагревают в кипящей водяной бане в течение 24 ч. После гидролиза содержимое капилляра количественно переносят в маленький фарфоровый тигелек емкостью около 2 мл и

выпаривают на водяной бане досуха, затем добавляют две-три капли дистиллированной воды и выпаривание повторяют (три раза для полного удаления соляной кислоты). Если гидролизат темный (богатый гуминовыми веществами), то его фильтруют через капилляр пастеровской пипетки, вкладывая в кончик капилляра вату. Тигелек промывают и промывные воды фильтруют. Фильтрат собирают в другой тигелек и выпаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 0,05 мл дистиллированной воды, откуда капилляром отбирают строго известную часть раствора и наносят его на бумагу. Оставшийся в тигельке гидролизат выпаривают и хранят в сухом виде для повторения анализа.

Количество гидролизата, наносимого на хроматограмму, зависит от содержания аминокислот в белке. Если в белке много аминокислот, то берут меньший объем гидролизата; при меньшем содержании аминокислот берут больший объем гидролизата. В первом случае во взятом объеме гидролизата должно содержаться 0,6—1 мг белка, а во втором — 1,4—2 мг.

Дальнейший ход хроматографирования подобен хроматографированию при анализе аминокислот.

Разделение и очистка белков

Фракционирование белков $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Способ основан на разном осаждении глобулинов и альбуминов $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Методика опыта. В пробирку наливают 5 мл белковой вытяжки из муки и 5 мл насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Перемешивают и оставляют на 5 мин; за это время выпадает осадок глобулина. Глобулин отделяют центрифугированием при 2500 об/мин в течение 30 мин. Центрифугат, содержащий альбумин, насыщают порошком $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до тех пор, пока не прекратится его растворение. Из насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ альбумин выпадает в осадок, который отделяют центрифугированием при 2500 об/мин в течение 15 мин. Прозрачный центрифугат испытывают на присутствие белков с помощью биуретовой реакции; отрицательная реакция показывает полноту осаждения белков.

Очистка белков диализом. Диализом называется освобождение коллоидного раствора, в данном случае белка, от примесей низкомолекулярных соединений (солей) при помощи диффузии и через непроницаемые для коллоидов мембраны. Для диализа применяют животные и растительные мембраны. Обычно диализ проводят в коллоидных мешочках или в цилиндре 1 (рис. 12), в котором вместо дна натянут пергамент или целлофан 2, промытый в дистиллированной воде. Диализ проводят при температуре 0—2° С; при более высокой температуре белковые растворы подвергаются различным изменениям. Цилиндр подвешивают на нитках 3 в сосуд 4 с дистиллированной водой. Кроме того, готовят 10%-ный раствор BaCl_2 .

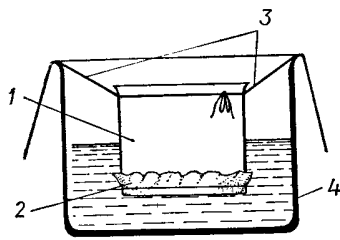


Рис. 12. Прибор для диализа.

Методика опыта. Полученный осадок глобулина после фракционирования белка переносят в цилиндр 1, заполненный 10 мл дистиллированной воды. Примерно через 1—2 ч из сосуда 4 отбирают в пробирку 2—3 мл воды и добавляют несколько капель 10%-ного раствора BaCl_2 . Появление осадка указывает, что через пергамент проходит $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Диализ обычно ведут в течение суток в холодном помещении (от 0 до +2° С), сменяя несколько раз воду. Отсутствие осадка при добавлении раствора BaCl_2 свидетельствует об окончании диализа. Белок, очищенный диализом, высушивают в вакуум-эксикаторе над H_2SO_4 . В сухом виде препарат хорошо сохраняется.

Очистка белков кристаллизацией и лиофилизацией. Условия кристаллизации белка обычно подбирают эмпирически, учитывая при этом рН, концентрацию белка в растворе и температуру кристаллизации.

При кристаллизации используют предварительное фракционирование и диализ для очистки белка от соли. Для получения требуемой чистоты препарата белок несколько раз перекристаллизовывают.

Кроме кристаллизации белки можно очищать методом лиофилизации. Раствор белка замораживают при помощи смеси сухого льда с ацетоном и помещают в вакуум, где растворитель испаряется. Большинство белков при лиофильной сушке не денатурируют и длительное время сохраняются в сухом состоянии на холоду.

В процессе лиофилизации необходимо избегать вспенивания, так как большинство белков денатурирует на поверхности раздела жидкость — газ.

Методика опыта (кристаллизация альбумина). Источником получения альбумина обычно служит белок куриного яйца. В 10 свежих куриных яйцах тщательно отделяют белок от желтка и к выделенному белку добавляют равный объем насыщенного $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Выпадает осадок глобулина, который отделяют в центрифуге при 2500 об/мин. Центрифугат осторожно сливают на складчатый фильтр или в воронку Бюхнера и отсасывают его. При температуре 20° С отмеряют определенный объем фильтрата и добавляют к нему тонко измельченный $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ из расчета 8,5 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на 100 мл фильтрата. При этом выпадает желтовато-розовый осадок альбумина, который отфильтровывают на воронке Бюхнера или через складчатый фильтр. Отфильтрованный осадок альбумина растворяют (стакан погружают в ледяную воду) в возможно меньшем количестве воды. В раствор добавляют по каплям (при помешивании) 5%-ный раствор CH_3COOH до рН = 4,7 (проверяют иономером). Раствор отфильтровывают, чтобы исчезла муть. К фильтрату добавляют большими порциями насыщенный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (при встряхивании) до появления так называемой муаровой мути. При температуре от 0 до 2° С через 1—2 суток образуются игольчатые кристаллы альбумина. Кристаллический альбумин следует хранить в растворе с 2—3 каплями толуола, который применяют в качестве антисептика.

Для дальнейшей очистки кристаллы альбумина перекристаллизовывают. До начала перекристаллизации альбумин центрифугируют и промывают раствором $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ такой концентрации, которая с центрифугатом дает легкое помутнение. Отмытый кристаллический

альбумин растворяют в воде, фильтруют и к фильтрату добавляют насыщенный буферный раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (рН = 4,7) до появления исчезающей мути. (Буферный раствор готовят, смешивая один объем ацетатного буфера с рН = 4,7 с 9 объемами насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. К этой смеси добавляют порошок $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до полного насыщения). Таким образом перекристаллизацию можно повторить несколько раз до окончательной очистки белкового препарата.

Разделение белков методом электрофореза на бумаге. В последнее время при исследовании белков, кроме фракционирования высаливанием, широко начали применять электрофоретическое разделение белкового комплекса, а также количественное определение отдельных фракций белков. Нередко электрофорез объединяют с хроматографией. В настоящее время есть множество приемов электрофоретического и хроматографического анализа белковых веществ, в связи с чем разработано много различных аппаратов для электрофоретического разделения белков.

Методом электрофореза можно выделить отдельные фракции растительных белков.

Большое количество белков содержится в пшенице, ржи и других злаковых. Особенно богаты белком некоторые семена бобовых и масличных культур: горох, фасоль, подсолнечник.

Суммарное получение белков основано на растворении их в воде, в солевых, водоспиртовых и слабощелочных растворах. Выделение белков заключается в экстрагировании их тем или иным растворителем после измельчения исследуемого материала.

Исследование однородности белковых препаратов, выделение и очистку отдельных фракций производят осаждением, диализом, хроматографией, ультрацентрифугированием.

В настоящее время широко применяют метод электрофореза, разработанный А. Тизелиусом¹, методы электрофореза на фильтровальной бумаге, на целлюлозном или крахмальном порошке и др. Для электрофореза на бумаге используют фильтровальную хроматографическую плотную бумагу.

Выделение альбуминов и глобулинов из семян.

Методика опыта. Семена тонко измельчают, обезжиривают ацетоном и высушивают в вакуум-эксикаторе.

В колбу Эрленмейера насыпают 20—25 г измельченного материала, заливают 100 мл дистиллированной воды, 1 ч взбалтывают в шуттель-аппарате, затем помещают в холодильник при 0° С на 15—18 ч. После этого раствор белка центрифугируют в течение 10 мин при 3000—4000 об/мин. Центрифугат сливают в большой стакан. Осадок гомогенизируют с водой, наливают в колбу Эрленмейера, взбалтывают 30—40 мин и центрифугируют. Второй центрифугат сливают в тот же стакан, что и первый. Такую экстракцию повторяют 4—5 раз до отрицательной реакции на белок (биуретовая реакция).

¹ См.: Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. М., «Медгиз», 1953, с. 90—91; Кретович В. Л. Основы биохимии растений. М., «Высшая школа», 1971, с. 46.

При такой экстракции водой в раствор переходят не только водорастворимые белки (альбумины), но и другие растворимые в воде соединения, т. е. свободные аминокислоты, сахара, минеральные соли, а также значительная часть солерастворимых белков (глобулинов). Таким образом, полученный раствор условно можно рассматривать как слабосолевой.

Для выделения щелочнорастворимой фракции и глютелинов растительный материал экстрагируют боратным буфером (рН = 10), содержащим 0,2% гидросульфита натрия.

Чтобы отделить альбумины от глобулинов, проводят диализ против дистиллированной воды. Полученный препарат анализируют с помощью электрофореза.

Для исследования глобулиновой фракции ее также осаждают по описанному выше способу и очищают диализом. Электрофоретическое разделение глобулинов представляет собой определенный интерес при изучении этой фракции белков. Кроме того, глобулины извлекают 10%-ным раствором хлорида натрия и очищают диализом.

Альбумины можно выделить также описанным выше способом кристаллизации.

Следует заметить, что в каждом отдельном случае электрофоретического анализа разрабатывают метод выделения исследуемых белков в зависимости от их физико-химических свойств. В отдельных случаях белки выделяют и очищают способом хроматографической адсорбции.

Электрофорез на бумаге. Электрофоретическое разделение белков основано на том, что каждая фракция при определенном рН в электрическом поле движется по хроматографической бумаге с различной скоростью.

Метод основан на использовании амфотерных свойств белков и их способности перезаряжаться в зависимости от реакции среды. В щелочной зоне белковая молекула движется к аноду, в кислой — к катоду. Реакция среды, избираемой для электрофореза, устанавливается по изоэлектрической точке белка. Например, если изоэлектрическая точка белка находится в кислой среде (при рН = 4 ÷ 6), то электрофорез производят в щелочной среде (при рН = 8,6), устанавливаемой соответствующим буферным раствором.

Для разделения белков используют специальный электрофоретический прибор, схема которого представлена на рис. 13.

Прибор состоит из двух электродных сосудов 1, в которых налит боратный буферный раствор с рН = 8,6 (табл. 2). Сосуды вставлены в ванну 8, закрытую крышкой 9. Полоса фильтровальной хроматографической бумаги 3 размером 4 × 35 см, на которой происходит электрофоретическое разделение белков, находится в увлажненной камере 4, а концы ее погружены в электродные сосуды с боратным буфером. Выравнивание жидкости в сосудах достигается при помощи временно

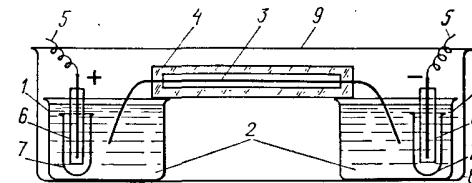


Рис. 13. Схема прибора для электрофореза белков на бумаге.

устанавливаемого сифона, который во время опыта снимают. Для сохранения постоянной реакции среды электроды 5 вставлены в стеклянные трубочки 6, которые в свою очередь вставлены в пробирки 7. Такая изоляция препятствует распространению зоны изменения pH, происходящего у электродов; постоянная среда на бумаге сохраняется на протяжении всего опыта. На бумагу, на расстоянии 10 см от края, простым карандашом наносят линию старта. Исследуемый раствор белка наносят на бумагу в виде точки или поперечной полосы из нескольких капель.

Таблица 2. Боратный буфер (по Клэрку и Лебсу)

pH	0,1 М KCl, мл	0,1 М NaOH, мл	pH	0,1 М KCl, мл	0,1 М NaOH, мл
7,8	47,39	2,61	9,0	28,70	21,30
8,0	46,03	3,97	9,2	23,30	26,70
8,2	44,10	5,90	9,4	18,00	32,00
8,4	41,50	8,50	9,6	13,15	36,85
8,6	38,00	12,00	9,8	9,20	40,80
8,8	33,70	16,30	10,0	6,10	43,90

Примечание. К 50 мл 0,1 М раствора борной кислоты прибавляют необходимый объем раствора щелочи и доводят раствором KCl общий объем до 100 мл.

Постоянный ток к угольным электродам поступает от выпрямителя через стабилизатор. К источнику питания для контроля напряжения и силы тока присоединяют вольтметр и амперметр. Для равномерной плотности тока на бумаге прибор в процессе работы охлаждают. Неравномерная плотность тока нагревает бумагу. Электрофорез проводят при силе тока 0,4 мА на 1 см ширины полосы, напряжения тока 180—240 В, pH = 8,6. Электрофорез продолжают 12—15 ч, после чего электрофореграмму вынимают, сушат при 100°С в течение 5 мин и окрашивают 1%-ным раствором бромфенолблау. Затем краситель удаляют с бумаги многократным промыванием 5%-ным раствором CH₃COOH. После промывки электрофореграмму высушивают.

Полученную электрофореграмму разрезают в поперечном направлении на полосы шириной 0,5 см; отрезки элюируют в течение 30 мин в пробирке с 1 мл водного раствора CH₃OH (1 : 1), содержащего 5% Na₂CO₃. Полученные элюаты исследуют в фотоэлектроколориметре, определяя экстинкцию при длине волны 570 нм. На основании полученных данных строят электрофоретическую кривую, откладывая по оси абсцисс порядковый номер исследуемых полос электрофореграммы, а по оси ординат их экстинкцию. По этой кривой судят о содержании белков в каждой фракции, измерив площадь планиметром (рис. 14).

Количество белка, кроме описанного метода, можно определить непосредственно денситометром. В аналитической практике применяют несколько типов денситометров: автоматические, полуавтоматические и ручные для непосредственного фотометрирования электрофореграмм. При помощи некоторых денситометров окрашенные и высушенные полоски бумаги просматривают без дополнительной обра-

ботки. В других случаях применяют различные реактивы, от действия которых бумага становится более прозрачной: парафиновое масло, смесь парафинового масла с бромнафталином, бензиловый спирт, метиловый эфир салициловой кислоты и др. К каждому отдельному типу прибора обычно прилагается соответствующая инструкция или руководство по пользованию им.

H₃BO₃ предварительно очищают повторной кристаллизацией из воды и высушивают в тонких слоях фильтровальной бумаги. Опреде-

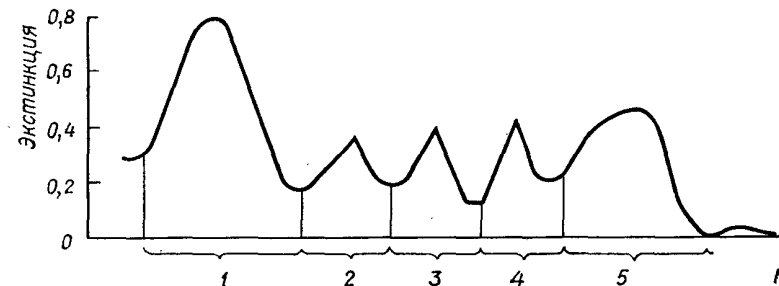


Рис. 14. Зависимость экстинкции белков от порядкового номера (N) полос электрофореграммы.

ляют постоянную массу на небольших пробах, высушиваемых в эксикаторе над CaCl₂.

KCl очищают 3—4-кратной перекристаллизацией. Соль сушат в течение двух дней при 120°С до постоянной массы.

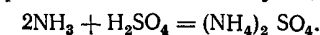
Для приготовления 0,1 М растворов берут 2,4810 г H₃BO₃, 2,9824 г KCl и 4 г NaOH на 1 л воды.

Наряду с боратным применяют вероналовый буфер (см. Петров К. П. Практикум по биохимии пищевого растительного сырья. М., «Пищевая промышленность», 1965, с. 63).

Количественное определение общего азота

Метод Кьельдаля. При определении азота в органических азотистых веществах методом Кьельдаля получают исключительно точные результаты. В настоящее время разработано большое количество разнообразных модификаций этого метода применительно к отдельным объектам исследования.

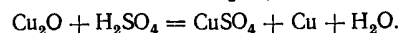
Сущность метода заключается в следующем. Растительный продукт, содержащий белковые вещества, минерализуют сжиганием в концентрированной H₂SO₄. В качестве катализаторов в зависимости от сжигаемого вещества применяют CuSO₄, H₂O₂, Hg, KMnO₄, Se и др. Для повышения температуры кипения H₂SO₄ добавляют K₂SO₄ или Na₂SO₄. При минерализации белковое вещество разлагается серной кислотой с образованием NH₃. Газообразный аммиак связывается с H₂SO₄, образуя сульфат аммония по следующей реакции:



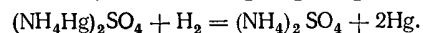
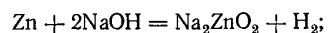
Каталитическую роль металлической меди, ртути и других соединений можно объяснить способностью этих катализаторов служить передатчиком кислорода от H_2SO_4 к органическому веществу:



CuO при нагревании восстанавливается до Cu_2O , при этом выделяется атомарный кислород по уравнению



Применяя Hg в качестве катализатора, необходимо учитывать, что образующиеся при сжигании и в дальнейшем при прибавлении щелочи ртутно-амидные соединения, находясь в осадке, разлагаются неполностью. Поэтому рекомендуют добавлять немного цинковой пыли, которая восстанавливает эти соединения по реакции



Исследуемый продукт сжигают в тугоплавких колбах Кьельдаля. По окончании полной минерализации охлажденную жидкость сильно подщелачивают, добавляя большое количество концентрированного раствора $NaOH$, вытесненный аммиак отгоняют и улавливают титрованным раствором H_2SO_4 . Количество связанной H_2SO_4 пересчитывают на NH_3 , а затем — на азот, который выражают в процентах по отношению к массе исследуемого продукта. При пересчете на белковое вещество количество азота умножают на соответствующий коэффициент. Для большинства белков применяют коэффициент 6,25 из расчета, что азота в них содержится 16%. Для белков злаковых коэффициент принимают равным 5,71, так как количество азота в них 17,5%.

Макрометод Кьельдаля.

Приготовление метилрота — 0,1 г метилрота растворяют в 30 мл спирта и разбавляют до 50 мл водой.

Методика опыта. Навеску исследуемого вещества в зависимости от количества содержащихся в нем белков отбирают двумя способами.

Взвешивают 0,2—0,3 г продуктов, богатых белками, на аналитических весах по разности. Для этого в бюкс, снабженный небольшим стеклянным шпателем, помещают около 20 г средней пробы мелко измельченного продукта, взвешивают бюкс, затем отбирают часть пробы в пакетик, изготовленный из беззольного фильтра, и снова взвешивают.

2) Навеску исследуемого растительного продукта, содержащего сравнительно небольшое количество белков, взвешивают непосредственно в пакетике из кальки.

При анализе сухих веществ навеску взвешивают на аналитических весах, а сырых (когда навеска достигает нескольких граммов) — на теххимических. Величина навески зависит от вида продукта: для зерна и муки она составляет 1—1,5 г; для сырых корнеплодов — 8—10 г, для воздушно-сухих — 0,7—1 г; для сырых клубней — 8—12 г, воздушно-сухих — 1—1,5 г. Для анализа рекомендуется брать

корнеплоды и клубни в сыром виде, потому что они быстрее и полнее сгорают, чем сухие продукты.

В одну сухую колбу Кьельдаля (рис. 15, 1) переносят пакетик с навеской, в другую — пустой пакетик (для контрольного опыта). Затем в опытную и контрольную колбы наливают по 20 мл концентрированной H_2SO_4 . Колбы слегка нагревают, чтобы испарилась влага. При сжигании сырого материала происходит вспенивание, поэтому к предварительно охлажденной смеси прибавляют 1 мл C_2H_5OH для уменьшения поверхностного натяжения. Когда вспенивание жидкости

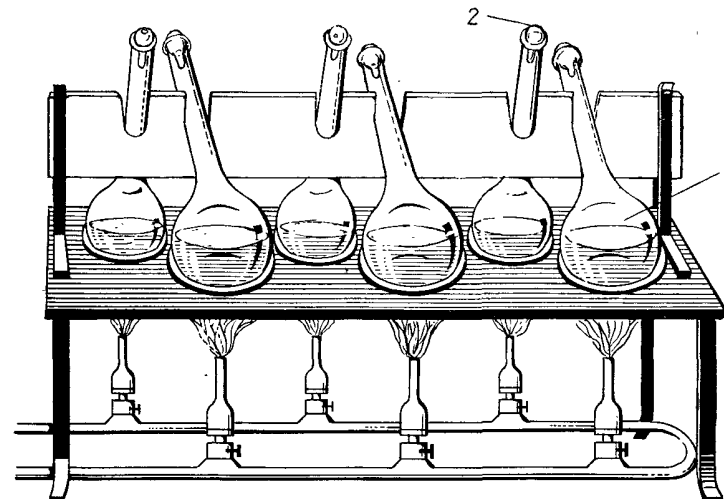


Рис. 15. Установка для сжигания навески вещества по Кьельдалю.

и выделение паров прекратится, колбы охлаждают и добавляют около 8 г K_2SO_4 и 2—3 кристаллика $CuSO_4$. Большое количество K_2SO_4 прибавлять не следует, так как температура кипения H_2SO_4 может при этом значительно повыситься, что вызовет разрушение $(NH_4)_2SO_4$ и улетучивание азота. Отверстие колбы закрывают стеклянной пробкой 2.

Если в лаборатории нет вытяжного шкафа, то навеску можно сжигать на рабочем столе, но при этом необходимо следить за тем, чтобы в воздух не попали пары кислоты. Для этого колбу Кьельдаля при сжигании навески закрывают отводной трубкой, которую присоединяют к водоструйному насосу.

Сжигание навески ведут до полного осветления содержимого колбы. Если на стенках колбы осели обугленные частички вещества, их следует смыть горячей смесью, осторожно поворачивая колбу. После осветления жидкость дополнительно нагревают; продолжительность нагревания зависит от вида анализируемого вещества. После полного сжигания колбу охлаждают и добавляют до 1/3 объема дистиллированной воды. Воду приливают маленькими порциями по стенкам колбы, полученный раствор количественно переносят в колбу для отгонки.

В аппарате для отгонки (рис. 16) под холодильник 3 ставят в качестве приемника колбу Эрленмейера 1, в которую наливают 25—50 мл в зависимости от содержания азота 0,1 н. раствора H_2SO_4 . Нижнюю часть форштоса холодильника опускают в кислоту.

В колбу для отгонки (2), где находится анализируемое вещество, добавляют 4—5 кусочков прокаленной пемзы и 100 мл 33%-ного прокипяченного раствора NaOH. Содержимое быстро взбалтывают и бросают кусочек красной лакмусовой бумаги (синий цвет указывает

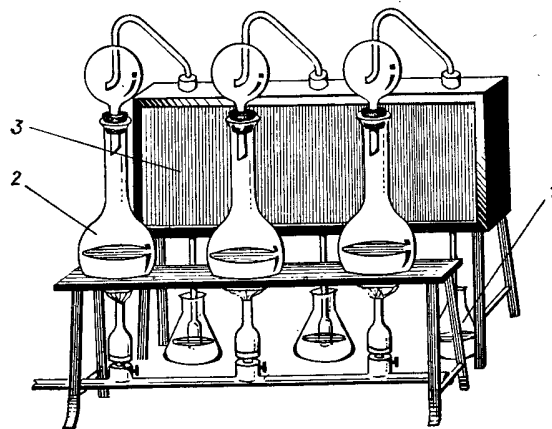


Рис. 16. Аппарат для отгонки аммиака.

на достаточное количество прибавленной щелочи). Колбу 2 быстро присоединяют к прибору и начинают нагревать. Через 3—5 мин жидкость закипает и в каплеуловителе конденсируются пары; если кипение запаздывает, то нагревание усиливают.

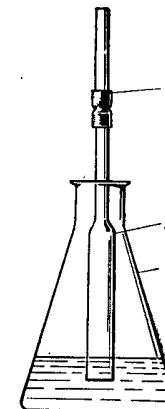
Чтобы титрованный раствор не вытягивался в форштос, необходимо поддерживать равномерное кипение. Для предотвращения возможного переброса титрованного раствора в отгонную колбу и увеличения поверхности соприкосновения NH_3 с H_2SO_4 на конец форштоса надевают при помощи резиновой трубки предохранитель (рис. 17), который опускают в H_2SO_4 . Предохранителем может служить срезанная верхняя часть форштоса. При нормальном кипении через 15—20 мин отгоняется 70—90% NH_3 . По истечении указанного времени приемник опускают, конденсируемая жидкость при этом стекает из холодильника по каплям в H_2SO_4 . Отгонку продолжают еще 10 мин, после чего конец предохранителя обмывают из промывалки небольшим количеством дистиллированной воды.

В приемник добавляют 3—5 капель метилрота и титруют 0,1 н. раствором NaOH до изменения окраски. Результаты титрования в рабочем и контрольном опытах пересчитывают на азот и выражают в процентах:

$$x = \frac{(a - b) K \cdot 1,4 \cdot 100}{g \cdot 1000},$$

Рис. 17. Приспособление, предотвращающее возможный переброс титрованного раствора:

1 — колба Эрленмейера; 2 — предохранитель; 3 — резиновая трубка.



где x — количество азота в исследуемом продукте, %; a — количество 0,1 н. раствора NaOH, израсходованного на титрование H_2SO_4 в контрольном опыте, мл; b — количество 0,1 н. раствора NaOH, израсходованного на титрование H_2SO_4 в рабочем опыте, мл; K — поправочный коэффициент к 0,1 н. раствору NaOH; 1,4 — количество азота, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 , израсходованного на связывание NH_3 в приемнике, мг; g — навеска исследуемого вещества, г.

Пример расчета. Для определения общего азота взята навеска пшеничной муки — 0,9876 г. На титрование в контрольном опыте пошло 49,69 мл 0,1 н. раствора NaOH, а на титрование оставшейся H_2SO_4 в приемнике рабочего опыта израсходовано 23,53 мл 0,1 н. раствора NaOH. Полученные данные подставляем в формулу и вычисляем количество азота:

$$x = \frac{(49,69 - 23,53) 0,9673 \cdot 1,4 \cdot 100}{0,9876 \cdot 1000} = 3,58.$$

Чтобы быть уверенным в точности определения, ставят параллельные опыты, результаты которых не должны расходиться более чем на 1% относительной ошибки.

С целью ускорения анализа можно исключить отгонку NH_3 после сжигания. Количество NH_3 при этом определяют колориметрическим методом с реактивом Несслера или методом формольного титрования¹.

Микрометод Кьельдаля. В настоящее время широко применяют микрометод Кьельдаля, которым определяют небольшие количества азота, что часто имеет большое значение.

Навеску взвешивают с точностью до шестого знака на микровесах.

Приготовление 0,2%-ного раствора метилрота — 0,1 г метилрота растворяют в 30 мл этилового спирта и доводят водой до 50 мл.

Методика опыта. В колбу Эрленмейера 12 (рис. 18) отмеривают пипеткой Мора 10 мл 0,02 н. раствора H_2SO_4 . Колбу помещают под холодильник 10 так, чтобы конец его был погружен на 2—3 мм в раствор. Колбу Кьельдаля 5 после сжигания навески с помощью каплеуловителя 11 и трубки 8 присоединяют к аппарату. Пар должен выходить из парообразователя 1 по трубке 9 через открытый зажим 4 нижней части предохранительной трубки 3. Содержимое колбы 5 через воронку 7 разбавляют 15 мл воды, в которую предварительно добавляют 1—2 капли метилрота. Затем через воронку 7 приливают 33%-ный раствор NaOH из расчета на 1 мл концентрированной H_2SO_4 5 мл 33%-ного раствора щелочи; изменение окраски раствора в колбе Кьельдаля указывает на щелочную реакцию. Зажим на воронке 7 быстро закрывают, открывают зажим 13 и закрывают зажим 4. Пар из

¹ См. Марх А. Т., Кржевова Р. В. Химико-технический контроль консервного производства. М., Пищепромиздат, 1962, с. 185.

парообразователя поступает в колбу Кьельдаля — начинается отгонка NH_3 . В парообразователь перед нагреванием бросают капилляры или прокаленные кусочки пемзы для более равномерного кипения. Отгонка NH_3 заканчивается через 15 мин. В течение последних 5 мин форштос холодильника не должен касаться кислоты, поэтому колбу 12 с титрованной H_2SO_4 опускают. По окончании отгонки ту часть форштоса, которая соприкасалась с кислотой, промывают из промывалки небольшим количеством дистиллированной воды.

В приемную колбу Эрленмейера 12 прибавляют 1—2 капли метилроta. Избыток кислоты оттитровывают 0,05 н. раствором NaOH из

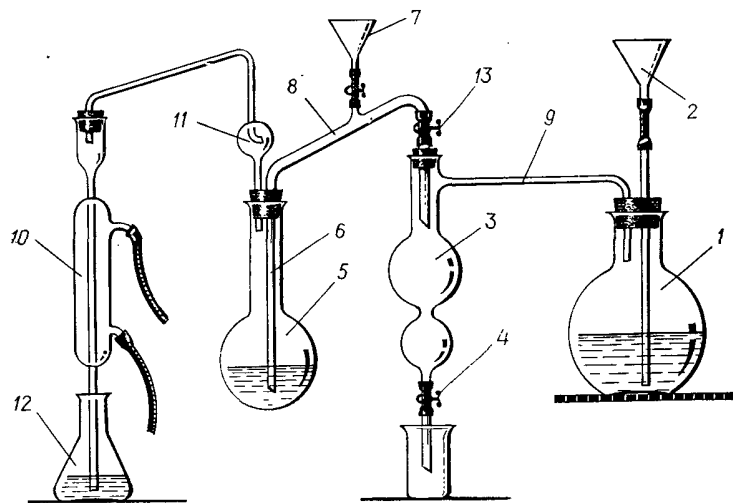


Рис. 18. Микроаппарат Кьельдаля.

микробюретки. Параллельно ставят контрольный опыт для проверки чистоты реактивов. Для этого в отдельную колбу вместо исследуемого продукта наливают такое же количество дистиллированной воды и проводят все описанные выше операции. При вычислении количества отогнанного азота принимают, что 1 мл 0,05 н. раствора NaOH соответствует 0,7 мг азота. Количество азота x в процентах к исследуемому продукту вычисляют по формуле

$$x = \frac{(a - b) K \cdot 0,7 \cdot 100}{g \cdot 1000},$$

где a — количество 0,05 н. раствора NaOH, израсходованного для титрования H_2SO_4 в контрольном опыте, мл; b — количество 0,05 н. раствора NaOH, израсходованное на титрование H_2SO_4 в рабочем опыте, мл; K — поправочный коэффициент к титру 0,05 н. раствора NaOH; g — количество исследуемого вещества, взятое для минерализации, г; 0,7 — количество азота, соответствующее 1 мл 0,05 н. раствора H_2SO_4 , израсходованное на связывание NH_3 в приемнике, мг.

Пример расчета. Для сжигания взята навеска муки — 0,005457 г. На титрование H_2SO_4 в контрольном опыте было израсходовано 1,975 мл 0,05 н. раствора NaOH,

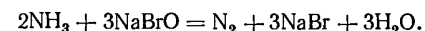
а в рабочем опыте — 1,764 мл. Подставляем полученные данные в формулу и определяем количество азота x в исследуемом растительном продукте:

$$x = \frac{(1,975 - 1,764) 0,9793 \cdot 0,7 \cdot 100}{0,005457 \cdot 1000} = 2,65.$$

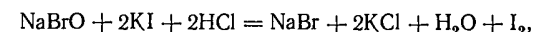
Для серийного исследования растительных продуктов монтируют два микроаппарата. В этих же аппаратах можно определять азот и макрометодом, но при этом следует увеличить соответственно навеску минерализуемого вещества, количество реактивов, применяемых для анализа, и количество титрованных растворов H_2SO_4 и NaOH. В этом случае пользуются 0,1 н. растворами H_2SO_4 и NaOH. Объем перегонной колбы, служащей и для минерализации, также должен быть больше.

Описанный метод весьма удобен и точен. Для анализа продуктов этим методом не требуется специальной аппаратуры. Кроме метода Кьельдаля, есть и другие модифицированные методы, приближающиеся по точности к методу Кьельдаля. Методом, отличающимся простотой и достаточной точностью, является гипобромитный метод определения общего азота.

Гипобромитный метод основан на реакции NH_3 с NaBrO и выделении азота по уравнению



Оставшийся NaBrO реагирует с иодидом калия:



а вытесненный иод оттитровывают раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Таким образом определяют количество NH_3 , прореагировавшего с гипобромитом. Следует иметь в виду, что вытесненный иод может реагировать с ненасыщенными соединениями и вступать в другие окислительные реакции, образуя побочные продукты.

Приготовление некоторых реактивов. Раствор NaBrO — к 60 мл 5%-ного раствора NaOH, охлажденного на льду, добавляют 0,5 мл Br_2 и 125 мл воды, из этого основного раствора перед опытом берут 5 мл в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят до метки 0,1 н. раствором NaOH. 0,1%-ный раствор фенолфталеина — 0,05 г фенолфталеина растворяют в 30 мл спирта и разбавляют до 50 мл водой.

Методика опыта. На аналитических весах взвешивают навеску 0,02—0,03 г муки или другого растительного продукта. Навеску помещают в пробирку из тугоплавкого стекла, прибавляют 2 мл концентрированной H_2SO_4 марки «х, ч.» ($d = 1,84$), насыпают около 0,5 г K_2SO_4 (на кончике ножа) и все это кипятят 1—2 мин на горелке. Затем смесь охлаждают и прибавляют 2 капли 30%-ного раствора HCl. Эту операцию повторяют до полного обесцвечивания реакционной смеси. Продолжительность сжигания навески 5—10 мин. Одновременно ставят контрольный опыт. Навеску можно сжигать и вне вытяжного шкафа (например, на химическом столе), но пары, выделяющиеся из пробирки, должны поглощаться водой. Для этого пробирку закрывают

пробкой с отводной трубкой (трубку не следует опускать в воду). Колбу с водой закрывают листом бумаги, через отверстие которого пропускают трубку. После минерализации и охлаждения содержимое пробирки количественно переносят в колбу Эрленмейера емкостью 100—150 мл. В колбе должно быть около 30 мл жидкости. Затем прибавляют 1 каплю 0,1%-ного раствора фенолфталеина (больше нельзя, так как фенолфталеин разлагает NaBrO) и избыток 5 н. раствора NaOH (наблюдается ярко-красное окрашивание). Расход 5 н. раствора NaOH на 1 мл взятой для сжигания N_2SO_4 составляет около 8 мл. Избыток щелочи нейтрализуют 3 н. раствором H_2SO_4 , а затем подщелачивают до розового окрашивания 0,1 н. раствором NaOH. Для подщелачивания добавляют не более 0,5 мл 0,1 н. раствора NaOH.

После подщелачивания раствор охлаждают до комнатной температуры и отмеряют пипеткой 2 мл раствора NaBrO, 2 мл 10%-ного раствора KI и 2 мл 2 н. раствора HCl. Если NaBrO недостаточно, что определяют по отсутствию иода в реакционной смеси, то следует прибавить еще 1 мл его раствора. Смесь взбалтывают и оставляют в темном месте на 15—20 мин, затем титруют из микробюретки 0,01 н. раствором $Na_2S_2O_3$.

Параллельно проводят контрольный опыт на чистоту реактивов: вместо исследуемого вещества берут примерно такое же количество дистиллированной воды.

Количество азота x в исследуемом образце (в %) определяют по формуле

$$x = \frac{(a - b) 0,0465 \cdot 100}{1000g},$$

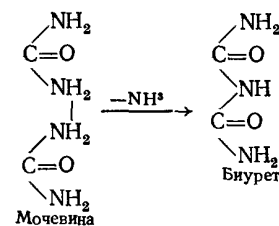
где a — количество 0,01 н. раствора $Na_2S_2O_3$, израсходованного на титрование иода, выделившегося в контрольном опыте, мл; b — количество 0,01 н. раствора $Na_2S_2O_3$, израсходованного на титрование иода, выделившегося в рабочем опыте, мл; 0,0465 — количество азота, соответствующее 1 мл 0,01 н. раствора $Na_2S_2O_3$, мг; g — навеска взятого материала, г.

Пример расчета. Навеска растительного материала равна 0,0356 г. На титрование иода, выделившегося в контрольном опыте, пошло 12,865 мл 0,01 н. раствора $Na_2S_2O_3$, на титрование иода, выделившегося в рабочем опыте, — 3,175 мл. Количество азота в исследуемом образце равно:

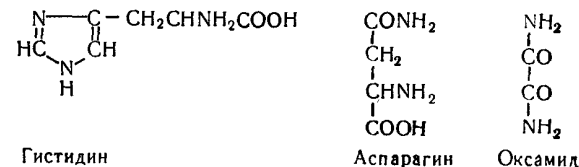
$$x = \frac{(12,865 - 3,175) 0,0465 \cdot 100}{0,0356 \cdot 1000} = 1,23 \%$$

Колориметрический метод определения количества белка по биуретовой реакции. Этим методом непосредственно определяют количество белка в растительных продуктах, используя цветную реакцию белка, обработанного концентрированным раствором щелочи с $CuSO_4$. Белок исследуемого образца (муки, зерна и т. п.) переводят в раствор, с которым проводят биуретовую реакцию. Эта реакция характерна для пептидной связи, она получила свое название от производного мочевины — биурета, образующего с щелочным раствором $CuSO_4$ комплексное соединение фиолетового цвета.

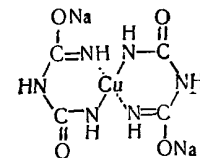
Биурет обычно образуется за счет отщепления NH_3 при нагревании мочевины:



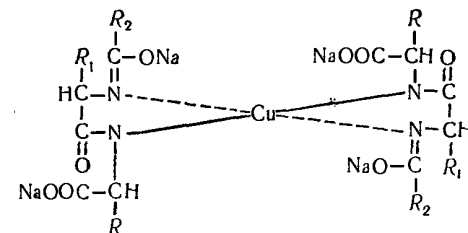
Биуретовую реакцию дают также некоторые соединения без пептидных связей, но имеющие в своей молекуле группы $-CS-NH-$ или $=CH-NH-$, а также



Формулу фиолетовой медно-натриевой комплексной соли с биуретом можно представить следующим образом:



Фиолетовая медно-натриевая комплексная соль полипептидов и белков имеет следующее строение:



Биуретовая реакция обладает высокой чувствительностью. При разбавлении белка 1 : 10 000 получают положительную цветную реакцию.

Качественную биуретовую реакцию проводят обычно следующим образом. К 5 мл раствора белка прибавляют 1 мл 30%-ного раствора NaOH или KOH и 2—3 капли 1%-ного раствора $CuSO_4$, при взбалтывании появляется фиолетовое окрашивание. Не следует прибавлять избыток $CuSO_4$, так как фиолетовая окраска становится незаметной (она маскируется синей); в присутствии пептонов и полипептонов раствор приобретает красный оттенок.

Установлено, что интенсивность окраски раствора белка с щелочным раствором CuSO_4 прямо пропорциональна концентрации белка. Окраску полученного раствора сравнивают в колориметре с окраской стандартного раствора, количество белка в котором известно.

Этим методом количество белка в продукте определяют значительно быстрее, чем методом Кьельдаля, он доступен для любой лаборатории. Метод проверен для зерновых культур. Относительная ошибка его составляет в среднем 2—5%. Кроме того, этот метод применяют и при исследовании продуктов животного происхождения. Дальнейшая разработка его для определения белка в корнеплодах и клубнях имеет большое практическое значение.

Приготовление некоторых реактивов. 0,2%-ный раствор NaOH (для пшеницы, ржи, ячменя и овса) — 2 г NaOH растворяют в мерной колбе на 1 л в 50%-ном $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. 1%-ный раствор NaOH (для кукурузы и проса) — 10 г NaOH растворяют в мерной колбе на 1 л в 70—80%-ном $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$.

Методика опыта. Навески муки стандартного и опытного образцов (1,0—1,5 г) взвешивают на аналитических весах и помещают в небольшие фарфоровые ступки (диаметром около 10 см). К навескам добавляют 2 г битого стекла или кварцевого песка, приливают из бюретки по 3 мл соответствующего исследуемому продукту раствора NaOH в спирте и тщательно растирают пестиком в течение 3 мин (вначале опытный образец, затем контрольный), чтобы разрушить клетки и полное извлечь белок.

Добавляют еще по 12 мл раствора NaOH и снова растирают 2 мин. Полученные смеси из ступок количественно переносят в мерные колбы на 50 мл, ополаскивают ступки 2—3 раза свежими порциями (по 5 мл) раствора NaOH и доводят содержимое колбы этим же раствором до метки. Колбы с навесками хорошо встряхивают и оставляют на 1 ч.

По окончании настаивания вытяжки фильтруют в сухие колбы Эрленмейера (емкостью 50 мл). В центрифужные пробирки (емкостью 10 мл) с фильтратом добавляют по 1 мл 30%-ного водного раствора NaOH и по 1 мл 5%-ного раствора CuSO_4 . Колбу с остатком фильтрата плотно закрывают пробкой на случай необходимости повторения опыта. Смесь хорошо встряхивают и центрифугируют около 5 мин. Если растворы не прозрачны, опыт следует повторить. Для этого необходимо взять новые пробы белковых растворов и добавить к ним не по 1 мл растворов NaOH и CuSO_4 , а по 2 мл, тогда растворы становятся совершенно прозрачными.

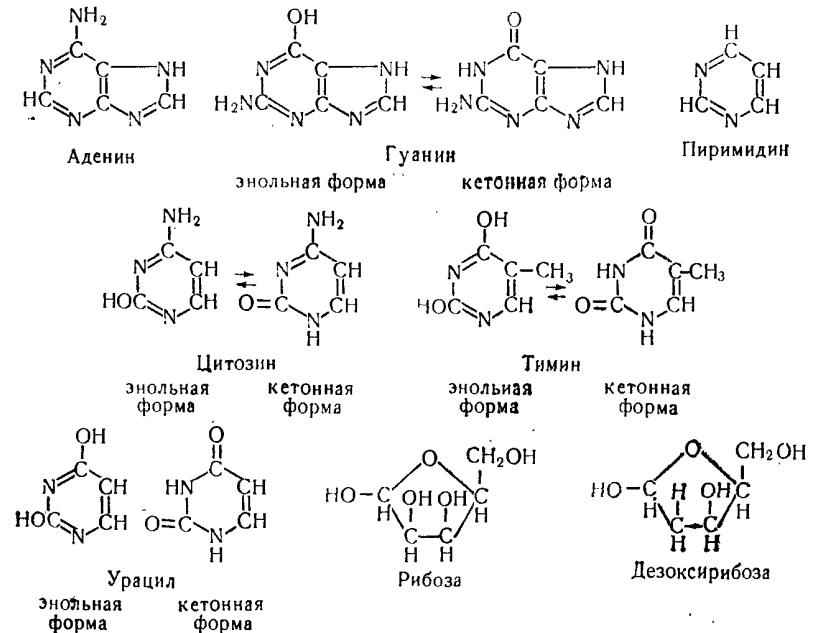
Определение проводят в ФЭКе. При работе с фотоэлектроколориметром находят оптическую плотность исследуемого раствора и вычисляют количество белка по калибровочной кривой, построенной на основании оптических плотностей стандартных проб с известным содержанием белка в них, определенным по методу Кьельдаля. На оси абсцисс откладывают значение концентрации белков, проводят от каждой точки перпендикуляр, а на оси ординат — значение плотности раствора, и из точек также проводят перпендикуляры. Точки пересечения перпендикуляров осей абсциссы и ординаты служат для построения калибровочной кривой.

Нуклеопротейды (от лат. *nucleus* — ядро) содержатся в большом количестве в ядрах клеток, от которых они получили свое название, а также в тканях растений и животных. Эти белки обычно выделяют из тканей и клеток, богатых ядерным веществом. Особенно богаты нуклеопротейдами дрожжи, печень, зубная железа, селезенка и почки, бактериальные клетки и ткани, которые и служат материалом для препаративного выделения нуклеопротейдов. Молекулярная масса этих белков достигает десяти миллионов.

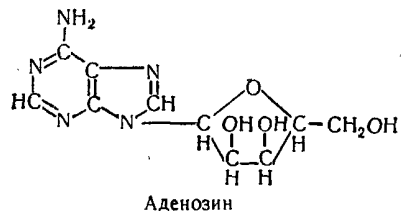
Вторым небелковым компонентом нуклеопротейдов являются нуклеиновые кислоты — высокомолекулярные соединения с молекулярной массой до нескольких миллионов. Нуклеиновая кислота — полинуклеотид — это полимер, состоящий из множества мономеров, тоже довольно сложных соединений. В их составе пуриновые и пиримидиновые основания, рибоза, дезоксирибоза и связанная с ними фосфорная кислота.

Различают два типа нуклеиновых кислот: рибонуклеиновую (РНК) и дезоксирибонуклеиновую (ДНК). В первую входит рибоза, во вторую — дезоксирибоза. В настоящее время установлено, что дезоксирибонуклеиновая кислота является важной составной частью клеточных ядер, а рибонуклеиновая кислота в основном входит в протоплазму клеток.

В состав мономеров входят такие важные пуриновые основания, как аденин и гуанин, которые являются производными пурина, цитозин, урацил и тимин — производные пиримидина (стр. 58), а также рибоза и дезоксирибоза:

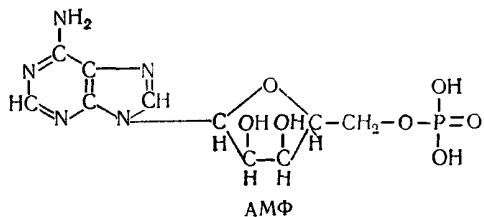


Соединение, состоящее из пуринового или пиримидинового основания, связанного с углеводом (рибозой или дезоксирибозой), называется нуклеозидом. Нуклеозид, состоящий из аденина, связанного с рибозой, называется аденозином:



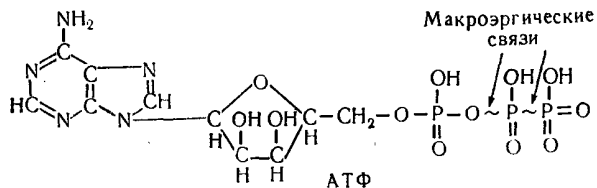
Аденозин

Аденозин, связанный с остатком H_3PO_4 , является мононуклеотидом, который называют аденозинмонофосфатом, или АМФ.



АМФ

Одним из очень важных представителей мононуклеотидов, содержащих три остатка фосфорной кислоты, является аденозинтрифосфат (АТФ), который играет чрезвычайно важную роль в обменных процессах синтеза и распада, идущих в организме:



АТФ

АТФ не только содержит значительное количество H_3PO_4 , но имеет также большой запас тепловой энергии в виде макроэргических связей, при разрыве которых освобождается примерно в 5 раз больше энергии, чем при разрыве простой связи. Эта энергия используется в различных обменных процессах, связанных с дыханием и брожением.

Качественные реакции на вещества, входящие в состав нуклеопротеидов

Получение некоторых реактивов. Аммиачный раствор нитрата серебра — к 5%-ному раствору $AgNO_3$ добавляют концентрированный раствор NH_3 до растворения выпадающего осадка. Орциновый реактив — 1 г орцина растворяют в 500 мл 30%-ного раствора HCl и добавляют 4—5 мл 10%-ного раствора $FeCl_3$, реактив хранят в темной плотнозакупоренной склянке. Молибденовый реактив — 7,5 г $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ растворяют в 100 мл 32%-ного раствора HNO_3 . Магнезиальная смесь — 3,5 г $MgCl_2$, 1,8 г NH_4Cl и 2 мл 25%-ного раствора NH_3 доводят водой до объема 100 мл.

Методика опыта. Полученный препарат нуклеопротеидов помещают в колбу емкостью 200 мл, добавляют 20 мл раствора H_2SO_4 . Колбу соединяют с обратным холодильником и кипятят 1 ч на слабом огне.

В гидролизате определяют:

1. **Пуриновые основания.** В пробирку берут 1 мл гидролизата и прибавляют 5 капель 10%-ного раствора NH_3 до щелочной реакции (на лакмус), затем добавляют 0,5 мл аммиачного раствора $AgNO_3$. Выпадает хлопьевидный осадок серебряных солей пуриновых оснований, который постепенно оседает на дно пробирки.

2. **Пентозы.** а) В пробирку наливают 1 мл орцинового реактива и нагревают до кипения. В кипящий реактив быстро добавляют 5 капель гидролизата. Через 2—3 мин появляется зеленое окрашивание, которое указывает на присутствие в гидролизате рибозы и дезоксирибозы. б) В другую пробирку наливают 1 мл раствора флороглюцина и нагревают до кипения. В кипящий раствор быстро добавляют 5 капель гидролизата. Тотчас появляется розовое окрашивание, которое в дальнейшем переходит в красное.

3. **Фосфорную кислоту.** а) 1 мл гидролизата переносят в пробирку, прибавляют равный объем молибденового реактива и нагревают. Желтый осадок указывает на присутствие H_3PO_4 в гидролизате. б) К 1 г гидролизата, нейтрализованного 25%-ным раствором NH_3 , добавляют 1 мл магнезиальной смеси. Белый кристаллический осадок указывает на присутствие H_3PO_4 .

Получение нуклеопротеидов и их анализ

Получение нуклеопротеидов основано на их растворимости в щелочной среде и на осаждении слабыми кислотами. Нуклеопротеиды при кипячении с разбавленными кислотами гидролизуются; гидролизу частично подвергается также белковый компонент, а от нуклеиновой кислоты отщепляются пуриновые основания, пентоза и H_3PO_4 . Отщепление же пиримидиновых оснований идет только при глубоком гидролизе.

Методика опыта. 10 г дрожжей помещают в небольшую фарфоровую ступку, добавляют 15 капель эфира, чтобы убить дрожжевые клетки, 10 мл воды и щепотку песка. Смесь тщательно растирают. К растертой массе приливают 50 мл 0,4%-ного раствора $NaOH$ и снова растирают в течение 15 мин. Затем содержимое ступки переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют (можно фильтровать). Центрифугат (фильтрат) переносят в стакан (лучше в высокий узкий цилиндр), куда добавляют из пипетки 5%-ный раствор CH_3COOH до полного осаждения нуклеопротеида. Обычно для этого расходуется около 15 мл CH_3COOH . Осадок отделяют центрифугированием. Для исследования осадок нуклеопротеидов подвергают гидролизу.

Частичный гидролиз проводят кипячением препарата с 5%-ным раствором H_2SO_4 в течение 1 ч. В начале гидролиза отщепляется белок небелкового компонента (нуклеиновой кислоты). Затем белок подвергают частичному расщеплению. Нуклеиновая кислота далее распадается на мононуклеотиды, а от них отщепляются пуриновые основания

(аденин и гуанин), H_3PO_4 и частично пентоза. Продукты гидролиза обнаруживают при помощи специальных реакций.

Выделение дезоксирибонуклеопротеида и определение дезоксирибонуклеиновой кислоты. Дезоксирибонуклеопроteid с дифениламином при нагревании дает синее окрашивание в результате гидролиза и освобождения дезоксирибозы, которая и реагирует с дифениламином. Рибоза с дифениламином образует продукты реакции, окрашенные в зеленый цвет.

Приготовление дифениламинового реактива — 1 г дифениламина растворяют в ледяной CH_3COOH с последующим добавлением 2,75 мл концентрированной H_2SO_4 ($d = 1,84$ г/см³).

Методика опыта. 1 г печени растирают в течение 10—15 мин в фарфоровой ступке со 100 г промытого песка или с битым стеклом, постепенно подливая небольшими порциями 15 мл 5%-ного раствора NaCl. Затем растертую массу центрифугируют в течение 10—15 мин. Центрифугат переносят в стакан емкостью 100—150 мл и медленно, при помешивании стеклянной палочкой, добавляют 80—90 мл дистиллированной воды. Нерастворимый в воде дезоксирибонуклеопроteid выпадает в осадок и при помешивании стеклянной палочкой наматывается на нее в виде нитей. Палочку вместе с нитями осторожно вынимают и переносят в чистую пробирку, в которой дезоксирибонуклеопроteid растворяют в 1—2 мл 0,4%-ного раствора NaOH. К 5—10 каплям раствора дезоксирибонуклеопротеида добавляют равный объем дифениламинового реактива, перемешивают и помещают в кипящую водяную баню на 5—10 мин. Смесь постепенно становится синей.

Количественное определение нуклеиновых кислот. Принцип метода основан на выделении рибонуклеиновых (РНК) и дезоксирибонуклеиновых (ДНК) кислот и на дальнейшем их анализе прямыми и косвенными методами. К прямым методам относятся такие, которые включают гидролиз нуклеиновых кислот с последующим выделением из гидролизатов пуринов и пиримидинов и определение их хроматографическим методом. Хроматография позволяет производить точный микроанализ нуклеиновых кислот. Исследование пуринов и пиримидинов проводят в ультрафиолетовом свете, наблюдая флуоресценцию пятен на хроматограммах или в экстрактах, полученных из соответствующих участков хроматограмм. Кроме хроматографического метода, применяют также способ электрофореза на бумаге.

К непрямым (косвенным) методам относятся такие, в которых нуклеиновые кислоты определяют по количеству освобожденного H_3PO_4 в процессе их гидролиза и по количеству пентоз или по содержанию азота в нуклеиновых кислотах, определяемому методом Кьельдаля.

ХРОМОПРОТЕИДЫ

Под названием хромопротеиды объединяют все цветные белки. Типичным представителем хромопротеидов является гемоглобин крови. Сходным по структуре с гемом гемоглобина крови и других слож-

ных белков (ферментов) является хлорофилл растений, который связан также с белком.

Хлорофилл принадлежит к группе жирорастворимых пигментов, он растворяется в жирах и органических растворителях. Хлорофилл, как показали работы К. А. Тимирязева и его последователей, играет огромную роль в процессе ассимиляции углекислого газа. Процесс фотосинтеза представляет собой окислительно-восстановительное взаимодействие углекислого газа и воды, идущее в присутствии хлорофилла, который поглощает энергию солнечных лучей. Фотосинтез в настоящее время является главным источником образования органических веществ на Земле.

Один из крупнейших ученых К. А. Тимирязев дал следующую оценку фотосинтеза: «Пища служит источником силы в нашем организме потому только, что она — не что иное, как консерв солнечных лучей»¹.

Определение количества хлорофилла (по Т. Н. Годневу).

Приготовление стандарта (по Гетри): а) 10 г химически чистой (несколько раз перекристаллизованной) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ растворяют в 1 л дистиллированной воды; б) 20 г $K_2Cr_2O_7$ в мерной колбе на 1 л растворяют в дистиллированной воде и доводят водой до метки; в) готовят 2 н. раствор NH_3 . Из полученных трех растворов готовят стандарт: отмеряют 28,5 мл раствора (а) в мерную колбу емкостью 100 мл, вносят в нее 50 мл раствора (б) и 10 мл раствора (в). Смесь доводят водой до метки. Приготовленный таким образом стандартный раствор соответствует по окраске 85 мг чистого хлорофилла в 1 л.

Методика опыта. Навеску 2—3 г зеленого листа или другой исследуемой зеленой части растения тщательно растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком и мелом или еще лучше с $MgCO_3$. К растертому материалу добавляют несколько миллилитров 96%-ного C_2H_5OH и материал еще раз осторожно растирают вместе с растворителем. Жидкость сливают в небольшую воронку Бюхнера (диаметром 3—5 см) и отсасывают. К массе прибавляют снова 4—5 мл спирта и вновь растирают в течение нескольких минут. Так повторяют 2—3 раза, а затем количественно переносят смесь из ступки на фильтр и отсасывают. Ступку ополаскивают несколькими миллилитрами спирта, сливая его на уплотненный материал фильтра, затем через 2—3 мин производят отсасывание. Этот прием повторяют до тех пор, пока растворитель, стекающий с кончика отводной трубки воронки, не станет совсем бесцветным.

Полученный экстракт количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят этиловым спиртом до метки. Раствор анализируют на ФЭКе и количество хлорофилла вычисляют по калибровочной кривой, составленной согласно стандартному раствору:

$$x = \frac{alv \cdot 100}{l_1g \cdot 1000},$$

где a — количество хлорофилла, которому соответствует 1 мл стандартного раствора, мг; l — оптическая плотность спиртового экстракта

¹ Тимирязев К. А. Жизнь растения. М., Изд-во АН СССР, 1962, с. 281.

исследуемого образца; l_1 — оптическая плотность стандарта; v — объем полученного спиртового экстракта; g — навеска зеленого материала, г.

ФЕРМЕНТЫ

Ферменты (энзимы) представляют собой вещества белковой природы. Они являются специфическими биологическими катализаторами жизненных процессов растительного и животного организма. Ферменты входят в состав всех клеток и тканей и обуславливают способность живых организмов осуществлять множество разнообразных химических процессов, связанных с обменом веществ.

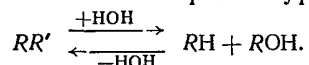
Ферменты делятся на однокомпонентные и двухкомпонентные. Однокомпонентные относятся к простым белкам — протеинам; двухкомпонентные, состоящие из белкового и небелкового компонентов, относятся к сложным белкам — протеидам. В молекулу этих ферментов в качестве небелкового компонента нередко входят витамины. Большинство гидролитических ферментов относится к простым белкам. Ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные процессы, принадлежат к сложным белкам.

Активность ферментов зависит от реакции среды, температуры, физико-химического состояния субстрата, некоторых специфически действующих на ферменты веществ (активаторов и парализаторов) и от других факторов. Каждый фермент имеет свой температурный и рН-оптимум, при котором он проявляет максимальную активность. Химический состав ферментов, так же как и белков, еще не изучен полностью, а поэтому определить их количественно очень трудно. Об активности ферментов судят по силе их действия на определенные вещества — субстраты. Количество продуктов распада или синтеза, образующихся при действии фермента на субстрат, служит критерием для определения степени его активности.

При сравнительном определении степени активности тех или иных ферментов пользуются строго определенной методикой, так как незначительные отклонения от нее сопровождаются большими расхождениями в результатах. Данные, определяющие степень активности фермента, выражают в относительных единицах. Они зависят от принятого времени инкубации, реакции среды, температурных условий, характера субстрата, на который действует фермент, и от ряда других факторов.

В соответствии с рекомендациями комиссии по ферментам МБС (Международного биохимического союза) ферменты делятся на шесть классов:

1. Гидролазы. К этому классу относится большое количество ферментов, играющих исключительно важную роль в производстве. Эти ферменты катализируют расщепление различных органических веществ при участии воды, а поэтому они получили название гидролаз. Схема работы гидролаз может быть выражена уравнением



2. Оксидоредуктазы (окислительно-восстановительные ферменты).
3. Трансферазы (ферменты переноса). Они катализируют перенос различных органических остатков и целых атомных группировок. Трансферазы переносят остатки фосфорной кислоты, моносахаридов, аминокислот, аминные и метильные группы от одного соединения к другому.

4. Лиазы. К этому классу относятся ферменты, катализирующие расщепление органических веществ без участия воды или фосфорной кислоты.

5. Изомеразы (ферменты изомеризации) катализируют превращение одного изомера в другой.

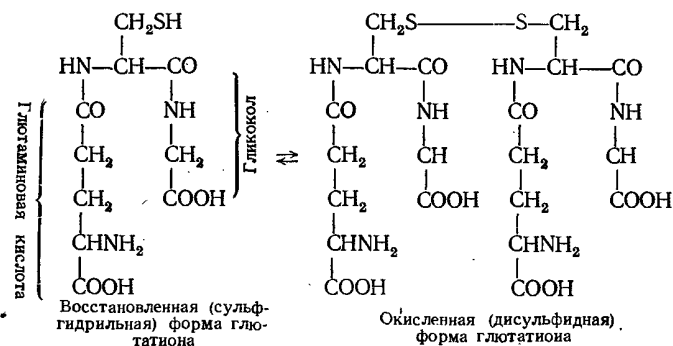
6. Лигаза (синтетаза). К этому классу относятся ферменты, катализирующие процесс синтеза органических соединений из двух молекул. Синтез идет с поглощением тепловой энергии, образующейся вследствие разрыва богатых энергией макроэргических связей АТФ.

Активаторы и парализаторы ферментов. Действие многих ферментов зависит от активаторов и парализаторов. Многие ферменты, содержащие тиоловые группы, активируются незначительными количествами сульфгидрильных соединений, к которым относятся цистеин, глутатион и др. Инактивирование ферментов происходит под влиянием белковых осадителей.

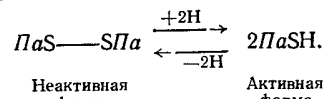
Метод комплексного, дифференцированного определения ВОНВЛОСС и восстановительного глутатиона (по К. П. Петрову).

В клетках растений, а также животных содержатся некоторые водорастворимые, относительно низкомолекулярные, высокорекреационные, легкоокисляющиеся сульфгидрильные соединения (ВОНВЛОСС) типа восстановительного глутатиона, цистеина и др. Глутатион — важнейший представитель этой группы (его открыл Ф. Гопкинс) — состоит из остатков гликокола, цистеина и глютаминовой кислот, связанных в виде трипептида: глютаминил — цистеил — гликокол.

Глутатион обнаружен во всех клетках. Очень много его в зародыше пшеничного зерна и в дрожжах. Он является переносчиком водорода в окислительно-восстановительных реакциях. SH-глутатион повышает активность некоторых ферментов и, в частности, протеолитических, при этом часто снижает качество муки и выпекаемого из нее хлеба. Окислительно-восстановительную реакцию глутатиона можно представить следующим образом:



Эта реакция оказывает влияние на повышение активности папаина:



При повышении активности папаина увеличивается гидролитическое расщепление белков муки, клейковины, дрожжей и других растительных продуктов. Расщепление белков часто сопровождается снижением качества продуктов. Так, например, в хлебопекарном производстве для предотвращения разрушения клейковины под действием папаина окисляют накапливающийся SH-глутатион с помощью таких окислителей, как KBrO_3 и дегидроаскорбиновая кислота (витамин С).

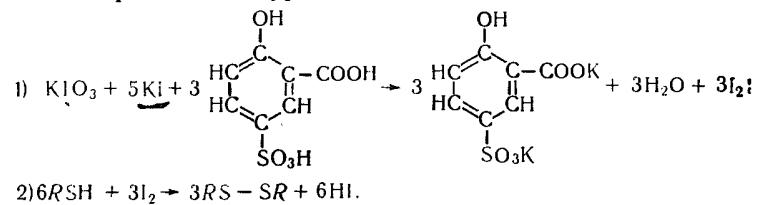
Восстановленная форма глутатиона в очень больших количествах накапливается при прорастании зерна и при старении дрожжей, что резко снижает качество пищевых продуктов. Таким образом, определение глутатиона имеет исключительно важное значение.

Известно, что окислительно-восстановительные процессы, связанные с тиоловыми соединениями, протекают в водной среде, а поэтому на тиоловые ферменты оказывают активирующее влияние не только глутатион, но и вся сумма водорастворимых соединений ВОНВЛОССа, действующих с повышенной активностью как синергетический комплекс. Было установлено, что вещества, содержащие ВОНВЛОСС, сильно активируют процесс брожения, дыхания и в целом метаболизма.

Определение ВОНВЛОССа и SH-глутатиона имеет не только теоретическое, но и производственное (прикладное) значение. Настоящий метод отличается простотой, быстротой и легкостью выполнения, его применяют для контроля как в пищевой промышленности, так и в других смежных областях.

В основу метода была положена окислительная иодометрическая реакция, протекающая в кислой среде с микроколичеством иода, не превышающем 6 мкг ($6 \cdot 10^{-6}$ г), при титровании 0,001 н. KIO_3 .

Реакция протекает по уравнению



Количество SH-глутатиона устанавливают по разности определения указанных SH-соединений до и после осаждения его сульфатом кадмия. Анализ суммы ВОНВЛОССа и SH-глутатиона проводят одновременно в одной пробе.

Известно, что альдегиды и редуцирующие сахара вступают в реакцию с иодом только в сильно щелочной среде и при очень больших количествах иода, превышающих принятое нами микроколичество в 2000 раз, т. е. если иода в реакционной среде не менее 12 мг (см. «Определение редуцирующих сахаров и альдегидов»).

Приготовление некоторых реактивов. 1 М раствор сульфосалициловой кислоты — 21,8 г сухой (безводной) сульфосалициловой кислоты помещают в мерную колбу емкостью 100 мл и дистиллированной водой доводят до метки. 4%-ный раствор сульфосалициловой кислоты — 45,6 мл 1 М раствора помещают в мерную колбу на 250 мл и доводят водой до метки. 0,001 н. рабочий раствор KIO_3 (вначале готовят стойкий 0,005 н. раствор KIO_3 , растворяя 0,1783 г KIO_3 дистиллированной водой в мерной колбе на 1 л, потом перед определением готовят нестойкий рабочий раствор, смешивая в мерной колбе на 250 мл 50 мл 0,005 н. раствора KIO_3 с 22,8 мл 1 М раствора сульфосалициловой кислоты и доводят водой до метки).

Методика опыта. 1. В мерную колбу емкостью 100 мл вносят навеску исследуемого материала 10 г. Постепенно, помешивая, приливают около 80 мл дистиллированной воды и взбалтывают в шуттель-аппарате (или вручную). В хорошо перемешанную смесь медленно при постоянном помешивании добавляют 5 мл 1 М раствора сульфосалициловой кислоты, еще раз перемешивают и оставляют стоять на 30 мин, после чего содержимое колбы доводят водой до метки и сильно встряхивают, затем центрифугируют или фильтруют. После центрифугирования осторожно, чтобы не захватить осадка, центрифугат декантируют при помощи специального приспособления (рис. 19). В центрифужную пробирку через резиновую пробку 5 опускают стеклянную трубку 1 с изогнутым концом 2, который поднимается над осадком 3, затем осторожно выдувают центрифугат 4.

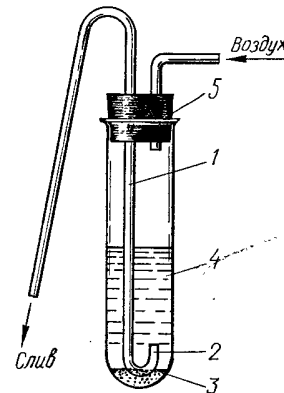


Рис. 19. Приспособление для декантирования центрифугата.

2. Пипеткой Мора отбирают 50 мл прозрачного центрифугата, т. е. половину навески (5 г), помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, добавляют 40 мл 5%-ного раствора сульфата кадмия и 4 мл 1 н. раствора NaOH , взбалтывают и доводят водой до метки. Оставляют стоять на 30 мин (осаждается глутатион), затем центрифугируют и осторожно, чтобы не захватить осадка, декантируют при помощи специального приспособления (рис. 19).

3. Пипеткой Мора отбирают 50 мл (т. е. 2,5 г первоначальной навески) прозрачного центрифугата после осаждения глутатиона в колбу Эрленмейера на 150 мл. В колбу добавляют при помешивании 2,5 мл 4%-ного раствора сульфосалициловой кислоты и 2,5 мл 5%-ного раствора KI , который приготавливают ежедневно, проверяя его на наличие свободного иода (качественная реакция с крахмалом). К анализируемой пробе прибавляют 10 капель 1%-ного раствора крахмала и титруют 0,001 н. раствором KIO_3 до появления устойчивой синей окраски. Если объем раствора KIO_3 , идущий на титрование, небольшой, пользуются микробюреткой. Для контроля чистоты реактивов титруют 50 мл дистиллированной воды в указанных условиях.

4. В колбу Эрленмейера на 150 мл отмеряют пипеткой Мора 25 мл центрифугата, полученного до осаждения глутатиона сульфатом

кадия, что равно 2,5 г первоначальной навески, добавляют 25 мл дистиллированной воды и ведут определение подобно определению после осаждения глутатиона. Для контроля чистоты реактивов титруют 50 мл дистиллированной H_2O в соответствующих условиях. Контрольные определения проводят при получении новой партии реактивов. Для имеющейся партии реактивов достаточно одно-двух контрольных титрований на чистоту реактивов. Формула расчета

$$x = A - B,$$

где x — количество SH-глутатиона в мг%; A — суммарное количество ВОНВЛОССа до осаждения $CdSO_4$, определенное в п. 4, в условном пересчете на SH-глутатион, мг%; B — остаточное количество ВОНВЛОССа после осаждения $CdSO_4$, определенное в п. 3, в условном пересчете на SH-глутатион, мг%.

A и B вычисляют по отдельной формуле, где $A = (a - a_1) 12,28$; $B = (b - b_1) 12,28$; a — объем 0,001 н. раствора KIO_3 , пошедший на титрование пробы по п. 4, мл; a_1 — объем 0,001 н. раствора KIO_3 , пошедший на титрование контроля к пробе по п. 4, мл; b — объем 0,001 н. раствора KIO_3 , пошедший на титрование пробы по п. 3, мл; b_1 — объем 0,001 н. раствора KIO_3 , пошедший на титрование контроля к пробе по п. 3, в условиях п. 2 и 3, мл; 12,28 — коэффициент пересчета на SH-глутатион.

Если вещество содержит 100—600 мг% и выше ВОНВЛОССа и 50—300 мг% и выше SH-глутатиона, считают, что оно обладает высокой активирующей способностью. Оно сильно повышает активность тиоловых ферментов, т. е. в сильной мере ускоряет процесс брожения, дыхания и метаболизма. Указанное каталитически активное вещество с целью повышения активности процесса брожения и дыхания вводят в среду, подлежащую активированию, или в производственную смесь из расчета 0,2 мг% SH-глутатиона в бродильной или другой питательной среде. Расчет ведут по ВОНВЛОССу в условном пересчете на SH-глутатион по указанной выше формуле.

Пример расчета. Исследовалась заводская бражка после выращивания дрожжей и сепарации. На титрование пробы и контроля по п. 4 пошло соответственно 12,07 (a) и 0,15 мл (a_1) 0,001 н. раствора KIO_3 . На титрование пробы и контроля по п. 3 пошло соответственно 7,67 (b) и 0,10 мл (b_1) 0,001 н. раствора KIO_3 . Подставляем в формулу полученные результаты титрования:

$$[(12,07 - 0,15) 12,28 - (7,67 - 0,10)] 12,28 = 145,5 - 93,0 = 52,3.$$

Таким образом, количество ВОНВЛОССа в условном пересчете на SH-глутатион равно 145,3 мг%, а количество SH-глутатиона — 52,3 мг%.

Для активирования процесса брожения, как уже указывалось выше, необходимо 0,2—0,3 мг% SH-глутатиона. Исходя из того, что 1 г бражки содержит ВОНВЛОССа в пересчете на SH-глутатион 0,15 мг как активатор, в бродильную смесь необходимо добавлять около 2% бражки.

Определение окисленных ВОНВЛОССа и глутатиона.

Методика опыта. Пипеткой Мора отбирают 50 мл прозрачного центрифугата, полученного по вышеописанному методу п. 1, т. е. половину навески (5 г) помещают в колбу Эрленмейера емкостью 100 мл, добавляют 100 мг цинковой пыли. Колбу нагревают на водяной бане

пока вся пыль не перейдет в раствор. Выделившийся при этом атомарный водород в кислой среде восстанавливает окисленные ВОНВЛОСС и глутатион. Фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу емкостью 100 мл. Фильтрат теряет лишь небольшую часть своей кислотности. Фильтр несколько (3—5) раз промывают небольшими порциями горячей воды. Фильтрат оставляют на 1 ч для охлаждения при комнатной температуре. Содержимое мерной колбы доводят дистиллированной водой до метки и определяют ВОНВЛОСС и SH-глутатион по описанному выше методу (п. 2, 3 и 4).

Формула расчета следующая:

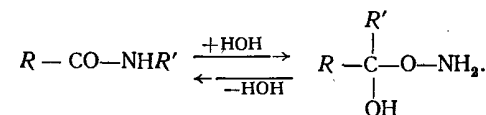
$$x = (a - b) 12,38 - d,$$

где x — количество окисленных ВОНВЛОСС или глутатиона, мг%; $(a - b)$ — разность объемов 0,001 н. растворов KIO_3 , израсходованных на титрование в рабочем и контрольном опытах, мл; d — количество восстановленных ВОНВЛОСС или глутатиона, содержащихся в исследуемом продукте (по предыдущему определению), мг%.

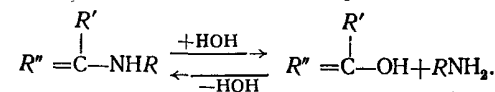
Гидролазы

Гидролазы подразделяются на четыре группы:

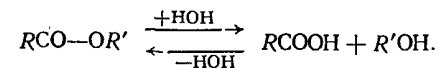
1. **Протеазы** — катализируют расщепление пептидной связи:



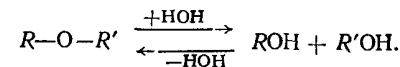
2. **Амидазы** — катализируют реакцию расщепления амидов кислот:



3. **Эстеразы** — катализируют расщепление эстеров (сложных эфиров):



4. **Карбогидразы** — катализируют расщепление карбонильных групп (гликозидной связи):



Протеазы

Гидролитическое расщепление белковых веществ катализируют по месту пептидных связей. Реакция ферментативного гидролиза обратимая.

Протеазы подразделяют на протеиназы и пептидазы. Протеиназы ведут гидролиз непосредственно нативных (природных) белков.

Представителями протеиназ являются растительные папаины и животные пепсин, трипсин и др. Следует отметить, что кроме белков они гидролизуют и различные полипептиды и дипептиды.

Пептидазы действуют только на пептиды, причем они обладают большой специфичностью действия. Их действие на субстрат зависит от расположения в нем отдельных химических группировок. По характеру своего действия они делятся на аминопептидазы и карбоксипептидазы. Первые укорачивают полипептидную цепочку с аминного конца, вторые — с карбоксильного:



Есть дипептидазы, которые гидролизуют дипептиды.

Изменение активности растительных протеиназ зависит от периода развития растения. Так, при прорастании семян повышается их протеолитическая активность наряду с повышением активности других ферментов. У незрелых семян ферментативная активность также повышена.

Повышенная ферментативная активность проросшего или незрелого зерна пшеницы нередко отрицательно влияет на качество муки и готового хлеба. С повышением протеолитической активности снижается эластичность клейковины муки вследствие гидролиза ее белков.

Повышение протеолитической активности зерна, кроме того, сопровождается интенсивным накоплением аминокислот в продуктах его переработки. Аминокислоты же являются источником ряда соединений (меланоидины, эфиры, сивушные масла и т. п.), образующихся при различных технологических процессах (в хлебопечении, в бродильном производстве и др.). Эти соединения обуславливают вкус, цвет и аромат готовых продуктов и влияют на их качество.

Протеолитические ферменты оказывают большое влияние на качество дрожжей. С увеличением протеолитической активности дрожжей повышается степень автолиза и резко снижается их качество.

Таким образом, определение протеолитической активности растительного сырья и продуктов его переработки имеет исключительно важное значение.

Протеолитическую активность ферментов определяют по характеру расщепления белковых веществ и по количеству образующихся продуктов гидролиза. Количество аминокислот можно определять следующими способами:

- по содержанию азота аминогрупп или по карбоксильным группам;
- по нарастанию количества водорастворимых белковых веществ;
- по измерению вязкости растворов желатина;
- по увеличению количества небелковых азотистых соединений, не осаждаемых характерными осадителями белков;
- на основании индивидуального учета некоторых аминокислот, образующихся при гидролизе белкового субстрата (например, серосодержащих аминокислот, тирозина).

Об интенсивности протеолиза можно судить по количеству исчезнувшего субстрата или по количеству продуктов гидролиза. Для определения протеолитической активности ферментов в качестве белкового субстрата используют препараты эдестина, яичного альбумина, желатина, казеина и др. Вытяжку готовят, настаивая исследуемый материал на воде, водном растворе глицерина, а также на слабокислом или слабощелочном буферных растворах. Иногда настаивание бывает довольно продолжительным. В отдельных случаях при настаивании материала с водой применяют активаторы, например цистеин, H_2S , цианид и др. Такое же активирование применяют и в опытах по автолизу. При определении активности протеаз учитывают, что в вытяжках могут быть активаторы и парализаторы.

При определении активности пептидаз в качестве субстрата применяют различные пептиды, чаще всего глицил-глицин, лейцил-лейцин и другие дипептиды. Определение в этом случае ведут в слабощелочной среде.

Определение протеолитической активности ферментов муки в болтушке. Навеску муки (10 г) растирают в ступке с битым стеклом, добавляя такое же количество воды, чтобы получилась кашка. Растертую навеску количественно переносят в мерную колбу емкостью 200 мл и смешивают со 150 мл воды.

Колбу помещают в шуттель-аппарате и при самом малом качании экстрагируют растворимые вещества. После этого содержимое колбы доводят водой до метки и хорошо перемешивают. Отбирают пипеткой Мора 10 мл болтушки, наливают в колбу Эрленмейера емкостью 100 мл, в которую прибавляют 20 мл воды, 10 мл фосфатного буфера с $\text{pH}=5,5$, 2 мл толуола и 10 мл 10%-ного водного раствора пептона или белкового препарата, выделенного из этой же муки. Колбу закрывают корковой пробкой и помещают в термостат для инкубации на 48 ч при температуре $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

Рекомендуется ставить по две параллельные пробы опыта и контроля. В контрольных опытах смесь предварительно кипятят 5 мин. В рабочих опытах смесь кипятят 5 мин после 48-часовой инкубации. Кипячение обычно проводят с обратным холодильником одинаковой длины. После кипячения смесь количественно (с водой) переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, доводят содержимое колбы водой до метки, хорошо перемешивают, фильтруют через складчатый фильтр и во взятом объеме фильтрата определяют аминный азот формольным титрованием со смешанными индикаторами или потенциометрическим титрованием.

Определение протеолитической активности ферментов муки в водных экстрактах. Болтушку муки получают по способу, описанному в предыдущей методике. Содержимое мерной колбы емкостью 200 мл после доведения водой до метки фильтруют через складчатый фильтр. В фильтрате определяют протеолитическую активность с добавлением пептона или другого белкового субстрата. Определение проводят таким же способом, как и в предыдущем случае.

Определение активности пептидаз. Субстратом служат различные ди- и трипептиды. Чаще всего берут глицил-глицин или лейцил-глицин и др.

Приготовление субстрата. 800 мл 1/15 M раствора Na_2HPO_4 смешивают с 200 мл 1/15 M раствора KH_2PO_4 и в 1 л данного фосфатного буфера растворяют 5,31 г глицил-глицина.

Методика опыта. К субстрату добавляют испытуемую вытяжку и инкубируют в термостате при 40°C 1—2 ч. После инкубации определяют азот по Ван-Слайку или методом формольного титрования со смешанными индикаторами, пользуясь для титрования 0,01 н. раствором NaOH из микробюретки. Каждый опыт сопровождают контролем.

Определение автолитической активности пшеничной муки.

Методика опыта. К 50 г пшеничной муки приливают 500 мл дистиллированной воды ($\text{pH} = 7,0$) и 0,5 мл толуола. Смесь инкубируют в термостате 1 ч при температуре 37°C . Во время инкубации смесь тщательно перемешивают. Затем доводят объем до 1 л, фильтруют и в фильтрате определяют азот аминокислот формольным или потенциометрическим титрованием. Параллельно ставят контрольный опыт, в котором формольное титрование проводят до инкубирования.

Количество аминокислот x , которые образуются при действии протеолитических ферментов, содержащихся в 100 г исследуемого продукта (в мг), определяют по формуле

$$x = \frac{(a - b) 1,4v \cdot 100}{v_1g},$$

где a — количество 0,1 н. раствора NaOH, израсходованного на титрование в рабочем опыте, мл; b — количество 0,1 н. раствора NaOH, израсходованного на титрование в контроле, мл; v_1 — количество фильтра, взятого для определения аминного азота, мл; v — количество полученной болтушки (в мерной колбе), мл; g — навеска исследуемого материала, г.

Пример расчета. Для формольного титрования отобрано по 100 мл фильтрата из общего объема мерной колбы емкостью 1000 мл. На титрование двух параллельных проб рабочего опыта пошло соответственно 12,41 и 12,63 мл исследуемого фильтрата. Таким образом, в среднем на один опыт израсходовано:

$$\frac{12,41 + 12,63}{2} = 12,52 \text{ мл } 0,1 \text{ н. раствора NaOH.}$$

На титрование двух параллельных контрольных проб пошло в первом случае 0,21 мл, во втором — 0,25 мл 0,1 н. раствора NaOH. Навеска муки 50 г. Содержание азота аминокислот в исследуемом продукте (в мг) вычисляем по формуле

$$x = \frac{(12,52 - 0,23) 1,4 \cdot 1000 \cdot 100}{100 \cdot 50} = 344 \text{ мг } \%$$

Рефрактометрический метод определения протеолитической активности ферментов (по К. П. Петрову). Метод основан на изменении рефракции гидролизатов вследствие накопления в них растворимых продуктов расщепления белкового субстрата.

Для определения протеолитической активности ферментов предварительно готовят дрожжевую суспензию или водные вытяжки из муки, солода и другого растительного материала. В качестве белкового субстрата берут обезжиренный казеин. Казеин наиболее легко расщепляется протеиназами. Кроме того, он принадлежит к нативным белкам, расщепляемым пептидазами.

Приготовление препаратов. Дрожжевая суспензия — в колбу помещают 1 часть прессованных дрожжей и 5 частей дистиллированной воды, плотно закрывают пробкой и взбалтывают в течение 1 ч в шуттель-аппарате. Водная вытяжка из муки, солода и другого растительного материала. В колбу помещают 1 часть исследуемого материала и 5 частей дистиллированной воды. Колбу плотно закрывают пробкой и взбалтывают в течение 1 ч в шуттель-аппарате. Затем смесь центрифугируют. Для исследования отбирают прозрачный центрифугат. Казеин — товарный казеин мелко измельчают в лабораторной мельнице или ступке и просеивают через металлическое сито (с отверстиями диаметром 0,2—0,3 мм). Крупные кусочки измельчают дополнительно. Измельченный казеин (порошок) хранят над серной кислотой или обезвоженным CaCl_2 в эксикаторе 3—4 дня.

Для проведения опыта необходимо 20 пробирок диаметром 10 мм, высотой 85 мм и толщиной стенок 1 мм. Пробирки должны плотно закрываться пробками со вставленными в них оттянутыми на конце стеклянными палочками, достигающими дна (рис. 20).

Пробирки и стеклянные палочки перед каждым определением предварительно обрабатывают хромовой смесью, тщательно промывают водой (10 раз простой и 3 раза дистиллированной), сушат в сушильном шкафу и хранят в открытом виде в эксикаторе.

Для определения протеолитической активности ферментов в исследуемом материале пользуются прецизионным рефрактометром РПЛ. Можно также использовать и другие системы прецизионных рефрактометров.

Постоянную температуру призм (20°C) поддерживают универсальным термостатом.

Методика опыта. В две заранее приготовленных пробирки (из эксикатора) помещают взвешенные на аналитических или торзионных весах навески по 0,3000 г казеина. Навески взвешивают на тонкой глянцево-бумаге (можно взять кальку), которой придана соответствующая форма (рис. 21), чтобы навеска казеина легко и полностью выпала в пробирку.

К навескам казеина приливают 1 мл прозрачного центрифугата водной вытяжки или дрожжевой суспензии (в зависимости от исследуемого объекта) и добавляют по одной капле толуола. Затем пробирки быстро закрывают плотно пробками так, чтобы стеклянные палочки касались дна.

Смесь тщательно перемешивают палочками, не открывая пробок. Кроме того, содержимое пробирок легко встряхивают, постукивая по ним пальцами. Капельки жидкости и казеина, прилипшие к стенкам пробирок, тщательно снимают стеклянной палочкой и смешивают с остальной реакционной смесью. Массу необходимо тщательно перемешать, чтобы не осталось сухого казеина и смесь была однородной.

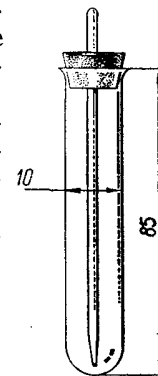


Рис. 20. Пробирка для проведения ферментативного гидролиза субстрата.

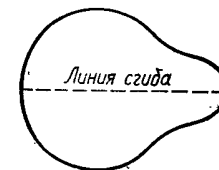


Рис. 21. Бумага для взвешивания сухого субстрата.

Одну пробирку (контрольную) нагревают, не открывая пробки, 10 мин на водяной бане при 95° С (для инактивации ферментов), а затем охлаждают до комнатной температуры. Пробирки с контрольной и рабочей смесью помещают в термостат на 20 ч при температуре 37° С. По окончании инкубации активную рабочую смесь также инактивируют, нагревая ее на водяной бане при 95° С 10 мин, затем охлаждают до комнатной температуры.

Содержимое пробирок снова хорошо перемешивают стеклянными палочками, стараясь не открывать пробирки, и центрифугируют со скоростью от 1500 до 2500 об/мин.

В центрифугате определяют показатель рефракции. Когда центрифугат наносят на призму рефрактометра, взмучивать его нельзя. Поэтому пробирку перед тем, как открыть пробку, наклоняют, давая центрифугату стечь к пробке. Затем осторожно открывают пробку и в зазор, образовавшийся между пробкой и краем пробирки, выпускают одну каплю прозрачной жидкости, перенося ее на основание призмы. Если центрифугата мало (2—3 капли), то, перевернув пробирку пробкой вниз, осторожно извлекают стеклянную палочку и переносят этой палочкой центрифугат на призму. За показатель протеолитической активности ферментов принимают разность показаний в рабочем и контрольном опытах. Проводят по два параллельных опыта. Расхождение между параллельными опытами должно быть не более 3% полученных величин. Если расхождения больше, опыт повторяют. Для муки, солода и других растительных материалов разность показаний рефрактометра относят к исходному воздушно-сыхому материалу, умножая ее на 6, т. е. на кратность разбавления.

Для дрожжей эту разность относят к суспензии, содержащей 1 миллион дрожжевых клеток в 1 мм³, а количество дрожжей подсчитывают в камере Горяева (методика, принятая в микробиологии). Например, если установленная разность показаний рефрактометра равна 10, а количество подсчитанных дрожжевых клеток в суспензии 2 миллиона в 1 мм³, то рефрактометрический показатель протеолитической активности этих дрожжей будет равен $\frac{10}{2}$. Поскольку иногда трудно подсчитать

количество дрожжевых клеток, то при контроле производства можно условно отнести полученную разность к навеске прессованных или жидких дрожжей. В этом случае умножают полученную разность рефрактометрических показателей рабочего и контрольного опытов на степень разбавления дрожжей, т. е. так, как и при определении протеолитической активности ферментов муки.

Рефрактометрические показатели протеолитической активности по прецизионному рефрактометру марки РПЛ выражают в миллиграмм-процентах азота растворимых продуктов протеолиза, умножая их на 45. Установлено, что при увеличении концентрации азота растворимых продуктов протеолиза на 45 мг% показания рефрактометра увеличиваются на единицу. Формула протеолитической активности растительных продуктов выражает количество (в мг%) азота растворимых продуктов протеолиза, образующегося при действии на белковый субстрат (казеин) ферментов, содержащихся в 100 г исследуемого вещества,

в течение 24 ч при температуре 37° С:

$$ПА = \left[\frac{(a - b) 6 \cdot 24}{\tau} \right] 45,$$

где ПА — протеолитическая активность продукта, мг%; (a — b) — разность показаний рефрактометра в рабочем и контрольном опытах; 6 — степень разбавления исходного материала (по методике); 45 — коэффициент пересчета азота растворимых продуктов протеолиза, накапливающихся в гидролизатах, мг%; τ — продолжительность инкубации, ч.

Протеолитическую активность для дрожжей вычисляют по количеству клеток, содержащихся в исследуемой суспензии. Формула расчета приобретает иной вид, т. е. протеолитическую активность дрожжей выражают в миллиграмм-процентах (мг%) азота продуктов протеолиза, образующихся при воздействии ферментов дрожжевой эмульсии, содержащей 1 миллион клеток в 1 мм³, в течение 24 ч при 37° С:

$$ПА = \left[\frac{(a - b) 24}{\tau n} \right] 45,$$

где ПА — протеолитическая активность дрожжей, мг%; (a — b) — разность показаний рефрактометра в рабочем и контрольном опыте; τ — продолжительность инкубации, ч; n — количество миллионов дрожжевых клеток в 1 мм³ исследуемой суспензии.

Пример расчета. 1. Для исследования взята пшеничная мука первого сорта. Показания рефрактометра в рабочем и контрольном опытах соответственно равны 11,81 и 3,67. Пробы инкубировали 20 ч. Чтобы определить протеолитическую активность муки (в мг%), подставляем полученные результаты в формулу

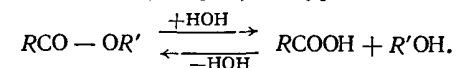
$$ПА = \frac{(11,81 - 3,67) 6 \cdot 24}{20} \cdot 45 = 2637.$$

2. Для исследования были взяты прессованные пекарские дрожжи. Показания рефрактометра в рабочем и контрольном опытах соответственно равны 22,20 и 14,96. Пробы инкубировали 20 ч. Количество дрожжевых клеток в 1 мм³ суспензии — 2,35 миллиона. Для определения протеолитической активности прессованных пекарских дрожжей (в мг%) подставляем полученные результаты в формулу

$$ПА = \frac{(22,20 - 14,96) 24}{20 \cdot 2,35} \cdot 45 = 167.$$

Эстеразы

Эстеразы относятся к группе ферментов, которые катализируют гидролиз сложных эфиров (эстеров) по уравнению

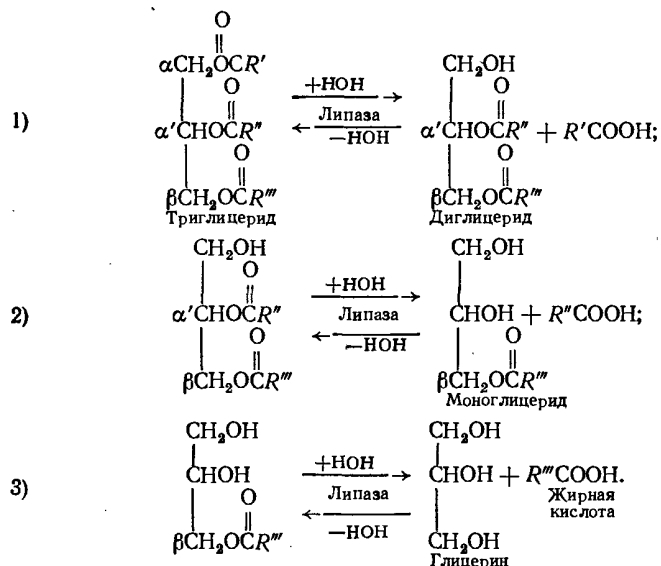


Эстеразы широко распространены в природе. Это — липазы, фосфатазы, сульфатазы, пектинэстераза, фитаза и др.

Определение активности липаз. Липазы являются представителями широко распространенных в природе гидролитических ферментов — эстераз. Липазы катализируют процесс гидролиза жиров до глицерина

и жирных кислот. Как известно, в жирах наряду с триглицеридами (сложными эфирами трехатомного спирта глицерина и жирных кислот) содержатся ди- и моноглицериды. Поэтому полагают, что процесс ферментативного гидролиза жиров идет ступенчато; вначале быстро гидролизуются α - и α' -связи, а потом идет медленный гидролиз β -моноглицеридов.

Процесс ступенчатого гидролиза жиров можно представить следующей схемой:



Жирорасщепляющую активность липаз определяют методом титрования жирных кислот, образующихся при гидролизе жиров.

Приготовление фосфатного буфера с pH=7,4—смешивают 800 мг 1/15 M раствора Na_2HPO_4 с 200 мл 1/15 M раствора KH_2PO_4 .

Методика опыта. (Температура должна быть 20°C). В небольшой склянке или колбе емкостью 30—50 мл взвешивают 3,00 г (с точностью до 0,01 г) оливкового или подсолнечного масла, добавляют к нему 2 мл фосфатного буфера и сильно встряхивают. Затем добавляют 1 г муки и 3 мл воды, закрывают колбу плотно пробкой, перемешивают, ставят в шуттель-аппарат и умеренно взбалтывают в течение 1 ч. По истечении этого времени смесь количественно переносят в колбу Эрленмейера, остатки со стенок колбы смывают 60 мл смеси спирта с эфиром (1 : 1). Жирные кислоты, образовавшиеся при гидролизе жира, титруют 0,05 н. раствором КОН с 2—3 каплями фенолфталеина. Параллельно ставят контрольный опыт: в колбу насыпают 1 г муки и наливают 3 мл воды, смесь хорошо перемешивают, закрывают плотно пробкой и нагревают 5 мин на кипящей водяной бане. Затем охлаждают, добавляют 3 г масла и далее поступают, как в рабочем опыте. Активность липазы выражают в миллилитрах 0,1 н. раствора КОН,

необходимого для нейтрализации жирных кислот, образующихся при ферментативном гидролизе, в 1 г жира. Активность (x) вычисляют по формуле

$$x = \frac{(a-b)K}{g},$$

где a — количество раствора КОН, израсходованное на титрование в рабочем опыте, мл; b — количество раствора КОН, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл; g — навеска жира, г; K — поправочный коэффициент к 0,1 н. раствору КОН.

Определение активности липаз в масле и жиросодержащем сырье. Для исследования берут ядра обрубленных семян подсолнечника или необрубленные семена других маслических культур либо жиросодержащее сырье.

Приготовление фосфатного буфера с pH=5 — в 100 мл дистиллированной воды растворяют 1,1876 г Na_2HPO_4 , в 1 л дистиллированной воды растворяют 9,078 г KH_2PO_4 . В мерную колбу на 100 мл вносят 1 мл раствора Na_2HPO_4 и доводят раствором KH_2PO_4 до метки.

Методика опыта. В два бюкса насыпают по 5,00 г исследуемого материала и определяют их влажность. Отдельно берут еще две навески по 5,00 г для определения активности липазы. Эти навески суспензируют с небольшим количеством воды в фарфоровой ступке или в гомогенизаторе (рис. 22) в продолжении 5—10 мин. Гомогенизатор состоит из сосуда 1 емкостью 100 мл, в котором вращаются при помощи электромотора 2 ножи 3 со скоростью 3000 об/мин, превращая помещенную в сосуд пробу в гомогенную массу. Полученную суспензию количественно переносят в мерную колбу емкостью 200 мл и доводят дистиллированной водой до метки.

Пипеткой Мора с немного расширенным нижним отверстием отбирают 25 мл хорошо перемешанной суспензии и выливают в колбу Эрленмейера емкостью 250 мл. Затем добавляют 20 мл 10%-ной эмульсии подсолнечного масла в воде, приготовленной в гомогенизаторе с добавлением 1% фосфатидов (Ca_3P_2 или Mg_3P_2) для большей стойкости, и 10 мл фосфатного буфера.

К полученной смеси добавляют 2—3 капли толуола, чтобы предотвратить микробиологические процессы, закрывают колбу пробкой и ставят в термостат при 35 — 38°C на сутки. После инкубации туда же добавляют 50 мл спиртоэфирной смеси (4 : 1) и титруют 0,1 н. раствором щелочи в присутствии фенолфталеина. Параллельно ставят контрольный опыт, в котором суспензию перед определением кипятят для инактивирования липазы.

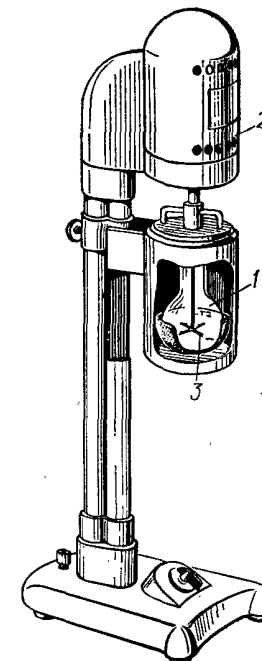


Рис. 22. Гомогенизатор.

Активность липазы рассчитывают по формуле

$$AL = \frac{(v_1 - v_0) K \cdot 800}{g (100 - B)}$$

где AL — активность липазы, мл (количество 0,1 н. раствора щелочи, израсходованное на нейтрализацию свободных жирных кислот, образовавшихся при каталитическом воздействии липазы, содержащейся в 1 г исследуемого материала)¹; v_1 — объем 0,1 н. раствора щелочи, израсходованной на титрование в рабочем опыте, мл; v_0 — объем 0,1 н. раствора щелочи, израсходованной на титрование в контрольном опыте,

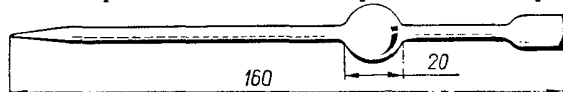


Рис. 23. Сталагмометр.

мл; K — поправочный коэффициент к 1 н. раствору щелочи; 800 — коэффициент, полученный в результате сокращения $\frac{(200 \cdot 100)}{25}$; g — навеска исследуемого образца; B — влажность исследуемого образца.

Кроме описанных методов в лабораторной практике применяют сталагмометрический метод определения липолитической активности ферментов. Метод основан на уменьшении поверхностного натяжения воды при добавлении три- и монобутерина. Продукты же гидролиза, глицерин и натриевые соли жирных кислот почти не влияют на поверхностное натяжение.

Липолитическую активность фермента измеряют сталагмометром, который представляет собой пипетку, заканчивающуюся небольшим капилляром (рис. 23). Об активности фермента судят по изменению количества капель гидролизата, падающих из сталагмометра, в единицу времени при определенной температуре. Этот метод простой и точный.

Представляет также интерес известный метод колориметрического определения липолитической активности ферментов по расщеплению сложных эфиров фенола и различных органических кислот (фенилбензоата, фенилацетата и др.). Фенол, освобождающийся при ферментативном гидролизе, легко можно определить колориметрически. Этот метод отличается исключительно высокой чувствительностью и позволяет вести определение липаз в микроколичествах.

Определение активности фосфатаз. Фосфатазы содержатся во всех клетках растений и животных. Они играют исключительно важную роль в процессе обмена веществ. Фосфатазы относятся к эстеразам, катализируют процесс гидролиза сложных эфиров фосфорной кислоты.

Фосфатазы отличаются одна от другой по субстрату, на который они действуют. Поэтому их делят на монофосфатазы, гидролизующие моноэфиры фосфорной кислоты (глюкозо-1-фосфат, глюкозо-6-фосфат и так далее) и дифосфатазы, расщепляющие диэфиры фосфорной кислоты. Известны такие ферменты, как фитаза, которая отщепляет остатки

¹ Активность липазы может быть выражена в миллиграммах щелочи, израсходованной на нейтрализацию свободных жирных кислот, образующихся при липолитическом расщеплении масла или жира ферментом, содержащемся в 100 г исследуемого сырья, т. е. в мг%. Однако методики это не меняет.

фосфорной кислоты от инозитфосфорной кислоты, картофельная «апираза», отщепляющая два остатка фосфорной кислоты от АТФ, и т. д. Кроме того, фосфатазы делятся по оптимуму рН на кислые, действующие на субстрат при рН = 3,0 ÷ 4,0, и щелочные, действующие при рН около 9,0. В пшеничном зерне и в клубнях картофеля обнаружены высокоактивные фосфатазы. В дрожжах найдены фосфатазы с оптимумом рН = 4,0 и рН = 6,0 ÷ 7,0.

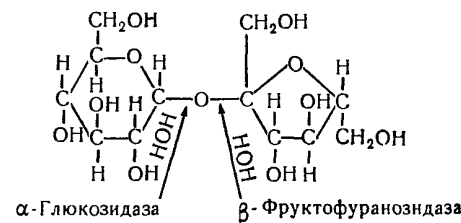
В основу методов определения фосфатазной активности положен принцип осуществления ферментативного гидролиза какого-либо фосфата в присутствии соответствующего буфера при определенной температуре и рН. Активность фермента определяют по количеству отщепившейся H_3PO_4 .

В качестве субстрата служат α -глицерофосфат, β -глицерофосфат, фенолфталеинфосфат натрия и др. В каждом отдельном случае берут определенный фосфат.

Существует несколько методов определения фосфатазной активности продуктов. Для каждого вида фосфатаз разработаны свои методы: например, методы определения щелочных фосфатаз, кислых фосфатаз, фосфатаз растительного и животного происхождения и т. д. Универсального метода, который в той или иной мере мог бы служить общим методом для данной группы ферментов, нет. В каждом отдельном случае рекомендуют использовать определенный известный метод.

Карбогидразы

Карбогидразы относятся к группе гидролаз, они катализируют расщепление гликозидных связей, гидролиз и синтез гликозидов, ди-, три-, тетра- и полисахаридов. Карбогидразы делятся на олигазы и полиазы. Олигазы расщепляют олигосахариды (полисахариды первого порядка). Полиазы расщепляют полисахариды второго порядка. К олигазам относятся: α -глюкозидаза, расщепляющая мальтозу, сахарозу и трегалозу; β -глюкозидаза, катализирующая гидролиз целлобиозы, гентибиозы и салицина; β -фруктофуранозидаза, катализирующая гидролиз сахарозы, раффинозы, стахиозы и других веществ; α -галактозидаза, расщепляющая мелибиозу, раффинозу и стахиозу; β -галактозидаза, расщепляющая молочный сахар — лактозу. β -Фруктофуранозидазу называют еще сахаразой, так как она катализирует инверсию сахарозы, а поэтому этот фермент имеет еще третье название — инвертаза. β -Фруктофуранозидаза действует на β -фруктофуранозидную связь в сахарозе, раффинозе, стахиозе и других веществах и отщепляет от них β -D-фруктозу.



Как видно из приведенной формулы, сахара подвергается каталитическому воздействию двух ферментов: α -глюкозидазы и β -фруктофуранозидазы, которые расщепляют ее с одинаковой силой и скоростью. α -Глюкозидаза (мальтаза) и β -фруктофуранозидаза распространены в растениях, они содержатся в дрожжах, плесневых грибах, бактериях и в тканях высших растений. Много мальтазы в солоде.

В пищевой промышленности α -глюкозидаза и β -фруктофуранозидаза играют важную роль. Эти ферменты имеют большое значение для хлебопекарного и бродильных производств. Катализируя гидролиз сахарозы и мальтозы, они готовят их для дальнейшего сбраживания. Как правило, β -фруктофуранозидаза и α -глюкозидаза, содержащиеся в дрожжах, обладают высокой активностью. Дрожжи с низкой мальтазной активностью не пригодны для хлебопекарного и бродильных производств.

Наряду с положительным действием инвертазы и мальтазы могут играть и отрицательную роль в пищевом производстве. Эти два фермента содержатся в корнеплодах сахарной свеклы. Их активность особенно повышается в начальный период хранения и при механическом повреждении корнеплодов. Инверсия сахарозы в дальнейшем приводит к снижению выхода сахара в сахарном производстве. Следовательно, определение активности этих ферментов весьма важно.

Известно несколько методов определения активности сахаразы. Построены они в основном на отличии физико-химических свойств продуктов гидролиза (глюкозы и фруктозы) от исходного субстрата сахарозы. Сахароза, или тростниковый сахар, не обладает редуцирующими свойствами и не может быть определена редуциционными методами, в то время как продукты ее гидролиза — фруктоза и глюкоза — восстанавливают реактив Фелинга.

Кроме того, растворы сахарозы вращают плоскость поляризации вправо, а продукты гидролиза — влево. В первом случае активность сахаразы определяют по количеству редуцирующих сахаров, накапливающихся в гидролизатах, во втором — поляриметрически, по изменению угла вращения поляризованного луча.

Качественное определение инвертазы.

Получение препарата инвертазы. В фарфоровую ступку помещают 5 г свежих прессованных пекарских дрожжей и добавляют 3 г хорошо промытого мелкого песка. Затем добавляют 2 мл воды и тщательно растирают в течение 5 мин. В растертую массу в несколько приемов приливают при тщательном помешивании еще 10 мл дистиллированной воды. Смесь оставляют стоять в течение 20 мин в термостате при 25—30° С и время от времени встряхивают, после чего центрифугируют. Центрифугат иногда опалесцирует, что объясняется содержанием в нем некоторого количества гликогена.

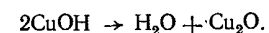
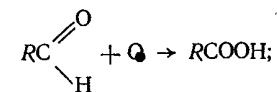
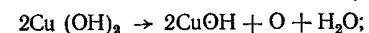
Определение инвертазы построено на характерной реакции альдегидной группы редуцирующего сахара с $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Редуцирующие сахара при этом окисляются в соответствующие кислоты, а голубой $\text{Cu}(\text{OH})_2$ восстанавливается до CuOH , который отщепляет воду и превращается в Cu_2O оранжевого цвета.

Фруктоза в реактиве Фелинга переходит в альдозу под влиянием щелочи и в дальнейшем окисляется до кислоты, содержащей на один атом углерода меньше, чем исходный сахар.

Рис. 24. Трубка Аллина.

Реакцию восстановления меди и окисления альдегидной группы сахара можно представить следующим образом.

Альдегидная группа редуцирующего сахара за счет кислорода гидроксида меди окисляется в кислоту:



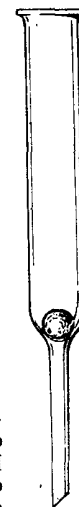
Приготовление некоторых реактивов. Раствор тростникового сахара в буфере (рН=4, 5) — в мерную колбу емкостью 1 л наливают 50 мл 1 н. раствора CH_3COONa , 50 мл 1 н. раствора CH_3COOH и доводят водой до метки. В мерной колбе емкостью 1 л буферной смесью растворяют 100 г тростникового сахара и доводят содержимое колбы этой же смесью до метки. Раствор хранят на холоду (2—4° С) или консервируют толуолом, добавляя его около 1 мл.

Реактив Фелинга. 1) 40 г перекристаллизованной CuSO_4 растворяют в мерной колбе емкостью 1 л и доводят водой до метки; 2) 200 г сегнетовой соли $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 150 г NaOH марки «х. ч.» растворяют в мерной колбе емкостью 1 л и доводят водой до метки. При проведении реакции доливают равное количество растворов 1 и 2.

Методика опыта. В две пробирки наливают по 5 мл раствора сахара в буфере. Затем быстро доливают по 1 мл центрифугата вытяжки инвертазы: в одну пробирку некипяченный, во вторую — предварительно прокипяченный в течение 5 мин и охлажденный. Смеси помещают на 30 мин в термостат при 40° С. После инкубации приливают в пробирки по 2 мл реактива Фелинга (по 1 мл раствора 1 и 2). Жидкость в пробирках кипятят. Там, где был прибавлен кипяченный центрифугат, осадок Cu_2O почти не выпадает. В отдельных случаях может наблюдаться небольшой красный налет на дне пробирки. Это объясняется тем, что раствор сахарозы содержит некоторое количество редуцирующих сахаров, и еще и тем, что в ферментной вытяжке могут также быть редуцирующие вещества. В другой пробирке, где фермент активен, выпадает обильный красный осадок Cu_2O , указывающий на ферментативное расщепление сахарозы.

Параллельно рекомендуется проводить еще один опыт на специфичность инвертазы. Для этого в третью пробирку наливают в качестве субстрата не тростниковый сахар, а 5 мл 1%-ного раствора крахмала в воде и добавляют 1 мл некипяченного центрифугата. Смесь инкубируют 30 мин в термостате при температуре 40° С. Затем добавляют 2 мл реактива Фелинга (по 1 мл раствора 1 и 2) и кипятят. В этом случае осадка Cu_2O не будет, что указывает на специфическое действие сахаразы.

Определение инвертазой активности дрожжей проводят в трубке Аллина (рис. 24) с асбестовым фильтром.



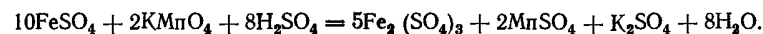
Приготовление некоторых реактивов. Дрожжевая суспензия — в аналитических весах взвешивают 1 г прессованных пекарских дрожжей, помещают в колбу емкостью 100 мл, куда добавляют 90 мл дистиллированной воды и 15 капель толуола. Колбу помещают в шуттель-аппарат и перемешивают содержимое ее при слабом покачивании (избегая образования пены) 1 ч, затем доводят водой до метки. Инактивированная дрожжевая суспензия — 5 мл полученной дрожжевой суспензии помещают в толстостенную пробирку, которую плотно закрывают пробкой и нагревают 10 мин на кипящей водяной бане. Затем охлаждают до комнатной температуры и хорошо перемешивают. Кислый раствор железозаммиачных квасцов — в мерной колбе на 1 л растворяют 100 г квасцов в дистиллированной воде и небольшими порциями (осторожно) приливают 200 г H_2SO_4 ($d = 1,84$). При сильном разогревании смесь следует охладить, после чего снова продолжить добавление кислоты. Добавив всю H_2SO_4 раствор охлаждают и осторожно небольшими порциями доводят дистиллированной водой до метки.

Методика опыта. В две колбы Эрленмейера емкостью 100 мл отмеряют по 1 мл дрожжевой суспензии: в одну исходной, во вторую инактивированной нагреванием. В колбы прибавляют по 5 мл 5%-ного раствора сахарозы и ставят на 30 мин в термостат при $37^\circ C$. Затем в колбы пипеткой Мора добавляют по 20 мл реактива Фелинга (по 10 мл раствора 1 и 2). Смесь кипятят 3 мин. Количество редуцирующих сахаров должно быть не меньше 10 мг и не более 100 мг. Выпавшему красному осадку Cu_2O дают отстояться и синюю жидкость декантируют в трубку Аллина.

Колбу Бунзена, в которую вставляется трубка Аллина, соединяют с насосом и отсасывают синюю жидкость. К осадку, оставшемуся в колбе Эрленмейера, добавляют горячую дистиллированную воду, взбалтывают его и дают отстояться. Раствор декантируют на фильтр и фильтруют. Промывание осадка повторяют еще раз. Затем из колбы Бунзена выливают все промывные воды, несколько раз споласкивают ее дистиллированной водой и снова соединяют с трубкой Аллина.

Промытый осадок Cu_2O в колбе Эрленмейера растворяют в растворе кислых железозаммиачных квасцов, для чего прибавляют по 2 мл данного раствора до полного растворения осадка. После этого раствор сливают на асбестовый фильтр, на котором задержалось небольшое количество красного осадка Cu_2O . Верхние слои асбеста слегка разрыхляют стеклянной палочкой, чтобы осадок полностью растворился. Жидкость отсасывают, колбу Эрленмейера и фильтр промывают два раза 2 мл кислого раствора железозаммиачных квасцов и 2—3 раза 2 мл горячей дистиллированной воды.

Сине-зеленую жидкость — раствор соли железа (II) — титруют 0,05 н. раствором $KMnO_4$. Конец реакции определяют по появлению розового окрашивания при добавлении одной капли раствора $KMnO_4$. Окисление соли железа (II) в соль железа (III) идет по следующему уравнению:



В соответствии с приведенным уравнением реакции, установлено, что 1 мл 0,05 н. раствора $KMnO_4$ эквивалентен 3,18 мг меди.

Количество инвертного сахара (в мг) определяют по табл. 3.

Количество меди вычисляют по формуле

$$x = (a - b) K \cdot 3,18,$$

Таблица 3. Инвертированная сахароза в мг (по Бертрау)

Сахароза	Медь	Сахароза	Медь	Сахароза	Медь	Сахароза	Медь
10	20,6	33	64,8	56	105,7	79	143,7
11	22,6	34	66,7	57	107,4	80	145,3
12	24,6	35	68,5	58	109,2	81	146,9
13	26,5	36	70,3	59	110,9	82	148,5
14	28,5	37	72,2	60	112,6	83	150,0
15	30,5	38	74,0	61	114,3	84	151,6
16	32,5	39	75,9	62	115,9	85	153,2
17	34,5	40	77,7	63	117,6	86	154,8
18	36,4	41	79,5	64	119,2	87	156,4
19	38,4	42	81,2	65	120,9	88	157,9
20	40,4	43	83,0	66	122,6	89	159,5
21	42,3	44	84,8	67	124,2	90	161,1
22	44,2	45	86,5	68	125,9	91	162,6
23	46,1	46	88,3	69	127,5	92	164,2
24	48,0	47	90,1	70	129,2	93	165,7
25	49,8	48	91,9	71	130,8	94	167,3
26	51,7	49	93,6	72	132,4	95	168,8
27	53,6	50	95,4	73	134,0	96	170,3
28	55,5	51	97,1	74	135,6	97	171,9
29	57,4	52	98,8	75	137,2	98	173,4
30	59,3	53	100,6	76	138,9	99	175,0
31	61,1	54	102,3	77	140,5	100	176,5
32	63,0	55	104,0	78	142,1	—	—

где a — количество 0,05 н. раствора $KMnO_4$, израсходованного на титрование в рабочем опыте, мл; b — количество 0,05 н. раствора $KMnO_4$, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл; K — поправочный коэффициент к титру 0,05 н. раствора $KMnO_4$.

Пример расчета. На титрование в рабочем и контрольном опытах пошло соответственно 16,75 и 0,85 мл 0,05 н. раствора $KMnO_4$. Поправочный коэффициент к титру 0,05 н. раствора $KMnO_4$ равен 0,9863. Подставляем данные в формулу:

$$(16,75 - 0,85) \cdot 0,9863 \cdot 3,18 = 50,0 \text{ мг.}$$

По табл. 3 находим количество сахара, эквивалентное 50 мг Cu . Оно равно 25 мг.

Активность сахарозы определяется количеством сахарозы в грамах, гидролизованной в течение 30 мин при температуре $37^\circ C$ и $pH = 4,5$ ферментом, содержащимся в 100 г исследуемого материала:

$$AC = \frac{a \cdot 100}{g \cdot 1000},$$

где AC — активность сахарозы; a — количество сахара, расщепленного в опыте, мг; g — навеска исследуемого вещества, г.

Пример расчета. Для определения активности сахарозы взято 1,7638 г прессованных пекарских дрожжей, из которых приготовлено 100 мл суспензии. Из 100 мл отобрали 1 мл, что соответствует 0,017638 г дрожжей. После гидролиза было определено 25 г сахара (по Бертрау). Подставляем полученные величины в формулу и получаем

$$AC = \frac{25 \cdot 100}{0,017638 \cdot 1000} = 141,2.$$

Следовательно, 100 г прессованных пекарских дрожжей за 30 мин инкубации при температуре 37° С и рН = 4,5 расщепляют 141 г тростникового сахара.

При определении инвертазы в растительном продукте, который содержит менее активный фермент, чем дрожжи, навеску исследуемого образца соответственно увеличивают.

Методика опыта. Растительное сырье вначале грубо измельчают, отбирают 2—3 навески по 10—25 г (в зависимости от активности фермента) и тщательно растирают с толченым стеклом в фарфоровых ступках. Затем навески количественно переносят с 20 мл дистиллированной воды в колбы Эрленмейера емкостью 100 мл. Содержимое одной из колб кипятят 5 мин на плитке для инактивирования фермента (контроль). После этого во все колбы приливают по 5 мл 10%-ного буферного раствора сахарозы и по 5 капель толуола. Колбы плотно закрывают корковыми пробками и ставят в термостат на 24 ч при температуре 37° С.

После окончания инкубации колбы вынимают из термостата, содержимое их количественно переносят в мерные колбы емкостью 200 мл, доводят дистиллированной водой до метки, перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр. Из фильтрата берут по 10 мл в колбы Эрленмейера и определяют сахар по Бертрану.

После определения количества сахара по Бертрану из средней величины результатов двух параллельных рабочих опытов вычитают результат контрольного опыта и по разности судят об активности фермента. Активность выражают количеством (в г) гидролизованного за 24 ч тростникового сахара при каталитическом действии ферментов, содержащихся в 100 г исследуемого растительного продукта.

Рефрактометрический метод определения инвертазной активности дрожжей (по К. П. Петрову). Метод построен на принципе уменьшения коэффициента преломления растворов при выделении редуцирующих сахаров в виде озазонов.

Приготовление суспензии и некоторых реактивов. Суспензия из дрожжей — 1 г дрожжей помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, добавляют 75 мл дистиллированной воды и слегка взбалтывают (избегая образования пены) в шуттель-аппарате в течение 1 ч. По окончании взбалтывания содержимое колбы доводят водой до метки, еще раз хорошо перемешивают и полученную суспензию исследуют.

Субстрат (5%-ный раствор сахарозы в ацетатном буфере с рН = 4,5) — в мерную колбу емкостью 1 л наливают по 50 мл 1 н. растворов CH_3COOH и CH_3COONa . Содержимое колбы доливают 5,6%-ным раствором сахарозы. Рекомендуется перед употреблением проверять рН субстрата. Буферный раствор сахарозы можно хранить в холодильнике до 2 недель без заметных изменений.

Методика опыта. В две центрифужные (толстостенные) пробирки емкостью 10 мл отмеряют пипеткой Мора по 5 мл буферного раствора сахарозы и 1 мл дрожжевой суспензии. Пробирки герметично закрывают резиновой пробкой, затем помещают в термостат на 1 ч при 37° С. В тех же условиях ставят два контрольные опыта с инактивированной дрожжевой суспензией. Суспензию инактивируют в герметично закрытой пробирке, нагревая ее 10 мин в кипящей водяной бане. После этого пробирки с суспензией инкубируют в термостате при 37° С и по окончании погружают на 2—3 мин в холодную воду, затем

сильно встряхивают и к смеси добавляют по 0,3 мл ледяной уксусной кислоты и 0,175 мл фенилгидразина основного (микропипеткой). Пробирки закрывают пробками и снова встряхивают. Далее из каждой отбирают по капле смеси и определяют показания рефрактометра системы РПЛ или другим прецизионным рефрактометром. Затем снова плотно закрывают пробками и помещают на 35 мин в кипящую водяную баню.

В процессе нагревания пробирки 2—3 раза встряхивают. Для предотвращения возможного выталкивания пробок пробирки рекомендуют приоткрыть (спустя 1—2 мин после начала нагревания), выпустив таким образом сжатый воздух, и снова плотно закрыть. Если же пробирки достаточно прочные, а пробки хорошо подогнаны, то такая предосторожность излишняя. По окончании нагревания пробирки помещают в холодную воду на 10 мин. Смесь сильно встряхивают и центрифугируют 15 мин при 1500 об/мин. В центрифугате определяют показания рефрактометра. При повторном определении показание рефрактометра по сравнению с показанием, установленным до нагревания смеси в кипящей водяной бане, значительно уменьшается. Наблюдается это не только в опыте, но и в контроле. Уменьшение показаний рефрактометра обусловлено образованием озазона и выпадением его в осадок. В контрольном опыте коэффициент преломления понижается вследствие расщепления сахарозы уксусной кислотой. Разность между уменьшением показаний рефрактометра в опыте и в контроле служит относительным показателем степени активности β -фруктофураноэидазы (сахаразы).

Активность сахаразы вычисляют по формуле

$$AC = \frac{(a - b) 100 \cdot 10}{g \tau p}, \quad (1)$$

где a — уменьшение показания рефрактометра в рабочем опыте; b — уменьшение показания рефрактометра в контрольном опыте; g — навеска исследуемого материала в опыте, г; τ — продолжительность инкубации, ч; p — количество сухого вещества в исследуемом материале, %. AC обычно вычисляют в единицах активности. За единицу активности принимают уменьшение показания рефрактометра РПЛ при 20° С на 0,1, а потому в числитель формулы введена цифра 10.

За показатель активности сахаразы принимают величину уменьшения показаний рефрактометра РПЛ при осаждении редуцирующих сахаров в виде озазонов, которые образовались при гидролизе сахарозы ферментами, содержащимися в 1 г сухого (безводного) растительного вещества, инкубированного при 37° С в течение 1 ч. Показатель активности сахаразы дрожжей можно также вычислить с учетом количества дрожжевых клеток, содержащихся в 1 мм³ исследуемой суспензии. AC вычисляют для 1 миллиона дрожжевых клеток, содержащихся в 1 мм³ суспензии по формуле

$$AC = \frac{(a - b) 10}{g t m}, \quad (2)$$

где m — количество миллионов дрожжевых клеток в 1 мм³.

Пример расчета. Определялась активность сахарозы прессованных дрожжей. Суспензия дрожжей была приготовлена из 1,2735 г дрожжей в мерной колбе емкостью 100 мл. Для опыта отбирали 1 мл суспензии, что соответствует 0,012735 г дрожжей. Уменьшение показаний рефрактометра после выпадения осадка озазонов в рабочем и контрольном опытах соответственно равны 5,34 и 0,91. Воды в прессованных дрожжах было 68,86%, следовательно, сухое вещество составляет 31,14%. В 1 мм³ взятой водной суспензии было 0,05215 млн. клеток. Продолжительность инкубации 1 ч (при 37° С). Подставляем полученные данные в формулу (1):

$$AC = \frac{(5,34 - 0,91) 100 \cdot 10}{0,0127 \cdot 31,14} = 11201.$$

Согласно формуле (2), с учетом количества дрожжевых клеток в исследуемой суспензии активность сахарозы

$$AC = \frac{(5,34 - 0,91) \cdot 10}{0,0127 \cdot 0,05215} = 6815.$$

Активность пекарских дрожжей следует вычислять, учитывая количество дрожжевых клеток. Это дает наиболее полное представление о содержании количества ферментов в живой клетке.

Относительные величины можно пересчитать на количество редуцирующих сахаров, образующихся при ферментативном гидролизе сахарозы. Для этого к буферному раствору сахарозы добавляют известное количество глюкозы и фенилгидразина, отсчитывают показания рефрактометра, затем осаждают глюкозу в виде озазона и вновь находят показания рефрактометра. По полученным данным определяют зависимость между изменением коэффициента преломления раствора и содержанием глюкозы. Эту зависимость выражают в виде кривой, которую используют для пересчета показаний рефрактометра в количество инвертного сахара, так как глюкоза и фруктоза образуют один и тот же озазон и имеют близкие коэффициенты преломления растворов. Показания рефрактометра пересчитывают на сахарозу, расщепляемую ферментами, содержащимися в 100 г сухого вещества, по формуле

$$AC = \frac{(a - b) K 100 \cdot 0,95 \cdot 6,5}{pg}, \quad (3)$$

где a — уменьшение показаний рефрактометра в рабочем опыте; b — уменьшение показаний рефрактометра в контрольном опыте; g — навеска материала в реакционной смеси, г; p — содержание сухих веществ в дрожжах, %; K — коэффициент пересчета показаний рефрактометра на содержание глюкозы (в %), рассчитан по экспериментальной кривой; 0,95 — коэффициент пересчета на сахарозу; 6,5 — масса реакционной смеси, состоящей из 5 мл буферного раствора сахарозы, 1 мл дрожжевой суспензии, 0,3 мл CH_3COOH и 0,75 мл фенилгидразина.

Пример расчета. Опыты показали, что уменьшение показаний рефрактометра зависит от количества глюкозы, содержащейся в реакционной смеси и вступающей в реакцию с фенилгидразином. По экспериментальной кривой (рис. 25) находим количество глюкозы в реакционной смеси, соответствующее отсчетам по шкале рефрактометра для рабочего и контрольного опытов. Навеска дрожжей в исследуемой суспензии была равна 0,0127 г, влажность дрожжей 68,86%, содержание сухих веществ 31,14%. Рефрактометрические данные берем из предыдущего примера. Показанию

рефрактометра 5,34 соответствует 1,2 г глюкозы, а показанию 0,91 — 0,18 г. Полученные данные подставляем в формулу:

$$AC = \frac{(1,2 - 0,18) 100 \cdot 0,95 \cdot 6,5}{31,14 \cdot 0,0127} = 2000.$$

В данном случае (округляя полученный результат) 100 г сухих (безводных) дрожжей за 1 ч инкубации при температуре 37° С и pH = 4,5 расщепляют 2 кг сахарозы.

При исследовании растительного материала, содержащего менее активную инвертазу, чем дрожжи, соответственно увеличивают навеску от 5 до 10 г и время инкубации до 20 ч.

Ускоренный метод определения мальтазной активности дрожжей (по И. М. Ройтеру). Гидролитическое расщепление сахарозы идет не только при каталитическом воздействии β -фруктофуранозидазы, но и α -глюкозидазы (мальтазы). В процессе диастатического гидролиза крахмала накапливается дисахарид мальтоза, который в дальнейшем расщепляется на две молекулы α -D-глюкозы. При недостаточной активности мальтазы в дрожжах приостанавливается гидролиз мальтозы, замедляется сбраживание сахаров, а также газообразование. Поэтому наряду с определением активности β -фруктофуранозидазы большое значение имеет определение активности мальтазы.

Методика опыта. В склянку 1 (рис. 26) емкостью 100 мл вносят 1 г прессованных дрожжей в виде суспензии, полученной путем суспензирования их с 25 мл водопроводной воды, и смывают остаток 15 мл воды. Затем добавляют 30 мл 10%-ного раствора мальтозы и склянку закрывают пробкой 2. В течение 30 мин кран 3 оставляют открытым, после чего закрывают. При этом выделяющийся CO_2 по трубке 4 поступает во вторую склянку 5, в которую налито невысыхающее минеральное масло. Склянку 5 плотно закрывают пробкой 6. Вытесняемый газ измеряют бюреткой 7 по количеству вытесненного масла. Прибор помещают в термостат или водяную баню, обогреваемую универсальным термостатом, при температуре 30° С, при которой идет сбраживание мальтозы. Когда масло заполнит бюретку до 20 мл, открывают кран 3 и прекращают опыт.

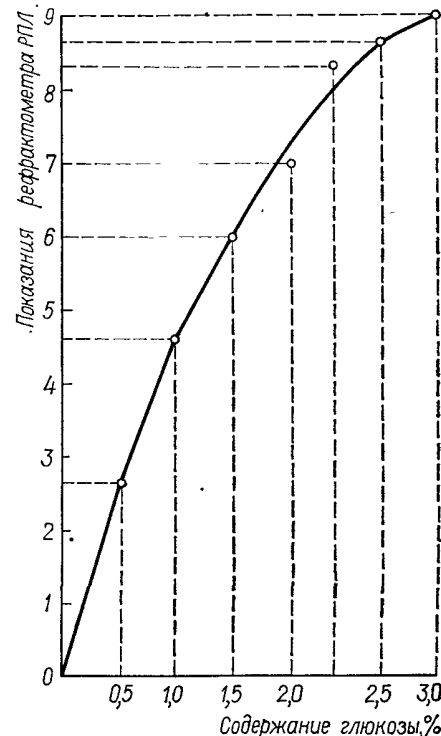


Рис. 25. Кривая для пересчета уменьшения показаний рефрактометра РПЛ на содержание глюкозы в процентах.

Мальтазная активность определяется временем (в мин), в течение которого 1 г дрожжей выделяет 20 мл CO_2 .

Например, качество пекарских дрожжей по данным Всесоюзного научно-исследовательского института хлебопекарной промышленности определяют по времени сбраживания следующим образом (в мин): хорошие — 85—110; удовлетворительные — 110—160; плохие — свыше 160.

Мальтазную активность можно определить в течение более длительного периода работы дрожжей в автоматически записывающем аппарате «зимограф» при условии сбраживания мальтозного субстрата.

Н. И. Семихатова разработала несколько иной метод определения мальтазной активности дрожжей в микроприборе, в котором определяют и зимазную активность. При этом производят сбраживание как мальтозы, так и сахарозы с глюкозой. В этом методе соотношения между сбраживаемым субстратом и количеством ферментов другие. При установлении качества дрожжей по мальтазной активности существуют и другие методы.

Известно, что при определении ферментативной активности необходимо строго придерживаться одной

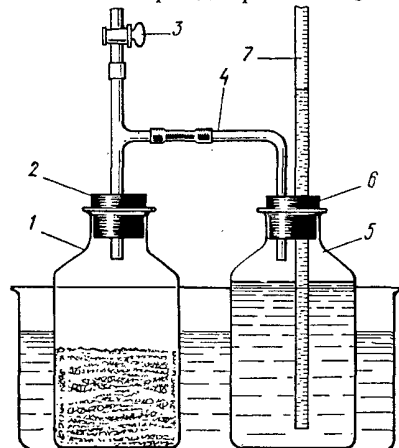


Рис. 26. Прибор для определения мальтазной активности.

разработанной методики при получении сравнительных экспериментальных данных.

Определение бродильной активности дрожжей. Зимаза (от греч. зима — закваска) представляет собой весьма сложную систему ферментов, катализирующих распад гексоз (глюкозы, фруктозы и других сахаров) до образования спирта и углекислого газа.

Процесс брожения (анаэробного дыхания) по теории С. П. Костычева находится в тесной взаимосвязи с аэробным дыханием (брожением). Расщепление сахара до $\text{CH}_3\text{—CO—COOH}$ при брожении и дыхании катализируется одними и теми же ферментами с образованием одних и тех же промежуточных продуктов. $\text{CH}_3\text{—CO—COOH}$ в дальнейшем при анаэробном дыхании подвергается превращениям, происходящим при спиртовом или молочнокислом брожении, т. е. окисляется до CH_3COOH или же до CO_2 и H_2O .

Разные сахара сбраживаются с различной скоростью. Легче всего сбраживаются глюкоза и фруктоза, медленнее — манноза и еще медленнее — галактоза. Пентозы сбраживаются лишь некоторыми плесневыми грибами и не сбраживаются дрожжами. Весьма хорошим субстратом спиртового брожения является сахароза и мальтоза, которые предварительно подвергаются ферментативному гидролизу. Ферментативную активность бродильного комплекса определяют сле-

дующими способами: по убыли в массе пробы после брожения за счет потери CO_2 , которая является критерием силы брожения; по количеству оставшегося несброженного сахара; по объему выделяющегося CO_2 ; по количеству накопленного спирта.

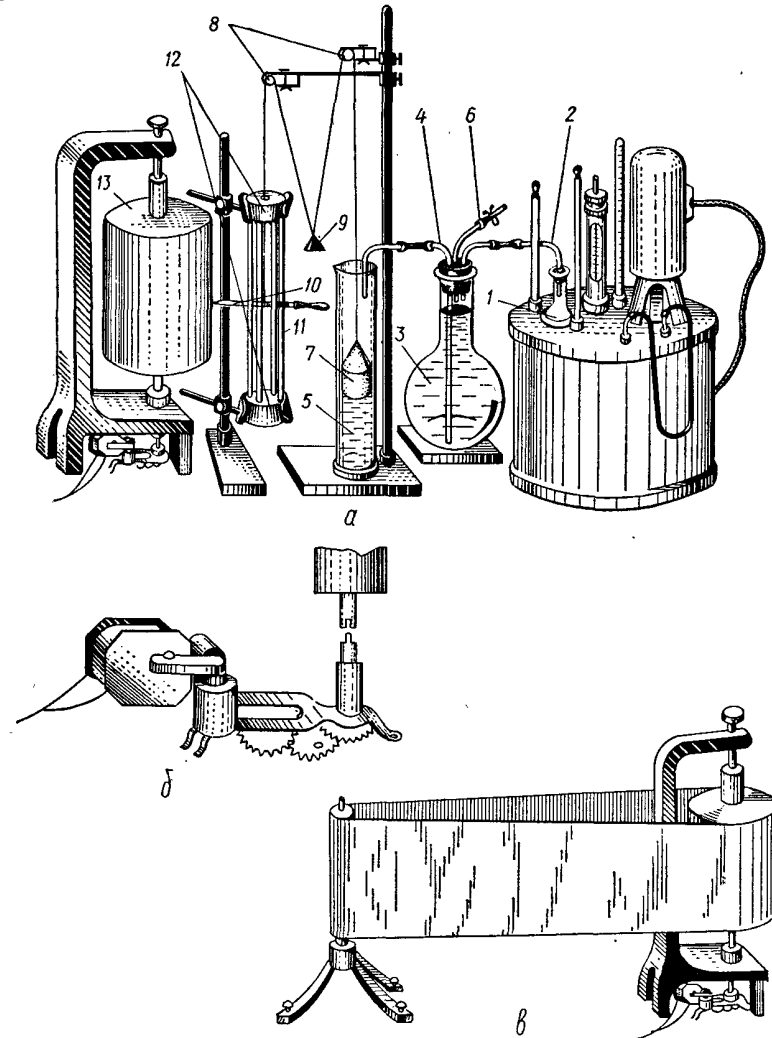


Рис. 27. Зимограф К. П. Петрова: а — общий вид; б — схема привода; в — приспособление для удлинения бумажной ленты.

Определение бродильной активности дрожжей в автоматически записывающем аппарате «зимограф» (по К. П. Петрову). Этот метод основан на измерении объема углекислого газа, образующегося в процессе спиртового брожения. Объем CO_2 учитывают в автоматически записывающем аппарате (рис. 27), который позволяет вести

непрерывную запись количества выделяющегося CO_2 в течение всего периода брожения, продолжающегося 2 суток и более.

Описание аппарата. В универсальный термостат помещают круглую плоскодонную колбу 1 (рис. 27, а) емкостью 150 мл. В колбу наливают бродильную смесь, состоящую из сбраживаемого субстрата и дрожжей. Колбу герметично соединяют каучуковой и стеклянной трубками 2 с колбой 3 емкостью 3 л, в которую налит насыщенный раствор NaCl . Колбу 3 закрывают каучуковой пробкой с вставленными в нее тремя стеклянными трубками. Один конец трубки 4 доходит почти до дна колбы, другой опущен в верхнюю часть цилиндра 5. Трубка 6 сообщается с воздухом; во время опыта она закрыта краном или зажимом. Объем цилиндра 5 1000 мл, высота 350 мм, диаметр 70 мм. Цилиндр во время опыта наполняется насыщенным раствором NaCl , который вытесняется CO_2 из колбы 3 в процессе брожения. Цилиндр наполняется в течение суток. Чтобы предотвратить испарение раствора, на его поверхность наливают тонкий слой вазелинового или другого минерального масла.

В цилиндр опущен большой пробковый поплавок 7, обработанный горячим парафином. Диаметр поплавка несколько меньше внутреннего диаметра цилиндра. Поплавок легко скользит внутри цилиндра и соединен капроновой нитью (сечением 0,2 мм), переброшенной через легко вращающиеся фарфоровые ролики 8, с грузом 9, который соединен с пером 10. Масса груза равна грузу поплавка. Нить, соединяющую груз с пером 10, пропускают через хорошо оплавленную стеклянную трубку, вставленную в центр резиновой пробки.

Движение поплавка соответственно передается через груз и ролики перу, которое представляет собой вытянутую стеклянную палочку, оплавленную на конце. Палочка вставлена в металлическую оправу, обеспечивающую плавное и легкое скольжение его между четырьмя направляющими стеклянными трубками 11. Наряду с легкостью скольжения пера необходимо зафиксировать жесткое положение его, которое обеспечивает движение пера только вниз или вверх. Направляющие трубки (или палочки) вставлены в две большие каучуковые пробки 12, зажатые лапками металлического штатива. Конец пера касается закопченной бумаги, натянутой на барабан 13 диаметром 150 и высотой 180 мм. Движение барабана осуществляется синхронным электродвигателем через редуктор (рис. 27, б).

Подготовка бумаги для записи. Из плотной нетолстой белой бумаги с ровной глянцевой поверхностью вырезают полоску, ширина которой равна высоте барабана, а длина на 10—15 мм больше, чем окружность барабана. Бумагу туго натягивают на барабан и смазывают по вертикали 10—15 мм от края канцелярским (лучше казенным) клеем. Край бумаги склеивают так, чтобы ее полоса ее плотно прилегла к барабану, в противном случае бумага во время движения барабана будет скользить и запись может исказиться. Поверхность бумажной ленты на барабане заканчивают ровным тонким слоем ламповой копоти, медленно вращая барабан над коптящим пламенем керосиновой лампы или горелки.

Срок непрерывной записи может быть увеличен до 2—3 суток (и более) путем удлинения полосы бумаги при помощи специального удлинителя, соединяемого с барабаном бумажной полосой (рис. 27, в). В этом случае цилиндр для сбора жидкости следует взять большего объема и соответственно подобрать поплавок и груз.

Для сохранения кривых, записанных по копоти, бумажную ленту фиксируют 30%-ным раствором канфола в 96%-ном растворе этилового спирта. Для этого после окончания опыта бумагу, осторожно держа за края, разрезают ножом (или бритвой) по месту склеивания, снимают с металлического цилиндра и проводят (белой стороной вниз) по раствору канфола, налитому в широкий кристаллизатор или в большую фарфоровую чашку. Фиксированную таким образом диаграмму сушат на воздухе, при этом сажа прочно закрепляется на бумаге.

Методика опыта. Разъединяют барабан и электродвигатель. Плавню вращая барабан, вычерчивают на закопченной бумаге внизу при помощи пера 10 горизонтальную линию. Затем барабан соединяют с электродвигателем и движением поплавка вверх вычерчивают пером вертикальную линию. Перо устанавливают в точке пересечения осей

ординаты и абсциссы. Вертикальную линию следует наносить непосредственно за местом склеивания полосы бумаги, чтобы при движении барабана запись не искажалась.

После установления индекса в колбу 1 наливают 100 мл 10%-ного раствора тростникового сахара или такой же объем суслу и добавляют 1 г прессованных дрожжей. Колбу плотно закрывают каучуковой пробкой и энергично взбалтывают в течение 15 мин в шуттель-аппарате. Колбу помещают в термостат и присоединяют к аппарату. Температура инкубации 30°C . В течение первых 15 мин трубку 6 оставляют открытой, а затем ее закрывают краном (или зажимом) и включают электродвигатель в сеть. В таком виде прибор оставляют на все время опыта. На одной ленте (не меняя ее) записывают несколько опытов для различных дрожжей, сохраняя идентичными температуру и сбраживаемый субстрат. Кривые, вычерченные на бумаге, служат для сравнения бродильной активности исследуемых дрожжей. Запись на одной диаграмме может быть произведена одновременно и несколькими перами, связанными с параллельно бродящими смесями. Полученная запись — зимограмма — может быть размножена в виде фотокопий. Для этого фиксированные в спиртовом растворе канифоли, записи кривых используют как негатив.

Метод прост, и результаты получаются достаточно точными. Весь ход процесса непрерывно автоматически записывается со всеми возможными изменениями, что не всегда можно наблюдать визуально.

Совместно с автором коллективом кафедр биохимии и автоматики Киевского технологического института пищевой промышленности зимограф был модифицирован. Механическая часть зимографа была заменена малогабаритным емкостным датчиком (малогабаритным емкостным измерителем системы МЕИУ), разработанным И. П. Глыбиным¹, с записью на потенциометре ЭП типа ПС-1-П.

Выделяемый CO_2 в процессе спиртового брожения регистрируется по изменению электрической емкости электродов, погруженных в не растворяющую CO_2 жидкость (трансформаторное масло или другое неокисляющееся минеральное масло). Изменение электрической емкости связано с вытеснением жидкости выделяющимся CO_2 , которая фиксируется емкостным датчиком и записывается самописцем электронного потенциометра в виде зимограммы. На зимограмме, как и при определении на зимографе, описанном выше, отмечаются непрерывно все фазы процесса брожения.

Показания зимограммы, как и в предыдущем случае, могут быть выражены через количество миллилитров CO_2 , выделившегося в единицу времени.

Описание модифицированного аппарата и его работа. Аппарат состоит, как указано выше, из емкостного датчика, работающего по схеме, показанной на рис. 28. Датчик состоит из двух металлических стержней (электродов 6 и 7), погружаемых в электропроводную или же диэлектрическую жидкость. Один из электродов (6) находится

¹ Глыбин И. П. Автоматические плотномеры и концентратомеры в пищевой промышленности. М., «Пищевая промышленность», 1975, с. 11.

в изоляционной трубке. В бродильную колбу 1 загружают бродильную массу и помещают в термостат при температуре 30° С. Перед брожением цилиндр 3 наполняют жидкостью — трансформаторным или другим неокисляющимся минеральным маслом. Как исключение можно наполнять водопроводной или дистиллированной водой, но лучше пользоваться маслом, так как оно практически не растворяет CO₂.

Выделяющийся при брожении газ поступает в цилиндр 3, в котором находятся электроды 6 и 7. Цилиндр герметично закрыт пробкой и соединен сифонами 2 и 5 с ванной 4, заполненной минеральным маслом.

Вытесняемая жидкость переливается через сифон 2 в верхний сосуд. По окончании опыта открывают кран 8 на сифоне 5 и цилиндр 3 снова наполняется жидкостью.

При вытеснении жидкости из цилиндра 3 меняется сопротивление электродов 6 и 7, которое находится в прямой пропорциональной зависимости от изменения уровня жидкости.

Электроды 6 и 7 соединены экранированным кабелем с малогабаритным емкостным измерительным датчиком системы МЕИУ. Количество датчиков может быть установлено произвольно, в зависимости от требований контроля производства. Датчики во время опытов подключаются автоматически при помощи многоточечного переключателя, имеющегося

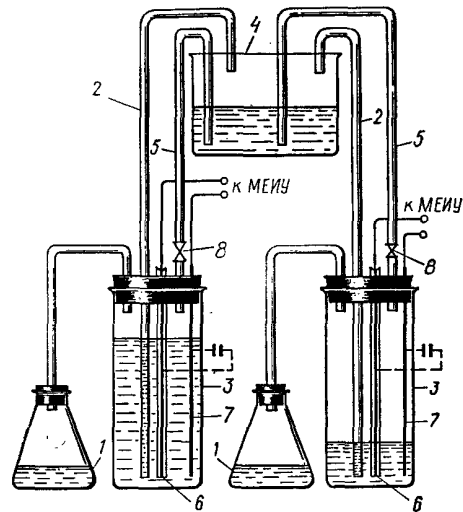


Рис. 28. Схема модифицированного автоматического записывающего аппарата «Зимометр» с емкостным датчиком системы МЕИУ.

в типовом электронном потенциометре ЭП, и замыкающихся контактов электромагнитного реле, которые находятся в МЕИУ.

Электродный блок питается от транзисторного высокочастотного генератора через трансформатор.

Определение интенсивности процесса брожения непосредственно в производственных установках зимометром (по К. П. Петрову). Одним из важнейших показателей интенсивности процесса брожения является выделение газообразных продуктов. Количество выделяемых газов при брожении обычно учитывается в лабораторных условиях специальными приборами с выносом проб из производственных цехов. Однако все известные способы определения бродильной активности не могут дать полного и точного представления об интенсивности процесса брожения, протекающего в производственных емкостях, с абсолютным сохранением производственного режима.

В связи с этим возникает необходимость измерения интенсивности брожения непосредственно в производственных резервуарах, чанах и установках.

Зимометром может быть определена интенсивность процесса брожения в различных бродильных производствах при сбраживании гомогенных бродильных смесей: спиртовом, пивоваренном и т. д.

Таким образом, настоящий метод измерения интенсивности процесса брожения можно считать универсальным.

Зимометр, при помощи которого осуществляется газовый контроль непосредственно в производственных установках, состоит из трех основных узлов: пробоотборника, измерителя объема выделяющегося газа и сливного сифона (рис. 29). Пробоотборник 1, он же и бродильный сосуд емкостью 250 мл и больше, снабжен обратным клапаном 2, который обеспечивает поступление бродильной смеси из производственного резервуара и предотвращает обратное ее вытекание. Вверху пробоотборник соединен с сигнальной электролампочкой 3, при ее вспышке прекращают отбор пробы.

Измеритель объема выделяющегося газа 7 емкостью 250 мл с делениями по 1 мл соединен эластичным резиновым шлангом с бродильным сосудом (пробоотборником) и сосудом 8.

Сливной сифон 10 служит для удаления отработанных проб в измерительный цилиндр 12 с делениями, позволяющими определить рабочий объем отобранной пробы.

Все части зимометра соединяются эластичными резиновыми, достаточно толстыми шлангами произвольной длины. Трубки зимометра перекрываются кранами.

Методика опыта. Пробоотборник 1 опускают на любую глубину и в любое место производственного бродильного резервуара 13, насколько позволяют резиновые шланги, соединяющие его с газоизмерителем 7 и сифоном 10. Последние остаются на поверхности резервуара, ибо они укреплены на щите или находятся в футляре 14. Затем, открыв кран 5 и закрыв краны 6 и 11, засасывают через обратный клапан 2 пробу. Клапан 2 соединен с резиновым шлангом 9 произвольной длины, позволяющим отбирать пробу из различных участков производственного бродильного резервуара.

Окончанием отбора пробы служит включение сигнальной электролампочки 3 при замыкании контактов поднимающимся поплавком с металлической пластинкой 4, замыкающей контакты 3'. Электропитание осуществляется обычной батареей. Сигнал от электролампочки предотвращает попадание бродильной смеси в газоизмеритель.

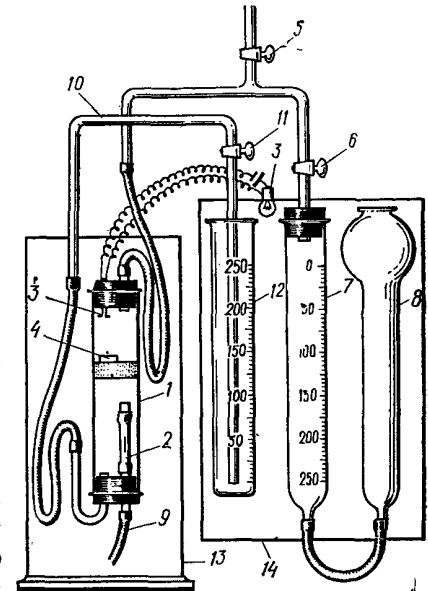


Рис. 29. Зимометр К. П. Петрова:

1 — пробоотборник (бродильный сосуд); 2 — обратный клапан; 3 — сигнальное устройство; 4 — металлическая пластинка на поплавке для включения контактов при наполнении бродильного сосуда (пробоотборника); 5 — кран для сообщения с воздухом; 6 — кран для выпуска CO₂; 7 — измеритель объема CO₂; 8 — сообщающийся сосуд для вытесняемой жидкости из измерителя; 9 — гибкий шланг для отбора пробы из бродильного резервуара; 10 — сифон для стока отброшенной смеси; 11 — кран, изолирующий сифон во время работы прибора; 12 — измеритель отработанной пробы.

После наполнения пробоотборника прекращают засасывание пробы и открывают кран 6, при этом жидкость из сосуда 8 поступает в измеритель объема газа 7, который наполняют до нулевой отметки и затем закрывают кран 5. Таким образом, прибор подготовлен к измерению. Наблюдение ведут по часам. Однако зимометр можно подключить к автоматическим записывающим устройствам зимографа, заменяя ими детали 7 и 8. Это позволяет вести автоматическое измерение непосредственно в производственных емкостях.

По окончании опыта, не вынимая пробоотборника из производственного резервуара, закрывают кран 6 и открывают краны 5 и 11. Через кран 5 выдувают отработанную пробу по сифону 10 в измерительный цилиндр 12, при этом обратный клапан 2 задерживает вытекающие бродильной смеси в производственный резервуар.

Следующий этап — очистку пробоотборника — осуществляют 2—3-кратным засасыванием бродильной смеси из производственного резервуара и выдуванием ее через сифон в сосуд, из которого бродильная смесь выливается в производственный резервуар. Засасывание и выливание бродильной смеси при очистке пробоотборника производят в описанном выше порядке.

По окончании очистки пробоотборник снова наполняют исследуемой пробой. Таким образом, бродильный сосуд все время находится в бродящей массе, производственный режим брожения сохраняется.

Суть настоящего метода в том, что интенсивность процесса брожения измеряется непосредственно в производственных емкостях, без выноса проб в лабораторию, причем в различных бродильных производствах, в которых происходит интенсивное выделение газообразных продуктов. Автоматическая же запись может производиться дистанционно непосредственно в контрольной лаборатории, т. е. вне цеха.

Интенсивность процесса брожения выражают в количестве CO_2 , выделяющегося в единицу времени из определенного (принятого) объема отобранной пробы.

Кроме описанных методов бродильную активность определяют еще различными приборами лабораторного типа по количеству спирта, накапливающегося в бродильной массе, или по другим негазообразным конечным продуктам, а также по количеству оставшихся несброженных продуктов.

АМИЛАЗЫ

Амилазы относятся к полиазамам. Они катализируют гидролиз высокомолекулярных полисахаридов — крахмала и гликогена. Основным источником амилаз являются злаковые. Амилаз много как в проросшем, так и в проросшем зерне. В проросшем зерне амилазы наиболее активны. В растениях содержатся β - и α -амилазы; они встречаются как вместе, так и отдельно. β -Амилазу еще называют растительной амилазой, так как она не найдена в организме животных. α -Амилаза содержится в животном организме, тогда ее называют жи-

вотной. Однако значительные количества α -амилазы образуются при прорастании семян пшеницы, ржи, ячменя и других злаковых, а также содержатся в непроросших семенах сорго и плесневых грибах.

β -Амилазу называют еще сахарогенамилазой. Она расщепляет каждую вторую α -глюкозидную связь, начиная от конца цепи, при этом отщепляется мальтоза. Действие β -амилазы прекращается у разветвления молекулы амилопектина. Таким образом, с самого начала действия β -амилазы в реакционной смеси образуется редуцирующий сахар. Одновременно длительный период сохраняются крупные декстриновые остатки, которые дают с иодом синюю окраску.

α -Амилазу называют декстринирующим ферментом, так как она расщепляет крахмальную цепочку с образованием низкомолекулярных декстринов, которые не дают окрашивания с иодом. Под действием α -амилазы молекула крахмала очень быстро расщепляется на декстрины, в то же время в начале реакции в реакционной смеси мальтоза не образуется. При продолжительном же воздействии α -амилазы на крахмал 85% его расщепляется до мальтозы. α - и β -амилазы при совместном действии на крахмал расщепляют его на 95% до мальтозы. Температура и кислотность среды по-разному действуют на амилазы. Так, α -амилаза относительно устойчива к повышению температуры. Она сохраняет полностью свою активность при нагревании до 70°C . В то же время β -амилаза за 15 мин полностью инактивируется при 70°C , что используют для определения активности каждой из амилаз. Вначале определяют суммарную активность этих ферментов, затем смесь нагревают в течение 15 мин при 70°C и определяют активность α -амилазы; активность же β -амилазы рассчитывают по разности. Иначе влияет на них кислотность среды: α -амилаза полностью инактивируется в течение 15 мин при $\text{pH} = 3,3$, тогда как β -амилаза еще приблизительно на 80% сохраняет свою активность. Это свойство амилаз используют в хлебопекарном производстве. α -Амилаза, образующаяся в проросшем зерне, в дальнейшем из-за своей декстринирующей способности отрицательно влияет на вкус и консистенцию мякиша хлеба. Это можно предотвратить, используя жидкие дрожжи или молочнокислые закваски, содержащие молочнокислые бактерии. Образующаяся молочная кислота в значительной мере угнетает α -амилазу.

Установлено, что амилазы представляют собой белки и являются однокомпонентными ферментами. Амилазы плесеней, бактерий, поджелудочной железы, а также α - и β -амилазы ячменного солода выделены в кристаллическом виде. Опыты, проведенные с препаратами амилазы, привели к предположению, что активность этого фермента связана с наличием в его молекуле сульфгидрильных групп. При окислении сульфгидрильных групп амилазы ее активность снижается и, наоборот, при восстановлении окисленного фермента его активность увеличивается.

Амилазы играют большую роль в бродильных и хлебопекарном производствах как основные ферменты, катализирующие процесс расщепления крахмала и образования сбраживаемого сахара. Весьма активный ферментный препарат, содержащий амилазы, был получен из различных плесневых грибов, особенно из *Aspergillus oryzae*.

Полученный препарат — «грибной солод» — находит применение в спиртовой и хлебопекарной промышленности.

В настоящее время существует много методов определения активности амилаз. В зависимости от потребности производства, активность амилазы оценивают либо по количеству мальтозы, образовавшейся за

Таблица 4. Шкала буферного раствора

Номер пробирки	Количество, мл		рН буферного раствора
	0,2 М раствор Na_2HPO_4	0,1 М раствор лимонной кислоты	
1	0,27	2,23	2,6
2	1,10	1,40	4,4
3	1,29	1,21	5,0
4	1,39	1,11	5,4
5	1,51	0,99	5,8
6	1,65	0,85	6,2
7	1,82	0,68	6,6
8	2,06	0,44	7,0
9	2,27	0,23	7,4
10	2,43	0,07	8,0

определенный период времени, либо по времени, которое требуется для исчезновения окраски в результате реакции крахмала с иодом. В некоторых методах также измеряют вязкость крахмального клейстера. В частности, при определении активности α -амилазы применяют методы, основанные на изменении вязкости. При определении активности β -амилазы применяют методы, связанные с определением количества мальтозы. При работе с амилазой животного происхождения в качестве активатора используют 0,05 М раствор NaCl . Растительная амилаза не нуждается в таком активаторе.

Определение влияния рН на активность амилаз. Ферменты очень чувствительны

к изменению кислотности среды, в которой они действуют. Отклонение активной кислотности среды в ту или иную сторону от оптимума рН вызывает понижение активности ферментов. Влияние рН на активность ферментов можно проследить на примере действия амилазы солода на крахмал.

Приготовление экстракта из солода. 0,5 г мелко измельченного солода помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, приливают немного ниже метки дистиллированную воду и добавляют 5 капель толуола. Содержимое колбы взбалтывают, оставляют настаиваться до следующего дня и затем доводят водой до метки. Далее хорошо перемешивают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

Методика опыта. В 10 пробирок наливают из микробюреток 0,2 М раствор Na_2HPO_4 , и 0,1 М раствор лимонной кислоты согласно табл. 4.

Затем в каждую пробирку приливают по 5 мл 0,5%-ного раствора крахмала и по 2,5 мл экстракта солода, последний следует приливать, начиная с первой пробирки, через равные (30 с) промежутки времени. Содержимое пробирки после прибавления экстракта тщательно перемешивают и оставляют на 10—15 мин. После этого берут через каждую минуту пробы (по 2—3 капли) из седьмой пробирки в фарфоровую чашечку и добавляют две капли раствора иода в растворе KI . В начале опыта получается синее окрашивание, затем фиолетово-красное и красно-бурое. Когда проба даст красно-бурое окрашивание, спустя две минуты, прибавляют во все пробирки по 3 капли раствора иода и взбалтывают. Раствор иода следует приливать, начиная с первой пробирки, через равные промежутки времени, т. е. через 30 с.

На основании окраски содержимого пробирок можно судить о степени расщепления крахмала в зависимости от рН. Слабо-желтая

окраска свидетельствует о том, что крахмал расщепился полностью и, следовательно, рН был оптимальным. В пробирках, где окраска красно-бурая, крахмал расщепился в меньшей степени, значит рН был ниже оптимального. Фиолетово-красное, фиолетовое и синее окрашивание указывает на то, что реакция среды была также неблагоприятной.

Определение суммарной активности амилаз.

Приготовление некоторых реактивов. 1%-ный раствор крахмала — 1 г растворимого крахмала помещают в колбу или стакан, приливают 60—70 мл дистиллированной воды, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане до тех пор, пока раствор крахмала не станет совсем прозрачным. После охлаждения раствор количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, доводят водой до метки и взбалтывают. Экстракт амилаз из солода — в мерную колбу емкостью 100 мл помещают 5 г мелко измельченного солода, приливают дистиллированную воду немного ниже метки и добавляют 5 капель толуола. Содержимое колбы взбалтывают, оставляют настаиваться на 24 ч и затем доводят водой до метки. Далее смесь еще раз встряхивают, переносят в центрифужные пробирки, закрывают пробками и центрифугируют. В центрифугате определяют амнолитическую активность.

Таблица 5. Содержание экстракта солода

Номер пробирки	Количество экстракта (центрифугата), мл	Номер пробирки	Количество экстракта (центрифугата), мл
1	1,00	6	0,0312
2	0,500	7	0,0156
3	0,250	8	0,0078
4	0,125	9	0,0039
5	0,0625	10	0,00195

Методика опыта. Нумеруют 10 пробирок. В первую и вторую пробирки наливают по 1 мл экстракта солода (центрифугата). Во все пробирки, кроме первой, наливают по 1 мл дистиллированной воды. Затем из второй пробирки после смешиваний берут 1 мл раствора, переносят в третью пробирку и смешивают, из третьей пробирки переносят 1 мл в четвертую, из четвертой в пятую и так до последней включительно, сохраняя определенный интервал времени. Из последней пробирки 1 мл раствора выливают. В результате получают ряд пробирок, в которых исходный экстракт содержится в следующих количествах (табл. 5).

После приготовления указанного ряда растворов в каждую из пробирок прибавляют по 5 мл 1%-ного раствора крахмала и все пробирки ставят в термостат или в воду при 55—58 °С на 30 мин. По истечении срока инкубации пробирки вынимают, помещают в холодную воду (для охлаждения) и в каждую прибавляют по 0,5 мл 0,1 н. раствора иода в растворе KI до появления хорошо выраженного окрашивания. Прибавляя раствор иода, соблюдают одинаковую последовательность и сохраняют интервалы времени, которые были приняты при первоначальном сливании растворов в пробирки.

Для повышения точности опыта его рекомендуют проводить с дистиллированной водой, охлажденной до нуля, а пробирки помещать в холодную воду. В этих условиях сохранение последовательности и постоянства интервала времени не имеют значения, так как реакции гидролиза практически нет.

Крахмал считают полностью гидролизованным в той пробирке, в которой после прибавления раствора иода наблюдается заметный

переход к фиолетовому цвету. Негидролизированный полностью крахмал окрашивается иодом в синий цвет. В отдельных случаях гидролиз считают законченным, когда окрашивания после прибавления раствора иода не наблюдается.

Красный цвет обычно служит критерием полного гидролиза крахмала. Активностью амилаз считают наименьшее количество раствора амилаз, которое гидролизовало полностью 5 мл 1%-ного раствора крахмала в указанных условиях.

За показатель амилотической активности принимают количество крахмала (г), гидролизованного 1 г исследуемого растительного материала в течение 30 мин при температуре 55—58° С:

$$AA = \frac{gb \cdot 0,05}{a},$$

где g — навеска исследуемого продукта; b — степень разбавления исходной навески, т. е. отношение объема вытяжки к навеске; a — степень разбавления экстракта в пробирке со смесью красного цвета; 0,05 — количество крахмала в опыте, г.

Пример расчета. В красный цвет окрасилось содержимое третьей пробирки, в которой экстракт был разбавлен в 4 раза, т. е. знаменатель по табл. 5 равен 0,250. Показатель амилотической активности будет

$$\frac{5 \cdot 20 \cdot 0,05}{0,250} = 20.$$

Следовательно, 1 кг солода в течение 30 мин при температуре 55—58° С гидролизует 20 кг крахмала.

Определение суммарной активности амилаз AC (по Д. Н. Климовскому и В. И. Радзевичу). В спиртовой промышленности необходимо определять активность амилаз как одного из основных ферментов, катализирующих гидролитическое расщепление крахмала. Данный метод дает возможность определять совместное действие α - и β -амилаз. Он сводится к установлению количества крахмала, осахариваемого солодовой вытяжкой в определенных условиях. Результаты определения вычисляют из расчета работы в течение 1 ч ферментов, содержащихся в 1 г солода.

Приготовление некоторых реактивов. 1%-ный раствор крахмала — в мерной колбе на 100 мл растворяют 1 г крахмала в 80 мл дистиллированной воды, нагревая на водяной бане. Полученный раствор охлаждают, прибавляют к нему 10 мл буферного раствора и доводят объем до метки. Буферный раствор ($pH = 4,8 \div 5,0$) — 1,815 г KH_2PO_4 растворяют в 200 мл воды. Основной раствор иода — в мерной колбе на 100 мл растворяют 1,4 г кристаллического иода и 44 г KI в небольшом объеме воды, доводя раствор водой до метки. Рабочий раствор иода — основной раствор иода разбавляют в 5 раз водой (20 мл доводят до 100 мл) и на каждые 100 мл рабочего раствора прибавляют 4 г KI. Солодовая вытяжка — 10 г растертого солода вносят в колбу, затем приливают воду, содержащую 10% (по объему) буферного раствора, до общего объема 100 мл, настаивают 30 мин при 30° С, после чего вытяжку фильтруют через бумажный фильтр.

Методика опыта. Смесь 25 мл 1%-ного раствора растворимого крахмала и 23 мл воды нагревают в мерной колбе на 50 мл до 31—32° С, после чего, отмечая время, прибавляют 2 мл солодовой вытяжки (об-

щий объем теперь достигает 50 мл). Через каждую минуту отбирают одну каплю жидкости и на белой фарфоровой пластинке соединяют ее с одной каплей рабочего раствора иода. Реакция расщепления крахмала считается оконченной, когда при соединении каплей жидкости окраска их не будет изменяться в течение первых 10 с. Время, за которое происходит расщепление крахмала до продуктов, не окрашивающихся иодом, должно лежать в пределах от 10 до 20 мин¹. При этом следует учитывать, что для овсяного и просяного солода количество прибавляемой вытяжки за счет воды может быть выше, чем для ячменного солода (может достигать 5—25 мл).

Формула расчета амилотической активности следующая:

$$AC = \frac{0,25 \cdot 60}{at},$$

где AC — амилотическая активность; 0,25 — количество крахмала, находящегося в реакционной смеси, г; a — количество солода, соответствующее количеству солодовой вытяжки, г; t — время, за которое солодовая вытяжка расщепила крахмал до неокрашиваемых иодом продуктов, мин; 60 — пересчет на 1 ч.

Таким образом, активность, подсчитанная по приведенной формуле, показывает, какое количество крахмала способно расщепить 1 г солода за 1 ч. Размерность этой величины будет г/(г · ч).

Пример расчета. В реакционную смесь внесли 3 мл солодовой вытяжки (что соответствует 0,3 г солода). Окраска с иодом исчезла за 5 мин. Подставляем в формулу и получаем

$$AC = \frac{0,25 \cdot 60}{0,3 \cdot 5} = 10 \text{ г/(г · ч)}.$$

Определение осахаривающей активности амилаз. Более правильные результаты определения амилотической активности дает мальтоза, образующаяся в процессе амилотического осахаривания крахмала. Количество мальтозы (в мг) определяют по методу Бертрана. Для пересчета $C_{12}O$ в мальтозу пользуются табл. 6.

Приготовление некоторых реактивов. 1. Реактивы по Бертрану (см. стр. 81).

Цитратный буфер с $pH = 5,6$. Готовят 0,1 М раствор двузамещенного цитрата натрия. Для этого 21,008 г кристаллической лимонной кислоты (хорошо очищенной, без мути и растворяющейся в воде), а также 200 мл 1 н. раствора NaOH, не содержащего CO_2 помещают в мерную колбу емкостью 1 л и доводят содержимое колбы водой до метки. Потом 700 мл 0,1 М раствора двузамещенного цитрата натрия смешивают с 300 мл 0,1 н. раствора NaOH. Правильность приготовления буфера ($pH = 5,6$) проверяют иономером или потенциометром. 2%-ный раствор растворимого крахмала готовят так же, как и в работе «Определение суммарной активности амилаз», только вместо 1 г берут навеску крахмала 2 г в 100 мл. Ферментная вытяжка — в мерную колбу емкостью 100 мл переносят 5 г (с точностью до 0,01 г) тонко измельченного зерна, добавляют 70—80 мл дистиллированной воды и слегка, избегая образования пены, взбалтывают в течение 1 ч

¹ Если время исчезновения окраски с иодом будет меньше 10 мин, то надо взять 25 мл раствора крахмала, 24 мл воды и 1 мл вытяжки. Если же время исчезновения окраски будет больше 20 мин, то надо увеличить количество вытяжки за счет воды.

в шуттель-аппарате. Затем содержимое колбы доводят до метки и центрифугируют в течение 5 мин при 1500 об/мин. Центрифугат дополнительно фильтруют через складчатый фильтр: первые порции мутного фильтрата переносят вновь на фильтр.

Методика опыта. В мерную колбу емкостью 100 мл отмеряют пипеткой Мора 5 мл ферментной вытяжки (фильтрата), доводят дистиллированной водой до метки и перемешивают (при низкой активности ферментов вытяжку не разбавляют). Из полученного раствора в четыре

Таблица 6. Количество мальтозы (в мг) по Бертрану

Мальтоза	Медь	Мальтоза	Медь	Мальтоза	Медь	Мальтоза	Медь
10	11,2	33	36,5	56	61,4	79	86,1
11	12,3	34	37,6	57	62,5	80	87,2
12	13,4	35	38,7	58	63,5	81	88,3
13	14,5	36	39,8	59	64,6	82	89,4
14	15,6	37	40,9	60	65,7	83	90,4
15	16,7	38	41,9	61	66,8	84	91,5
16	17,8	39	43,0	62	67,9	85	92,6
17	18,9	40	44,1	63	68,9	86	93,7
18	20,0	41	45,2	64	70,0	87	94,8
19	21,1	42	46,3	65	71,1	88	95,8
20	22,2	43	47,4	66	72,2	89	96,9
21	23,3	44	48,5	67	73,3	90	98,0
22	24,4	45	49,5	68	74,3	91	99,0
23	25,5	46	50,6	69	75,4	92	100,1
24	26,6	47	51,7	70	76,5	93	101,1
25	27,7	48	52,8	71	77,6	94	102,2
26	28,9	49	53,9	72	78,6	95	103,2
27	30,0	50	55,0	73	79,7	96	104,2
28	31,1	51	56,1	74	80,8	97	105,3
29	32,2	52	57,1	75	81,8	98	106,3
30	33,3	53	58,2	76	82,9	99	107,4
31	34,4	54	59,3	77	84,0	100	108,4
32	35,5	55	60,3	78	85,1		

колбы Эрленмейера емкостью 100 мл отбирают пробы по 5 мл. В каждую колбу добавляют по 2 мл воды и по 3 мл цитратной буферной смеси (рН = 5,6).

В две контрольные колбы добавляют по 40 мл реактива Фелинга (20 мл раствора 1 и 20 мл раствора 2), по 10 мл 2%-ного раствора растворимого крахмала и определяют в них редуцирующие сахара мальтозы по Бертрану. Два рабочих раствора нагревают 10 мин на водяной бане при 40°С, затем прибавляют в них по 10 мл 2%-ного раствора крахмала, тоже предварительно нагретого до 40°С. Точно замечают время (лучше по секундомеру) и продолжают нагревание при 40°С еще 15 мин. По истечении указанного времени колбы вынимают из бани и тотчас же прибавляют в них по 40 мл реактива Фелинга (20 мл раствора 1 до 20 мл раствора 2). Определяют редуцирующие сахара мальтозы по Бертрану. Разность между средними данными рабочих и контрольных опытов выражают через мальтозу по табл. 6. Актив-

ность амилаз (x) вычисляют по формуле

$$x = \frac{a \cdot 0,95 \cdot 100}{g}$$

где a — количество мальтозы, определенной в опыте, г; g — навеска муки в инкубированной пробе, г; 0,95 — коэффициент пересчета мальтозы в крахмал.

Формула выражает количество крахмала, гидролизованного в течение 15 мин при 40°С и рН = 5,6 ферментами, содержащимися в 100 г исследуемого растительного продукта.

Пример расчета. Для определения суммарной активности ферментов была взята навеска муки (5,39 г) и приготовлено 100 мл болтушки. Из данного объема отобрано 5 мл фильтрата, который дополнительно разбавлен еще до 100 мл. Из последнего раствора для опыта взято 5 мл, что соответствует количеству ферментов, содержащихся в 0,0135 г муки. На титрование в рабочем опыте (среднее из двух определений) пошло 17,85 мл 0,05 н. раствора КМnO₄ с поправкой 0,9789, в контрольном — 0,69 мл. Количество восстановленной меди вычисляют по формуле (см. «Определение активности сахарозы»):

$$(17,85 - 0,69) \cdot 0,9789 \cdot 3,19 = 53,4 \text{ мг Cu.}$$

Это количество меди соответствует (табл. 6) 48,5 мг мальтозы. Подставляем полученные данные в формулу для определения активности амилаз. Таким образом, суммарная активность ферментов составит

$$x = \frac{0,485 \cdot 0,95 \cdot 100}{0,0135} = 342.$$

Кроме определения количества сахара, образующегося при ферментативном осахаривании крахмала, по Бертрану применяют также иодометрическое определение и определение по разжижению крахмального клейстера. При иодометрическом определении редуцирующих сахаров ставят контрольный опыт, дающий поправку на вещества, взаимодействующие с иодом.

Метод определения количества сахара по разжижению крахмального клейстера основан на изменении вязкости крахмального субстрата при каталитическом воздействии амилаз.

Для определения готовят крахмальный клейстер такой концентрации (примерно 2%-ный), чтобы можно было отмерять его при помощи пипетки в вискозиметр Оствальда диаметром 0,8—1 мм. Сначала определяют скорость истечения крахмального клейстера при 20°С, в который добавлено определенное количество ферментного раствора, инактивированного нагреванием в кипящей водяной бане (контроль). Затем к такому же количеству клейстера приливают такой же объем, как и в контроле активной ферментной вытяжки. Разница во времени истечения смеси в рабочем и контрольном опытах при определенной принятой температуре и рН служит критерием степени активности амилаз.

Определение проводят в термостате или в водяной бане с отрегулированной постоянной температурой.

Дифференцированное определение α- и β-амилаз. В лабораторной практике получил широкое распространение метод дифференцированного определения амилаз инактивированием одной из них. При нагревании ферментной смеси в течение 15 мин при 70°С β-амилаза почти

полностью инактивируется, а более термостабильная α -амилаза почти полностью сохраняется. Чтобы стабилизировать α -амилазу, при таком способе инактивирования β -амилазы рекомендуют прибавлять небольшое количество ацетата кальция. В отдельных случаях α -амилазу инактивируют, подкисляя смесь ферментов до $\text{pH} = 3,3$ при 0°C . Смесь выдерживают при таком pH 15 мин, затем добавляют слабую щелочь или буферный раствор до $\text{pH} = 5,0$. Такое краткосрочное подкисление не влияет на активность β -амилазы.

Методика опыта. В четыре колбы Эрленмейера емкостью 100 мл отмеряют по 5 мл фильтрата. В каждую колбу добавляют по 0,025 г ацетата кальция, перемешивают и нагревают смесь 15 мин на водяной бане при 70°C . Следует строго следить за температурой, а поэтому лучше пользоваться термостатом. Колебание температуры допускается не более $\pm 0,5^\circ\text{C}$. По окончании нагревания колбы быстро опускают в холодную воду или охлаждают под краном. В каждую колбу добавляют по 5 мл цитратного буфера ($\text{pH} = 5,6$). В две контрольные колбы добавляют по 20 мл реактива Фелинга (10 мл раствора 1 и 10 мл раствора 2) и по 10 мл 2%-ного раствора крахмала и определяют количество редуцирующих сахаров по Берtrandу.

Две колбы для рабочих опытов нагревают на водяной бане или в универсальном термостате 10 мин при 40°C , затем прибавляют предварительно нагретый до 40°C растворимый крахмал и реакционную смесь, строго выдерживая время по секундомеру, инкубируют 15 мин при 40°C . По окончании инкубации колбы вынимают из бани или термостата, тотчас прибавляют в них по 20 мл реактива Фелинга (10 мл раствора 1 и 10 мл раствора 2) и определяют редуцирующие сахара по Берtrandу. Полученный результат и будет активностью α -амилазы. Активность β -амилазы определяют по разности между суммарной активностью и активностью α -амилазы.

Кроме описанного метода для определения количества мальтозы, образующейся при ферментативном гидролизе крахмала, применяют также феррицианидный метод. Феррицианидным методом определяют общее содержание редуцирующих веществ, а поэтому возможна ошибка вследствие окисления посторонних веществ.

Рефрактометрический метод определения диастатической активности (по К. П. Петрову). Этим методом определяют суммарное количество продуктов гидролиза крахмала (декстринов, мальтозы и глюкозы). При дополнительном определении редуцирующих сахаров можно вычислить процент декстринов, вычитая количество редуцирующих веществ из общего количества продуктов расщепления крахмала. Рефрактометрический метод отличается высокой точностью и простотой выполнения.

Метод основывается на том, что увеличение показателя рефракции гидролизатов прямо пропорционально зависит от повышения концентрации растворимых продуктов ферментативного гидролиза крахмала.

Приготовление некоторых реактивов. Сухой крахмальный клейстер. Хорошо промытый вначале водопроводной, а затем 3—4 раза дистиллированной водой картофельный крахмал, проверяют на однородность и чистоту под микроскопом. Затем готовят густое крахмальное молоко (крахмал в холодной дистил-

лированной воде), которое выливают при энергичном размешивании в кипящую воду до получения однородной студнеобразной массы; в клейстере не должно быть комочков неклеистеризованного крахмала. Полученный крахмальный студень измельчают и распределяют тонким слоем на чистом стекле, накрывают фильтровальной бумагой, чтобы на него не попадала пыль, и помещают в хорошо вентилируемый сушильный шкаф (или на теплую поверхность) при 50 — 60°C . Клейстер высыхает примерно за 18—20 ч. Твердые комочки измельчают в лабораторной мельнице или ступке и просеивают сквозь тонкое металлическое или шелковое сито с отверстиями диаметром 0,2—0,3 мм. Крупные частички, оставшиеся на сите, снова пропускают через мельницу или растирают и просеивают. Так повторяют до тех пор, пока весь клейстер не пройдет через сито.

Тонко измельченный порошкообразный крахмальный клейстер помещают в вакуум-эксикатор над H_2SO_4 и масляным насосом Комовского откачивают воздух. Сушат клейстер в вакууме при комнатной температуре до постоянной массы, взвешивая один раз в сутки. Сушка клейстера продолжается 10 дней.

Вытяжка из муки, солода или другого растительного материала. На аналитических весах взвешивают 0,3000 г тонко измельченной муки или солода. Взвесив навеску на тонкой глянцевой бумаге (можно на кальке) (см. рис. 21), количественно переносят ее с бумаги в мерную колбу емкостью 100 мл. В колбу с навеской приливают при помешивании 90 мл дистиллированной воды и добавляют 5 капель толуола. Твердые частички исследуемого материала, прилипшие к стенкам колбы, смывают водой во время приливания ее. Колбу закрывают корковой пробкой, содержимое размешивают и оставляют настаиваться в течение 20 ч при комнатной температуре. Затем содержимое колбы доводят водой до метки, сильно встряхивают и быстро фильтруют через сухой складчатый бумажный фильтр в сухую колбу. Чтобы предотвратить потери влаги в результате ее испарения, колбы с фильтратом следует держать закрытыми и избегать задержек в фильтровании. Прозрачный фильтрат анализируют.

Методика опыта. В четыре пробирки взвешивают на аналитических или торсионных весах по 0,1500 г сухого крахмального клейстера. Навески взвешивают на глянцевой бумаге или кальке (см. рис. 20 и рис. 21) и количественно ссыпают в пробирки. Это количество крахмала на протяжении процесса гидролиза обеспечивает его избыток в нерастворимом состоянии. В первые две пробирки приливают точно по 1 мл фильтрата вытяжки из солода или муки или другого растительного материала и добавляют микропипеткой 0,2 мл 2%-ного раствора таннина для осаждения и инактивирования ферментов. Содержимое пробирок тщательно перемешивают стеклянными палочками, вставленными в пробки, и плотно закрывают пробками. Эти пробирки служат для контроля. В две другие пробирки также приливают по 1 мл фильтрата вытяжки, но не добавляют таннина. Пробирки плотно закрывают пробками и тщательно перемешивают содержимое этих пробирок, не открывая пробки. Буфер в этом методе применять не надо, так как реакционная смесь и без буфера имеет $\text{pH} = 5,0 \div 5,2$. Ферментативное расщепление крахмала в условиях опыта идет весьма интенсивно.

Пробирки с рабочей и контрольной смесью помещают в термостат на 1 ч при 40°C для муки, при 57°C — для солода. По окончании инкубации пробирки помещают на 5 мин в очень холодную воду. В охлажденные опытные пробирки (рабочий опыт) быстро добавляют микропипеткой по 0,2 мл 2%-ного раствора таннина и смесь хорошо перемешивают стеклянными палочками, вставленными в пробки. Капельки жидкости, оставшиеся на стенках пробирок, следует снять

палочками и смешать с основной реакционной массой. Так же перемешивают содержимое контрольных пробирок. При перемешивании нужно добиться, чтобы смесь была однородной, в ней не должно быть комочков крахмального клейстера, так как от этого во многом зависит точность получаемых результатов. По окончании всех этих операций содержимое пробирок центрифугируют в течение 10 мин при 1500 об/мин.

В процессе инкубации при 57° С крахмальный клейстер сильно набухает, а поэтому центрифугат отделяется в незначительном количестве. Для лучшего выделения центрифугата рекомендуют продолжить центрифугирование увеличить до 30 мин, а скорость центрифугирования — до 2500 об/мин.

Центрифугат переносят на призму прецизионного рефрактометра и отмечают его показания. Во избежание взмучивания центрифугата при нанесении на призму рефрактометра пробирку перед открыванием следует перевернуть пробкой вниз, чтобы центрифугат стек к пробке. Затем, осторожно открыв пробку, в зазор, образовавшийся между пробкой и краем пробирки, пропускают на призму рефрактометра необходимое количество центрифугата. Если центрифугата совсем мало (2—3 капли), то после переворачивания пробирки нужно осторожно открыть пробку, извлечь стеклянную палочку и с ее помощью перенести 1—2 капли на основание призмы.

Диастатическую активность (ДА) крахмала вычисляют по формуле

$$ДА = \frac{(b - c) \cdot 0,34 \cdot 100 \cdot 1,2}{g}$$

где (b — c) — разность средних показаний рефрактометра в рабочем и в контрольном опытах; 0,34 — число, показывающее, что повышение концентрации продуктов расщепления крахмала на 0,34% сопровождается увеличением показания рефрактометра системы РПЛ при 20° С на одно деление (при концентрации сахаров до 10 г в 100 мл раствора); 1,2 — поправка на дополнительное разбавление вытяжки муки или солода при добавлении 0,2 мл 2%-ного раствора танина; g — навеска исследуемого образца в 100 мл смеси (болтушки) воды с мукой или солодом (по методике g = 0,3000), г.

Показателем диастатической активности называется количество (в г) продуктов расщепления крахмала, образующихся при действии на него ферментов, содержащихся в 100 г растительного материала.

Пример расчета. Показание рефрактометра в рабочем опыте (среднее из двух параллельных определений) равнялось 19,59, в контрольном — 10,72. Анализировали просяной солод. Подставляем полученные данные в формулу:

$$ДА = \frac{(19,59 - 10,72) \cdot 0,34 \cdot 100 \cdot 1,2}{0,3000} = 1209,$$

т. е. 100 г просяного солода за 1 ч при температуре 57° С образует приблизительно 1200 г продуктов гидролиза крахмала или этот солод расщепляет (1200 · 0,9) более 1 кг крахмала.

Кроме суммарной активности рефрактометрическим методом можно провести дифференцированное определение активности α- и β-ами-

лаз. В этом случае фильтрат вытяжки из солода или муки предварительно нагревают в течение 15 мин при 70° С, после чего быстро охлаждают, поместив его в холодную воду. Затем в охлажденном фильтрате определяют описанным методом активность α-амилазы. Рассчитывают активность α-амилазы по той же формуле, по которой рассчитывали суммарную активность. Полученную активность α-амилазы вычитают из суммарной активности, получая разность, которая показывает активность β-амилазы.

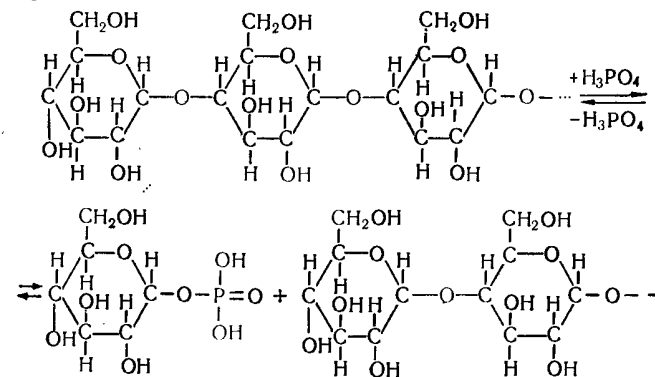
Фосфорилазы

Фосфорилазы широко распространены в растениях, животных и микроорганизмах, они участвуют в большинстве обменных процессов, связанных с синтезом и распадом, происходящими при дыхании и брожении.

Эта подгруппа ферментов, как и карбогидразы, катализирует расщепление полисахаридов.

Представителем фосфорилаз является крахмальная фосфорилаза, расщепляющая крахмал и гликоген. Фосфорилаза в отличие от амилаз ведет не гидролиз, а фосфоролитический расщепление крахмала и гликогена необратимо.

Процесс фосфоролитического расщепления крахмальной цепи можно представить следующим образом:



В этой реакции функцию воды выполняет фосфорная кислота. В результате фосфоролитического расщепления от крахмала отщепляется глюкозо-1-фосфат, который иногда называется «эфиром Кори». Этот эфир образуется не только из крахмала, но также из гликогена. Определение фосфоролитической активности растительных продуктов имеет такое же большое значение, как и определение амилолитической активности.

Определение активности крахмальной фосфорилазы. В основу метода положен принцип уменьшения неорганического и увеличения органического фосфора в реакционной смеси в процессе фосфоролитического расщепления крахмала.

Приготовление некоторых реактивов. Субстрат (растворимый крахмальный крахмал в фосфатном буфере, $pH = 6,8$) — 3 г растворимого крахмального крахмала кипятят 1 мин с 25 мл дистиллированной воды. После охлаждения добавляют раствор, содержащий 4 г Na_2HPO_4 и 1,25 г KH_2PO_4 в 75 мл воды. Вытяжка из картофеля — 70 г измельченного картофеля смешивают с 20 мл 0,1 н. раствора KCN нейтрализованного HCl. Цианид предохраняет фермент от окисления. Полученный мутный сок (около 40 мл) очищают от крахмала и других взвешенных частичек центрифугированием. Картофельную вытяжку можно готовить и без добавления цианида. В этом случае при извлечении фермента ее охлаждают в льдосоляной смеси или в снегу: 80 г измельченного картофеля помещают в ступку, охлаждаемую льдосоляной смесью или снегом, приливают 25 мл воды и измельчают до однородной массы, которую через 15—20 мин отжимают через плотную ткань. Вытяжку центрифугируют и используют для анализа в этот же день. Вытяжка из муки — 25 г муки взбалтывают с 200 мл воды и настаивают 2 ч. Раствор молибдата аммония в H_2SO_4 — 10%-ный раствор $(NH_4)_2 MoO_4$ смешивают с равным объемом концентрированной H_2SO_4 ($d = 1,84$). Реактив хранят в темном месте. Раствор хлорида олова — 25 г $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ растворяют в 1 л раствора HCl (1 : 100). Для предотвращения неблагоприятного воздействия воздуха сверху наливают вазелиновое или белое машинное масло (слой 5 мм) и хранят в склянке с нижним боковым тубусом и стеклянным краном для отбора реактива. Если $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ в лаборатории нет, можно готовить перед определением следующий реактив: 0,1 г мелко нарезанного металлического олова растворяют на водяной бане в 2 мл концентрированной HCl ($d = 1,19$) в присутствии 1 капли 10%-ного раствора $CuSO_4$ (дважды перекристаллизованного). После растворения олова в жидкость добавляют по каплям 1 мл 10%-ного раствора $CuSO_4$, а затем объем доводят водой до 10 мл при постоянном помешивании. Обычно в колориметрируемую жидкость добавляют по 5 капель данного раствора. Стандартный раствор KH_2PO_4 — соль перекристаллизовывают, промывают спиртом и высушивают. Взвешивают 0,2875 г приготовленного таким образом фосфата и растворяют его в мерной колбе емкостью 500 мл. В 1 мл этого раствора содержится 0,030 г P_2O_5 . Перед определением стандартный раствор дополнительно разбавляют в 10 раз.

Методика опыта. В колбу Эрленмейера емкостью 100 мл отмеряют пипеткой Мора 20 мл субстрата, доводят температуру смеси до $30^\circ C$, прибавляют 5 мл вытяжки из картофеля, 1 мл 0,1 М раствора KF и 2 капли толуола. В мерную колбу емкостью 250 мл отбирают 1 мл полученной смеси и доводят ее водой до метки. Из разбавленной смеси отбирают 2 параллельных пробы по 1 мл и определяют в них неорганический фосфор. Полученную смесь закрывают пробкой и выдерживают 24 ч в термостате при $25^\circ C$. По окончании инкубации отбирают еще 1 мл смеси и разбавляют водой до 250 мл. Из разбавленной смеси отбирают 2 параллельных пробы по 1 мл и определяют в них неорганический фосфор. По разности между начальным количеством фосфора и количеством фосфора после инкубации судят о количестве синтезированного эфира Кори. Кроме того, о количестве синтезированного эфира Кори можно судить по результатам определения в инкубированной пробе общего количества фосфора (после гидролиза с H_2SO_4) и неорганического фосфора до гидролиза. Увеличение количества органического фосфора соответствует количеству глюкозо-1-фосфата, образующегося при фосфороллизе крахмала.

Гидролиз пробы ведут следующим образом: к 1 мл разбавленной смеси (1 : 250) прибавляют 1 мл 2 н. раствора H_2SO_4 и гидролизуют на кипящей водяной бане 7 мин. Во вторую пробу добавляют также 1 мл раствора 2 н. H_2SO_4 , но не нагревают (гидролиз не идет). Затем пробы нейтрализуют содой и определяют фосфор.

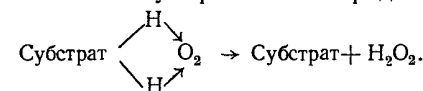
Колориметрическое определение фосфора (можно определять и другими методами). Основано на реакции фосфатов с молибдатом аммония, в результате которой образуется комплексное соединение голубого цвета. Его восстанавливают до окрашенного в темно-синий цвет оксида молибдена, который называется молибденовой синью.

Методика опыта. В мерную колбу емкостью 100 мл наливают 1 мл разбавленной смеси (1 : 250), добавляют 75 мл дистиллированной воды и 2,5 мл раствора $(NH_4)_2 MoO_4$ в H_2SO_4 хорошо взбалтывают, добавляют раствор $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (до окрашивания в голубой цвет) и доводят водой до метки. В колбе должно быть от 0,03 до 0,3 мг P_2O_5 . Параллельно берут стандартный раствор в 3 мерные колбы (каждая емкостью 100 мл). В одну наливают 5, во вторую — 10 и в третью — 20 мл, приливают те же растворы, что и в предыдущем случае, содержимое колб доводят водой до метки и хорошо перемешивают. Раствор окрашивается в синий цвет. Интенсивность окраски сравнивают в колориметре.

Оксидоредуктазы

К классу оксидоредуктаз относится большое количество самых разнообразных ферментов, принимающих участие в окислительно-восстановительных процессах. Они играют большую роль в дыхании и брожении. К этим ферментам прежде всего относятся дегидрогеназы.

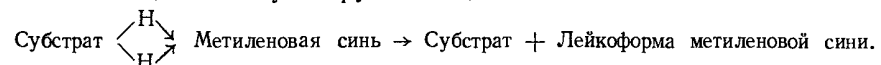
Простейшей системой окисления и восстановления, катализируемой дегидрогеназами, является система, состоящая из окисляемого субстрата, фермента и молекулярного кислорода:



Вещество, отдающее свой водород, называется донатором, принимающее (водород) — акцептором.

Дегидрогеназы делятся на анаэробные и аэробные.

Анаэробные дегидрогеназы передают водород промежуточным продуктам брожения (процесс анаэробного дыхания), а также метиленовой сини, тиолблау и другим веществам подобного типа по схеме



У анаэробных дегидрогеназ переносчиком водорода является кофермент никотинамидадениннуклеотид (дифосфопиридиннуклеотид), сокращенно НАД, восстановленная форма которого — $НАД \cdot H_2$. Коферментом других анаэробных дегидрогеназ является никотинамидадениндинуклеотидфосфат НАДФ (трифосфопиридиннуклеотид), т. е. в нем не два фосфатных остатка, а три. В состав НАД и НАДФ входят витамины «РР» — амид никотиновой кислоты.

У аэробных дегидрогеназ переносчиком водорода является кофермент флавиномононуклеотид (сокращенно ФМН). Имеются флавиновые ферменты, коферментом которых является флавинадениндинуклеотид (сокращенно ФАД).

В состав аэробных дегидрогеназ в виде кофермента входит рибофлавин (витамин В₂).

На примере аэробных и анаэробных дегидрогеназ четко видна каталитическая функция витаминов, которые в соединении с белком образуют качественно новую систему — фермент.

Окислительно-восстановительный процесс часто идет ступенчато, т. е. вначале включаются анаэробные дегидрогеназы, которые передают водород аэробным дегидрогеназам, после чего водород соединяется с кислородом воздуха.

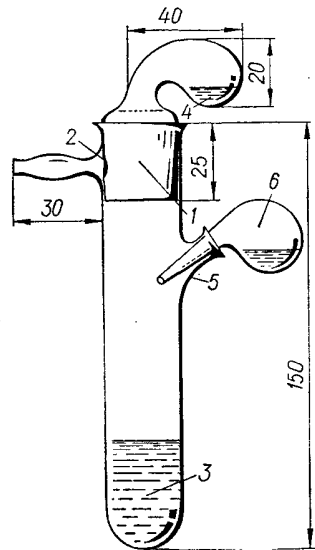


Рис. 30. Прибор для определения активности дегидрогеназ.

Определение активности дегидрогеназ. Метод основан на восстановлении метиленовой сини в бесцветную лейкоформу в условиях вакуума. Дубильные вещества оказывают инактивирующее действие на дегидрогеназы, поэтому при определении активности дегидрогеназ семян с них необходимо снять оболочки, в которых содержатся дубильные вещества.

Методика опыта. Прибор для определения дегидрогеназ (рис. 30) предварительно испытывают на сохранение в нем вакуума в течение нескольких часов. В боковой стенке пробки 1 имеется отверстие 2, поэтому пробка может служить краном. Пробку смазывают специальной вакуумной смазкой: три части парафина, две части вазелина и две части сырого каучука (чистый вазелин не пригоден). В отверстие 5 вставляется сосуд 6 на шлифах для донатора, который добавляют по 2 мл.

Взвешивают 5 г семян, очищают их от оболочек и тщательно растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком и небольшим количеством 0,87%-ного раствора К₂НРО₄. Измельченную массу количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, доводят раствором К₂НРО₄ до метки, хорошо перемешивают и оставляют для настаивания на 30 мин при комнатной температуре. Болтушку несколько раз перемешивают, а затем центрифугируют.

В пробирку прибора наливают 3 мл ферментной вытяжки (центрифугата) 3, а в верхнюю часть прибора — метиленовой сини 4 (1 мл). Прибор закрывают пробкой, соединяют отводную трубку с промывалкой Тищенко и ртутным манометром. Откачивают воздух до давления 1,33—1,60 кн/м². Если жидкость вспенивается, то воздух следует отсасывать медленно. Затем поворачивают кран на 90°, а прибор помещают в термостат при 37° С. Содержимое прибора смешивают и отмечают время (в мин), необходимое для обесцвечивания метиленовой сини. Это время служит критерием активности дегидрогеназ.

Определение активности липооксигеназы (липооксидазы). Липооксигеназа катализирует окисление молекулярным кислородом ненасыщенных жирных кислот с двумя, тремя и большим числом двойных связей с образованием пероксидов. Однако не исключается возможность окисления и олеиновой кислоты. Активность липооксигеназы определяют в масло- и жиросодержащем сырье и в жировых продуктах холодной обработки.

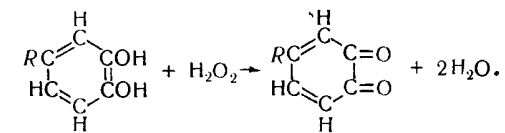
Методика опыта. 1 г измельченного материала смешивают с 50 мл дистиллированной воды, нагретой до 40° С, приливают 100 мл рафинированного масла при температуре 40° С и взбалтывают 20 мин в шуттель-аппарате. Затем 10 мл смеси наливают в центрифужную пробирку, центрифугируют 5 мин, добавляют NaCl (на кончике ножа) для ускорения разрушения эмульсии и снова центрифугируют 10 мин. В полученном после центрифугирования прозрачном масле определяют пероксидное число.

Активность липооксигеназы x характеризуется изменением пероксидного числа масла, обработанного в указанных условиях, в присутствии 1 г исследуемого материала:

$$x = ПЧ_1 - ПЧ_2,$$

где $ПЧ_1$ — пероксидное число масла с добавлением исследуемого материала; $ПЧ_2$ — пероксидное число масла без добавления исследуемого материала.

Определение активности пероксидаз. Пероксидазы широко распространены в растениях и играют весьма важную роль в окислительных процессах. Пероксидаза окисляет многие фенолы и некоторые ароматические амины. Окисление тех или иных соединений пероксидазой происходит при помощи пероксида водорода или другого, органического, пероксида. С пероксидом водорода пероксидаза образует комплексное соединение, в результате чего происходит активирование пероксида водорода, который действует как акцептор водорода. Реакцию окисления схематично можно представить следующим образом:

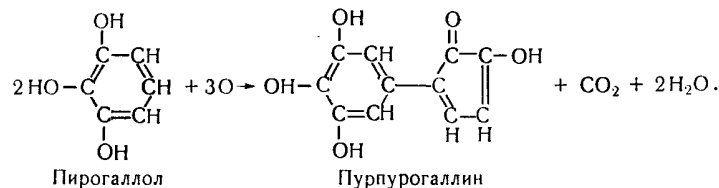


Пероксидаза наряду с полифенолоксидазой может катализировать окисление дыхательных хромогенов в дыхательные пигменты.

В дрожжах найдена цитохромпероксидаза, которая обладает способностью в присутствии Н₂О₂ окислять восстановленный цитохром. Железо цитохрома переходит в трехвалентное, а Н₂О₂ восстанавливается при этом в воду. Пероксидаза — двухкомпонентный фермент, второй компонент его — гематин. Ингибиторами пероксидазы являются HCN, Н₂S, гидроксилламин, тиомочевина, избыток Н₂О₂ и др.

В лабораторной практике получил широкое распространение метод определения активности пероксидазы, основанный на окислении пирогаллола в присутствии Н₂О₂ до пурпурогаллолина. Реакция протекает

по следующей схеме:



Пурпурогаллин выпадает в виде бурого осадка, не растворимого в воде.

Приготовление вытяжки пероксидазы. 2—4 г растительного материала (в зависимости от ожидаемой активности фермента) тщательно растирают с чистым песком, не содержащим соединений железа, или битым стеклом. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу емкостью 200 мл, доводят водой до метки, взбалтывают и настаивают 2 ч, а затем фильтруют. Фильтрат служит для определения активности. Активность пероксидазы можно также определять непосредственно в болтушке, не фильтруя ее.

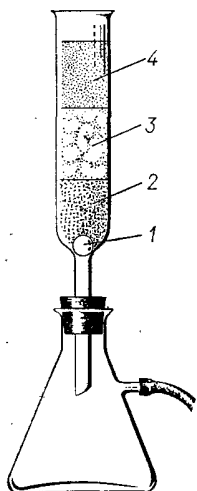


Рис. 31. Приспособление для фильтрования пурпурогаллина:

1 — стеклянный шарик; 2 — слой стеклянной ваты; 3 — крупно нарезанная вата; 4 — мелко растертая стеклянная вата.

Методика опыта. В две колбы Эрленмейера емкостью 100 мл наливают по 5 мл 2,5%-ного раствора пирогаллола, 2 мл 1%-ного раствора пероксида водорода и 18 мл воды. Затем в эти колбы добавляют пипеткой Мора по 25 мл фильтрата. В третью колбу (контрольную) наливают 25 мл фильтрата и нагревают 10 мин на плитке с обратным холодильником (для предотвращения вспенивания бросают кусочек парафина). После охлаждения приливают те же растворы, что и в рабочем опыте. Колбы закрывают пробками и оставляют на определенный срок, обычно на 20 ч в термостате при 25° С. Для получения сравнимых результатов продолжительность инкубации и температура должны быть постоянными. В течение указанного времени инкубации выпадает заметный бурый осадок в рабочих пробах и весьма слабый в контрольных. Жидкость в рабочих опытах имеет более интенсивную окраску, чем в контрольных.

По окончании инкубации фермент инактивируют, добавляя к смеси 1 мл 5%-ного раствора H_2SO_4 . Колбы перед фильтрацией смеси охлаждают, так как осадок пурпурогаллина заметно растворяется при повышении температуры. Осадок из колбы переносят

в центрифужные пробирки, центрифугируют, осторожно декантируют прозрачный центрифугат, приливают охлажденную воду, перемешивают, центрифугируют и снова декантируют центрифугат. Так повторяют до тех пор, пока промывные воды не перестанут восстанавливать KMnO_4 .

Осадок пурпурогаллина переносят в заряженную трубку Аллина (рис. 31) и промывают холодной дистиллированной водой с отсасыва-

нием или через стеклянные фильтры № 1 и 2. Промытый осадок пурпурогаллина растворяют в 5—10 мл концентрированной H_2SO_4 ($d = 1,84$), подогретой до 50—60° С. Для лучшего растворения осадок хорошо перемешивают стеклянной палочкой. Раствор переносят количественно в колбу, промывая трубку Аллина или стеклянный фильтр три раза концентрированной H_2SO_4 и водой. Объем воды, взятой для промывки, не должен превышать $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$ объема кислоты, иначе может выпасть осадок пурпурогаллина. Если осадок выпал, то в колбу приливают дополнительно H_2SO_4 до растворения осадка. К полученному раствору (он может быть пурпурно-красным, если количество осадка большое) приливают определенное количество 0,1 н. раствора KMnO_4 , а затем его избыток оттитровывают оксалатом натрия. Перед концом титрования раствор нагревают.

Раствор (пурпурно-красный — в опытной, буроватый — в контрольной пробе) можно титровать и непосредственно 0,1 н. раствором KMnO_4 . По мере прибавления раствора KMnO_4 цвет жидкости меняется от красного через темно-бурый и желтый до светло-зеленого. Содержимое колбы, окрашенное в светло-зеленый цвет, нагревают на кипящей водяной бане для ускорения конца реакции окисления. Титрование прекращают, когда одна лишняя капля раствора KMnO_4 окрасит жидкость в розовый цвет и окраска будет сохраняться 0,5 мин.

Активность пероксидазы выражают в миллилитрах 0,1 н. раствора KMnO_4 , пересчитанных на 1 г сухого вещества.

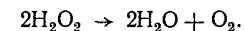
Пример расчета. Допустим, что для титрования в рабочем опыте (среднее из двух параллельных определений) пошло 41,7 мл 0,1 н. раствора KMnO_4 , а в контрольном — 0,9 мл. Для анализа взяли 25 мл вытяжки. Навеска исследуемого материала для получения вытяжки составляла 4,00 г. Таким образом, в опыте и контроле исследовалось по $\frac{4,00 \cdot 25}{200} = 0,5$ г. Активность пероксидазы вычисляем по формуле

$$\frac{(41,7 - 0,9)}{0,5} = 81,6.$$

Пурпурогаллин можно определить и колориметрическим способом. Промытый осадок пурпурогаллина растворяют в определенном объеме эфира и сравнивают в колориметре со стандартным эфирным раствором чистого препарата пурпурогаллина (5 мг в 50 мл эфира).

Известен также колориметрический метод определения пероксидазы по А. Н. Баху и С. Р. Зубковой, построенный на окислении гваякола с образованием соединения, окрашенного в синий цвет. Пероксидаза окисляет бензидин в *n*-хинондиимид с образованием окрашенного (красного) соединения. Это позволяет также применять колориметрический способ для определения пероксидазы.

Определение каталазы (по А. Н. Баху и А. И. Опарину). К классу оксидоредуктаз относится каталаза, которая катализирует разложение пероксида водорода по уравнению



Пероксид водорода является для клеток ядовитым веществом, он образуется во время окислительно-восстановительного процесса при восстановлении молекулярного кислорода.

Каталаза — двухкомпонентный фермент. Одним компонентом его является гематин, который представляет собой окисленную протетическую группу гемоглобина крови. Каталаза парализуется HCN, H₂S и фторидами.

Количественно определяют каталазу с помощью титрования пероксида водорода раствором KMnO₄. Реакция идет по уравнению

$$2\text{KMnO}_4 + 5\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{KHSO}_4 + 2\text{MnSO}_4 + 8\text{H}_2\text{O} + 5\text{O}_2.$$

О количестве пероксида водорода, разрушенного ферментом, судят по разности объемов (мл) 0,1 н. раствора KMnO₄, израсходованных для титрования в контрольном и рабочем опытах.

Приготовление вытяжки из муки или другого растительного материала — на аналитических весах взвешивают по разности в мерную колбу емкостью 100 мл 2 г муки или другого хорошо измельченного растительного продукта. В колбу приливают дистиллированную воду, содержащую ее хорошо перемешивают, добавляют 2—3 капли толуола, доводят водой до метки и смесь настаивают 2 ч при комнатной температуре. После настаивания жидкость отфильтровывают через сухой складчатый фильтр или центрифугируют. В фильтрате или центрифугате тотчас же определяют каталазу.

Методика опыта. Отбирают четыре пробы прозрачного фильтрата или центрифугата по 20 мл каждая: две опытные и две контрольные. Контрольные пробы кипятят 5 мин (на сетке) для инактивации фермента.

К опытным и контрольным пробам прибавляют по 20 мл дистиллированной воды, по 3 мл 1%-ного раствора H₂O₂, предварительно нейтрализованного 0,1 н. раствором NaOH, и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. По истечении 30 мин к пробам прибавляют по 5 мл 10%-ного раствора H₂SO₄ и оставшийся H₂O₂ титруют 0,1 н. раствором KMnO₄. Об активности каталазы судят по количеству миллиграммов H₂O₂, которое разрушилось в течение 30 мин ферментом, содержащимся в 1 г исследуемого материала.

Активность каталазы определяют по формуле

$$AK = \frac{(a - b) 1,7}{g},$$

где *a* — количество 0,1 н. раствора KMnO₄, израсходованного для титрования в контрольной пробе, мл; *b* — количество 0,1 н. раствора KMnO₄, израсходованного на титрование в рабочем опыте (1 мл 0,1 н. раствора KMnO₄ эквивалентен 1,7 мг H₂O₂), мл; *g* — навеска исследуемого материала, г.

Пример расчета. Взята навеска муки 2,1675 г. На титрование в контрольной пробе пошло 12,51 мл 0,1 н. раствора KMnO₄, в опытной — 9,86 мл. Количество фильтрата (20 мл), взятого для титрования, соответствует $\frac{2,1675 \cdot 20}{100} = 0,4335$ г муки. Подставляем полученные данные в формулу:

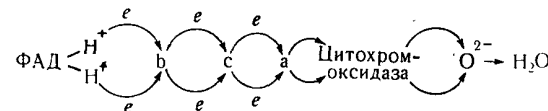
$$AK = \frac{(12,51 - 9,86) 1,7}{0,4335} = 10,4.$$

Настоящий метод широко применяют в лабораторной практике. Кроме того, известны еще газометрические методы определения активности каталазы специальными приборами. В основу газометрических определений положен принцип измерения объема кислорода, выделя-

ющегося в процессе разложения H₂O₂ при каталитическом воздействии каталазы.

Определение цитохромов и цитохромоксидазы (терминальных систем). Цитохромы и цитохромоксидаза — ферменты геминной природы. Они имеют почти одинаковую протетическую группу, но различные белковые компоненты. Каталитические свойства геминных ферментов связаны с входящим в их молекулу железом, которое принимает и отдает электроны, изменяя при этом свою валентность, попеременно восстанавливаясь и окисляясь. Перенос электронов заканчивается с образованием цитохромоксидазы, способной реагировать непосредственно с кислородом.

В цепи переноса электронов цитохромы располагаются в следующей последовательности:



Нарастание окислительно-восстановительного потенциала *E*₀ (В) примерно можно представить следующим образом: ФАД · H₂: 0,05В; цитохром b: 0,08В; цитохром c: 0,26В; цитохром a: 0,29В; цитохромоксидаза: 0,55В; кислород: 0,81В.

Водород при этом процессе ионизируется, а кислород, получая два электрона, активируется и, соединяясь с водородом, образует воду.

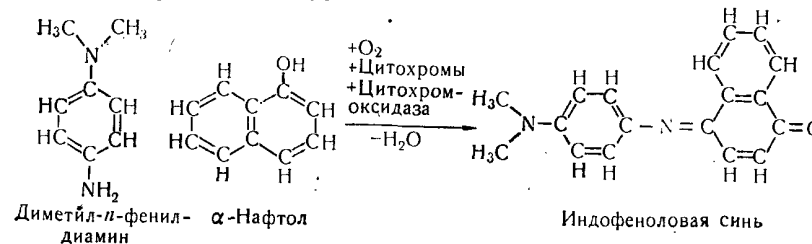
Цитохромы и цитохромоксидаза находятся во всех клетках растительных и животных организмов. Цитохромоксидаза очень чувствительна к действию HCN, H₂S и к нагреванию (инактивируется при 55—60° С).

Приготовление реактива «нади» (от слов — нафтол и диамин) — непосредственно перед употреблением (реактив нестойк) смешивают 5 капель 1%-ного водного раствора диметил-*n*-фенилдиамина с 5 каплями 1%-ного спиртового раствора α-нафтола.

Методика опыта. I. Растительную ткань смачивают реактивом «нади», на воздухе ткань окрашивается в синий цвет.

Эта реакция обусловлена окислением реактива «нади» кислородом воздуха благодаря каталитическому действию цитохромов и цитохромоксидазы. При окислении реактива «нади» образуется индофеноловая синь.

Реакция протекает по уравнению:



II. Отбирают 500 мг хорошо измельченной свежей растительной ткани. Затем ткань экстрагируют 20-кратным количеством воды, тщательно растирая ее в фарфоровой ступке. После первой экстракции ткань отфильтровывают через марлю и экстракцию повторяют еще 2 раза. Освобожденная от редуцирующих веществ ткань содержит цитохромы и цитохромоксидазу.

Около 50 мг проэкстрагированной мышечной кашицы помещают на кусочек фильтровальной бумаги и добавляют 1—2 капли реактива «нади». Через 3—5 мин появляется синее или зеленовато-синее окрашивание, что указывает на присутствие цитохромов и цитохромоксидазы. Другую часть проэкстрагированной мышечной ткани (около 50 мг) нагревают в кипящей водяной бане (в пробирке) в течение 5 мин, охлаждают и переносят на кусочек фильтровальной бумаги. При добавлении реактива «нади» окраска не появляется. Это свидетельствует о том, что цитохромы и цитохромоксидазы инактивировались при нагревании.

Определение активности тирозиназы. Тирозиназа (фенолоксидаза) широко распространена в растениях. Она играет большую роль в пищевых производствах, катализируя образование темноокрашенных продуктов, называемых меланинами. Весьма активная тирозиназа содержится в некоторых партиях пшеничной муки, в ржаной муке, в грибах и других растительных продуктах. Темный цвет ржаного хлеба, надо полагать, частично объясняется окислительным действием тирозиназы. Потемнение некоторых сортов макарон при их сушке связано с наличием в муке этого фермента. Тирозиназа по своей химической природе является белком, содержащим от 0,2 до 0,3% меди. Метод определения активности тирозиназы основан на окислении тирозина.

Приготовление вытяжки фермента из растительного материала. На аналитических весах взвешивают около 1 г ржаной муки свежего помола. Навеску переносят в фарфоровую ступку, добавляют немного битого стекла, 5 мл дистиллированной воды и тщательно растирают. Растертую массу количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл при помощи широкой воронки. Ступку, пестик и воронку несколько раз споласкивают дистиллированной водой. Содержимое колбы доводят водой до метки, тщательно встряхивают и оставляют на 3—4 ч настаиваться при комнатной температуре. По истечении срока настаивания содержимое колбы хорошо встряхивают и болтушку фильтруют через складчатый фильтр. Фильтрат используют для определения тирозиназы.

Субстрат — 0,05 г тирозина растворяют в 100 мл 0,04%-ного раствора Na_2CO_3 при слабом нагревании на водяной бане.

Методика опыта. В четыре колбы Эрленмейера емкостью 200 мл наливают по 10 мл субстрата (раствор тирозина) и по 30 мл H_2O . Колбы ставят на 10 мин в термостат при 38—40° С, добавляют в две из них по 10 мл водной вытяжки и в две другие (контрольные) по 10 мл инактивированной водной вытяжки, по три капли толуола и снова ставят в термостат (при той же температуре). Поскольку для действия ферментов необходим кислород, то рекомендуют через содержимое колб пропускать воздух, предварительно очищенный в склянке Тищенко, заполненной водой с толуолом.

Время инкубирования определяют по изменению окраски жидкости в рабочих опытах (жидкость вначале темнеет, а затем становится почти черной). Отмечают время и останавливают реакцию, добавляя 10%-ный раствор CH_3COOH до кислой среды и прокипятив смесь. К содержимому колб после остывания прибавляют по каплям 10%-ный раствор ацетата свинца для полного осаждения белков и меланинов.

Смесь количественно переносят с дистиллированной водой в мерные колбы емкостью 100 мл, доводят водой до метки и фильтруют через складчатый фильтр. Пипеткой переносят определенное количество фильтрата в колбу, осторожно подкисляя его H_2SO_4 , чтобы удалить избыток свинца. Еще раз фильтруют и промывают осадки на фильтрах. Полученную жидкость упаривают примерно до $\frac{1}{3}$ объема и количественно с дистиллированной водой переносят в мерные колбы, подкисляя H_2SO_4 так, чтобы при доведении водой до метки ее концентрация достигла приблизительно 2,5%.

В четыре небольшие конические колбы (по 25 мл) приливают: по 10 мл раствора (параллельные пробы), в пятую — 10 мл стандартного раствора тирозина. Затем добавляют по 1 мл реактива Миллона (см. стр. 19) и перемешивают. Пробу колориметрируют через 45 мин стояния при комнатной температуре. При более длительном выдерживании пробы окраска становится более интенсивной, но выделяется осадок, который можно отделить центрифугированием.

Количество тирозина в контрольных и рабочих опытах вычисляют приведенным выше способом.

По разности между содержанием тирозина (по средним данным из двух определений) в контрольном опыте и содержанием его в рабочем опыте судят о степени активности тирозиназы. Для получения сравнимых данных разных образцов исследуемого материала строго соблюдают время, температурный режим и другие условия опыта.

Кроме колориметрического метода, известен метод А. Н. Баха, по которому количество тирозина определяют титрованием темноокрашенной жидкости KMnO_4 . Смесь после инкубации в термостате подкисляют 1 мл 10%-ного раствора H_2SO_4 и титруют 0,1 или 0,01 н. раствором KMnO_4 до обесцвечивания. Затем тотчас после смешивания фильтрата с тирозином и последующего подкисления титруют в контрольном опыте. Об активности тирозиназы судят по разности объемов раствора KMnO_4 , затраченного на титрование в рабочем и контрольном опытах.

Определение активности полифенолоксидазы. Метод определения полифенолоксидазы основан на ее способности окислять аскорбиновую кислоту. При этом методе определяют полифенолоксидазы только в первые 2 мин действия на субстрат.

Приготовление субстрата — растворяют 100 мг аскорбиновой кислоты в 100 мл воды.

Методика опыта. В две колбы или в два стакана отмеряют по 1 мл фильтрата, прибавляют по 3 мл воды, по 2 мл раствора аскорбиновой кислоты и по 1 мл 0,02 М раствора пирокатехина. В две контрольные колбы прибавляют по 1 мл предварительно прокипяченного в течение

5 мин фильтрата (для инактивации фермента) и все те вещества, что и в рабочем опыте. Температура всех добавляемых компонентов должна быть доведена до 18—20° С. Колбы равномерно встряхивают в течение 2 мин (по секундомеру). Затем добавляют 1 мл 10%-ного раствора H_3PO_4 и титруют раствором иода в присутствии крахмала. Активность выражают в миллилитрах 0,01 н. раствора иода на 1 мл фильтрата, исследуемого на содержание полифенолоксидазы.

ВИТАМИНЫ

Витаминами называют биологически активные органические соединения со сравнительно низкой молекулярной массой. Они широко распространены в живой природе и играют большую роль в процессах обмена веществ. Открытие витаминов принадлежит нашему отечественному ученому Н. И. Лунину, который в 1880 г. доказал своими опытами на мышах, что витамины являются обязательной составной частью пищи.

Отсутствие витаминов в пище сопровождается глубокими физиологическими нарушениями, ведущими к заболеваниям, получившим название авитаминозов. Если болезнь возникает вследствие отсутствия нескольких витаминов, то ее обычно называют полиавитаминозом. При недостатке того или иного витамина возникает заболевание, называемое гиповитаминозом.

При чрезмерном употреблении витаминов может возникнуть заболевание, называемое гипervитаминозом. В зависимости от недостатка того или иного витамина возникают такие заболевания, как цинга, рахит, куриная слепота и др.

Учение о витаминах в настоящее время превратилось в самостоятельную науку — витаминологию. Большим количеством исследований показано, что биологическая активность витаминов объясняется их неразрывной связью с ферментами.

Витамины необходимы не только животным, но и растениям и микроорганизмам.

Основным источником витаминов для человека и животных являются растения, где они синтезируются в значительных количествах. Некоторые ткани высших растений (корни, камбиальные ткани и др.) не синтезируют витаминов, но требуют их для своего роста и развития. Так, например, было установлено, что витамины B_1 и B_2 (тиамин и рибофлавин) стимулируют рост корешков многих растений.

Низшие растения — грибы и бактерии — также нуждаются в витаминах. Некоторые виды низших растений обладают сильно выраженной способностью к синтезу определенных витаминов, что имеет большое практическое значение. Определенные виды дрожжей в соответствующих условиях питания (с добавлением тиазола) синтезируют значительное количество витамина B_1 . Дрожжи способны не только интенсивно синтезировать витамин B_1 , но и концентрировать его. Большие количества витамина B_2 синтезируются дрожжеподобными микроорганизмами. Синтез рибофлавина особенно интенсивно проте-

кает при содержании в питательной среде солей железа. Подбирая определенные расы, можно достигнуть весьма большого содержания рибофлавина и в пекарских дрожжах, а в связи с этим в значительной степени обогатить хлеб витамином B_2 , которого обычно в муке мало.

Кроме того, потребность микроорганизмов в витаминах используется в настоящее время для их количественного определения. Ранее количественное определение витаминов в пище сводилось к биологическим методам. Опыты проводили на животных, которым скармливалась та или иная пища, и по изменениям, протекающим в организме животного, судили о содержании искомого витамина в исследуемом продукте. Биологический метод применяется и сейчас для определения витамина D_2 . Существенный недостаток биологического метода заключается в том, что он требует много времени и значительных материальных затрат.

Дальнейшее изучение химического состава витаминов, выделенных из тканей, установление их структуры и подтверждение ее синтезом позволили разработать более быстрые и точные химические и физические методы количественного определения витаминов.

Витамины делятся на две группы. К первой относят витамины, растворимые в жирах, а ко второй — витамины, растворимые в воде. К жирорастворимым относят витамины А, D, E, K, а к водорастворимым — B_1 , B_2 , PP, B_6 , P, H, B_{12} , C и др. Вначале, когда химическая природа витаминов была изучена еще недостаточно, их называли начальными буквами латинского алфавита. В настоящее время эти обозначения заменяют названиями химических соединений. Так, например, витамин C называют аскорбиновой кислотой, PP — никотиновой кислотой, B_2 — рибофлавином и т. д. Кроме того, существуют названия витаминов, которые даны по их способности предотвращать то или иное заболевание, возникающее при отсутствии или недостатке витаминов. Обычно к названию заболевания добавляют приставку анти- антирахитичный, антицинготный, антиневритный и т. д.

Жирорастворимые витамины

ВИТАМИНЫ ГРУППЫ А (РЕТИНОЛ)

Известно несколько веществ, обладающих А-витаминной активностью. Витамин A_1 , как видно из приведенной ниже формулы, представляет половину молекулы β -каротина. Витамин A_2 найден в жире печени рыб. В печеночном жире млекопитающих и других животных найден витамин A_3 . Четвертое вещество, обладающее некоторыми свойствами витамина А, выделено из жира акулы. Это так называемый «субвитамин» А. Кроме того, показано, что существует в природе стереоизомер витамина А (невитамин А). Из печени кита выделено вещество неизвестного химического строения, названное китолом, которое при нагревании до 200° С приобретает биологическую (витаминную) активность витамина группы А.

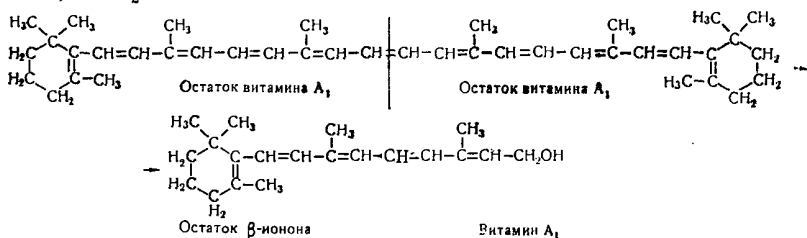
Наиболее характерными заболеваниями при отсутствии витаминов группы А являются гемералопия («куриная слепота»), ксерофтальмия

(высыхание слизистой оболочки) и кератомалация (размягчение роговой оболочки глаза). Введение препарата витамина А немедленно прекращает заболевание. Кроме того, при отсутствии этого витамина поражаются мочевые пути, дыхательный и желудочно-кишечный тракты и т. п.

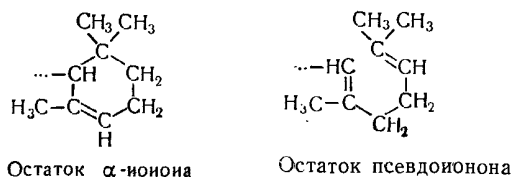
Витамин А синтезируется в организме животного и человека из каротинов, содержащихся в растениях. Каротины животные и человек получают с пищей. В организме человека происходит гидролиз каротина при каталитическом воздействии фермента каротиназы, в результате чего образуется витамин А. Таким образом, каротин может заменять витамин А в питании. Кроме того, витамин А содержится в рыбьем жире, сливочном масле и других животных продуктах.

В растениях найдено три изомера каротинов: α -, β - и γ -каротины. Наиболее важным из них является β -каротин, из симметричной молекулы которого в организме животного получают две молекулы витамина А.

Витамин A_2 очень близок по химической структуре к витамину A_1 и отличается лишь тем, что в его боковой цепи на одну двойную связь больше, чем в витамине A_1 . Витамин A_1 имеет пять двойных связей, а A_2 — шесть.



Молекулы α - и γ -каротинов в отличие от β -каротина несимметричны. На одном конце цепи у α - и γ -каротинов расположены остатки β -ионового кольца, а на другом — у α -каротина остаток α -иона, а у γ -каротина — остаток псевдоиона. В остальном структуры α -, β - и γ -каротинов идентичны:



Из α - и γ -каротинов в организме животного и человека образуется по одной молекуле витамина A_1 , а поэтому их биологическая (витаминная) активность в два раза ниже, чем β -каротина.

Поскольку биологическое действие витаминов А и каротинов почти одинаково, то при количественном учете этих факторов достаточно бывает определить каротины или суммарно каротины и витамин А.

Хроматографический метод определения каротинов. Каротины широко распространены в природе. Больше всего каротина в зеленых

частях растений и корнях моркови (от этого и специфическая окраска моркови). Каротины были впервые выделены из моркови, откуда они и получили свое название (от лат. *carota* — морковь). Метод определения каротинов построен на извлечении их из экстрактов растений методом хроматографии и дальнейшего колориметрирования. В лабораторной практике широко пользуются методом хроматографического выделения каротинов на колонке по Цвету, модифицированным И. К. Мурри.

Приготовление адсорбентов. Чистый $MgCO_3$ нагревают при $200^\circ C$ в течение 1 ч, затем рассыпают на стекле и оставляют на воздухе на 17 ч.

Al_2O_3 заводского приготовления в виде воздушно-сухого порошка просеивают через мелкое сито (с отверстиями диаметром 0,25 мм). Адсорбционную способность Al_2O_3 проверяют, пропуская через адсорбционную колонку, заполненную Al_2O_3 , раствор пигментов зеленых листьев или пигментов, полученных из моркови. Хлорофилл и ксантофилл задерживаются в адсорбционной колонке, а каротин легко проходит в приемник при промывании ее бензином. Если необходимо, то адсорбционную способность Al_2O_3 усиливают подсушиванием при $90-100^\circ C$. Испытанный адсорбент хранят в герметично закрываемых банках.

Стандартный раствор азобензола: 0,1450 г чистого (перекристаллизованного из спирта и высушенного) азобензола растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл в 96%-ном растворе этилового спирта и доводят спиртом до метки. Для работы этот исходный раствор разбавляют в 10 раз 96%-ным раствором этилового спирта. Растворы азобензола хранят в темноте, чтобы они не изменяли интенсивности окраски.

Методика опыта. Навеску растительного материала от 1 до 5 г и более (в зависимости от его влажности) растирают в фарфоровой ступке с 5—8 г кварцевого песка или битого стекла. Весь процесс измельчения и растирания ведут не более 30 мин¹. Для обезвоживания в ступку насыпают прокаленный Na_2SO_4 (2 г на 1 г сырого растительного материала), растирают до получения сухого тонкого порошка и оставляют на 20—30 мин.

В узкую часть хроматографической трубки закладывают ватный тампон толщиной около 1 см. Затем трубку наполняют Al_2O_3 , внося его небольшими порциями. Адсорбент после внесения каждой порции уплотняют стеклянной палочкой. Высота столбика Al_2O_3 должна быть от 50 до 100 мл в зависимости от количества каротина и состава адсорбируемых пигментов. На слой адсорбента помещают слой ваты.

Сухой порошок из ступки переносят количественно в верхнюю свободную часть трубки, избегая при этом его уплотнения. В трубку наливают бензин ($t_{кип} = 70 \div 80^\circ C$) и дают некоторое время постоять, пока порошок не смочится бензином. Затем при слабом отсасывании исследуемый материал медленно промывают бензином, ополаскивая ступку, до тех пор, пока не исчезнет желтая окраска капель, стекающих в колбу Бунзена. При этом необходимо следить, чтобы адсорбент всегда был покрыт бензином, так как каротин легко окисляется в струе проходящего через трубку воздуха.

¹ Свежий растительный материал нельзя сушить на воздухе, так как при сушке разрушаются каротины. По той же причине анализ нужно вести в день сбора материала. Если нет возможности сразу приступить к анализу, то растертую навеску заливают спиртом и хранят в закрытом сосуде в темном месте несколько дней. В момент анализа спирт сливают, а навеску растирают, как указано. Спирт используют для экстракции каротина из данной навески.

Элюат каротинов из колбы Бунзена количественно переносят в мерную колбу емкостью 50 или 100 мл (в зависимости от объема жидкости) и доводят бензином до метки. Полученный раствор каротинов сравнивают со стандартным раствором азобензола. В 1 мл раствора, равного по окраске раствору азобензола, содержится 0,00235 мг каротинов.

Содержание каротинов в исследуемом продукте определяют по фотоэлектроколориметру. Концентрацию каротинов определяют по калибровочной кривой, составленной по указанному стандартному раствору азобензола.

Количество каротинов (в мг%) в исследуемом продукте вычисляют по формуле

$$p = \frac{av \cdot 100}{g}$$

где a — количество каротинов в 1 мл исследуемого раствора каротинов, установленное по калибровочной кривой, мг; v — объем полученного бензинового раствора каротинов; g — навеска исследуемого продукта, г.

Пример расчета. Для анализа взято 2,69 г моркови. После элюирования получено 100 мл бензинового раствора каротинов. При колориметрировании установлено, что содержание каротинов в исследуемом растворе согласно калибровочной кривой составляет 0,00215 мг в 1 мл

$$\frac{0,00215 \cdot 100 \cdot 100}{2,69} = 8,0 \text{ мг \%}$$

Выделенные хроматографическим методом каротины можно проверить спектроскопически на содержание в них отдельных изомеров. Спектроскопический анализ — быстрый и простой способ ориентировочного выяснения природы каротинов, выделенных при экстрагировании и хроматографировании растительных пигментов.

Спектроскопический анализ основан на том, что свет, проходя через раствор пигментов, частично поглощается им и дает в спектре спектр с характерными для каждого пигмента полосами поглощения. α -, β - и γ -каротины в растворе бензина (температура кипения 70—80° С) дают максимумы поглощения света, соответствующие следующим длинам световой волны: 478,0—447,5; 483,5—452,0 и 495,0—462,0 нм.

Колориметрический метод определения витамина А. Витамин А является высоконепредельным полиеновым алкоголем и с жирными кислотами (пальмитиновой и стеариновой) образует сложные эфиры.

При определении витамина А проводят омыление исследуемого продукта, а затем в неомыляемой части определяют содержание витамина. Витамин А извлекают сухим хлороформом (последний сушат обычно безводным Na_2SO_4), проводя чаще всего реакцию с SbCl_3 (можно также использовать цветные реакции с AsCl_3 и с дихлорглицериновым альдегидом). Образовавшуюся синюю окраску сравнивают со шкалой.

Приготовление некоторых реактивов. Na_2SO_4 кристаллический прокалывают, а безводный подсушивают при 105—110° С. CO_2 или азот перед употреблением про-

пускают для очистки через поглотители с растворами пирогаллола и H_2SO_4 . Хлороформ промывают 5—6 раз дистиллированной водой (в соотношении 2 : 1), высушивают безводным Na_2SO_4 , перегоняют в склянку из темного стекла и проверяют на отсутствие фосгена. Хранят в прохладном месте. SbCl_3 промывают хлороформом, пока не будет стекать прозрачный бесцветный раствор. Промытый реактив высушивают в эксикаторе над H_2SO_4 в течение суток. Затем готовят насыщенный раствор SbCl_3 в хлороформе. На две склянки с раствором должно быть несколько кристаллов нерастворившейся соли. Этиловый эфир очищают от возможных пероксидов: 500 мл эфира смешивают с 50 мл 4%-ного раствора KMnO_4 и 5 мл 40%-ного раствора NaOH или KOH , взбалтывают и оставляют на сутки в темноте. Смесь разделяют в делительной воронке; нижний слой сливают, а оставшийся эфир промывают 5—6 раз H_2O в соотношении 2 : 1. Эфир высушивают Na_2SO_4 в течение суток, перегоняют и хранят в темноте. По качественной реакции с KI проверяют наличие в нем пероксидов.

Для колориметрирования составляют ряд калиброванных пробирок диаметром 10 мм, высотой 60 мм, с которыми сравнивают испытуемый раствор.

Таблица 7. Шкала для определения количества витамина

Номер пробирки	Объем, мл		Число синих единиц	Номер пробирки	Объем, мл		Число синих единиц
	основного раствора	воды			основного раствора	воды	
1	20	0	9,2	12	20	31,6	4,0
2	20	0,4	9,0	13	20	41,2	3,5
3	20	1,6	8,5	14	20	55,4	3,0
4	20	3,0	8,0	15	20	74,2	2,5
5	20	4,5	7,5	16	20	104,2	2,0
6	20	6,3	7,0	17	20	131,0	1,75
7	20	8,7	6,5	18	20	175,0	1,5
8	20	11,6	6,0	19	20	190,0	1,25
9	20	14,6	5,5	20	20	240	1,0
10	20	19,0	5,0	21	20	330	0,75
11	20	24,4	4,5	22	Дистиллированная вода		—

В пробирки наливают по 4 мл соответственно разбавленного стандартного раствора, приготовленного следующим образом: взвешивают 75 г CuSO_4 и 3,5 г $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, насыпают их в мерную колбу на 500 мл, доводят дистиллированной водой до метки и взбалтывают до полного растворения. Из приготовленного основного раствора готовят эталоны, разбавляя водой (табл. 7).

Развивающуюся синюю окраску витамина А с SbCl_3 сравнивают с эталонами и выражают в «синих единицах». Часто содержание витамина А выражают в интернациональных единицах¹. Одна интернациональная единица соответствует 0,3 мкг витамина А.

Синие единицы пересчитывают на миллиграмм-проценты, умножая их на эмпирический коэффициент ($1/4$), а затем переводят в интернациональные единицы.

Методика опыта. Отвешивают 10—20 г растительного масла (в зависимости от содержания в нем витамина А) в колбу Эрленмейера

¹ ИЕ — интернациональная единица: ИЕ витамина D равна 0,025 μ , а ИЕ витамина А — 0,3 μ . Одна гамма равняется 0,001 мг. Содержание других витаминов выражают в мг на 100 г сухого вещества.

емкостью 200—250 мл, приливают 20—40 мл 20%-ного спиртового раствора КОН. Колбу соединяют с обратным холодильником, а масло омыляют в течение 1—2 ч на водяной бане при 85—90° С.

Омыленный раствор разбавляют 20 мл H₂O и трижды экстрагируют в делительной воронке серным эфиром (первый раз 50 мл эфира, второй и третий — по 25 мл). Во избежание образования стойкой эмульсии экстракцию производят в охлажденном растворе при осторожном перемешивании смеси. Эфирные экстракты соединяют и промывают 3—4 раза дистиллированной водой (по 20 мл) до нейтральной реакции промывных вод на лакмус. В промытую эфирную вытяжку добавляют 6—8 г Na₂SO₄ и высушивают в течение 30 мин, периодически взбалтывая. Затем фильтруют и отгоняют эфир в потоке инертного газа.

Неомыляемый остаток количественно, смывая хлороформом, переносят в мерную колбу емкостью 10 или 25 мл (в зависимости от содержания витамина в жире), доводят хлороформом до метки и тщательно перемешивают.

Несколько отличается методика определения витамина А в продуктах кондитерского и хлебопекарного производств.

20—50 г витаминизированных кондитерских изделий (конфет, пряников) экстрагируют эфиром (20—50 мл) методом настаивания. Эфирные вытяжки фильтруют, а эфир отгоняют в потоке инертного газа. Остаток после отгонки эфира омыляют 10 мл 0,5 н. спиртового раствора КОН в течение 0,5—1 ч на водяной бане при 85—90° С.

Навеску молока 100—200 г смешивают с $\frac{1}{10}$ объема 60%-ного водного раствора КОН и 20—40 мл этилового спирта и ставят на 48 ч в теплое место при температуре 20—25° С. Содержимое колбы периодически взбалтывают, неомыляемую часть экстрагируют эфиром.

Взвешивают 20 г желтка яйца, добавляют 6 мл 60%-ного водного раствора КОН, 10—20 мл этилового спирта и омыляют с обратным холодильником на водяной бане при 85—90° С не менее 2 ч.

Если в продуктах содержится кроме витамина А каротин (молоко, сливочное масло, яйца и др.), то неомыляемые вещества делят на две части и в одной из них определяют витамин А, в другой — каротин.

Сливочное, топленое масло и маргарин исследуют тем же методом, что и растительные масла.

В сухую пробирку такого же размера, как и эталонные пробирки, отмеривают 0,2 мл хлороформенного раствора неомыляемой фракции, добавляют туда же 1—3 капли уксусного ангидрида, 2 мл хлороформенного раствора SbCl₃, быстро перемешивают содержимое пробирки стеклянной палочкой и через 5—10 с сравнивают синюю окраску с эталонами. Окраска достигает максимума через 10—30 с. Определение считают законченным, когда окраска в испытуемой пробирке будет одинаковой с окраской в одной из пробирок-эталонов.

Содержание витамина А в исследуемом растворе выражают числом синих единиц, обозначенных на пробирке-эталоне, которая совпала по окраске. Если окраска испытуемого раствора находится посередине между двумя эталонами, то берут среднюю величину.

Содержание витамина А в продукте рассчитывают по формуле

$$x = \frac{cv}{g \cdot 4},$$

где x — количество витаминов в исследуемом веществе, мг %; c — число синих единиц, найденное при колориметрировании; v — объем

хлороформенного раствора, мл; g — взятая навеска, г; 4 — эмпирический коэффициент пересчета, мг %.

Пример расчета. Навеска жира 0,5672 г; объем v мерной колбы, в которой была растворена неомыляемая фракция жира, 25 мл. В опыте было найдено 7,5 синих единиц. Подставив полученные величины в формулу, получаем

$$\frac{7,5 \cdot 25}{0,5672 \cdot 4} = 82,6 \text{ мг \%}.$$

Эту величину выражают в интернациональных единицах (ИЕ), учитывая, что 1 ИЕ соответствует 0,3 мкг витамина А:

$$\frac{82,6 \cdot 1000}{100 \cdot 0,3} = 2753$$

в 1 г жира.

В настоящее время известно много различных приемов и методов анализа продуктов на содержание витамина А. Колориметрирование производят не только по шкале, но и в электрофотоколориметре, при этом обеспечивается измерение (отсчет) за 5—10 с.

Спектрофотометрический метод определения витамина А. Витамин А определяют также физическим методом, основанным на свойстве витамина А поглощать лучи света в области спектра 328 нм. Определение в этом случае производят спектрофотометром. Для определения пользуются тщательно очищенными реактивами и свежеприготовленными препаратами.

Методика опыта. Навеску концентрата витамина А от 0,1 до 1,0 г взвешивают на аналитических весах, количественно переносят с хлороформом в мерную колбу емкостью 50 или 100 мл, объем доводят хлороформом до метки. При необходимости раствор повторно разбавляют с таким расчетом, чтобы концентрация витамина А была от 4 до 8 ИЕ в 1 мл. Эта концентрация соответствует оптической плотности 0,3—0,6 по спектрофотометру Бекмана. (А с а т а н и В. С. Биохимическая фотометрия. М., Медгиз, 1957, с. 97).

В одну кювету спектрофотометра вносят приготовленный раствор, в другую — такое же количество чистого растворителя. Пропускание света раствором измеряют при длине волны от 300 до 350 нм. Адсорбционный максимум должен лежать на длине волны 328 нм.

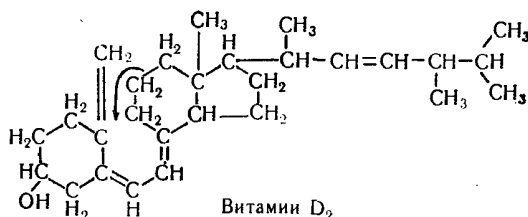
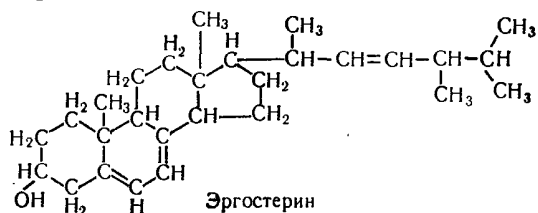
Содержание витамина А в продукте вычисляют по формуле

$$x = \frac{\varepsilon v \cdot 20}{g},$$

где x — количество ИЕ витамина А в 1 г концентрата; ε — найденная оптическая плотность раствора; v — общий объем раствора с учетом всех разбавлений, мл; 20 — постоянный коэффициент; g — навеска, г.

Кроме того, известен флуорометрический метод определения витамина А, основанный на титровании его малеиновой кислотой в бензольном растворе. Разработаны флуорометрические методы определения эфиров витамина А, а также хроматографические методы, описанные в литературе.

В эту группу входят витамины, при отсутствии или недостатке которых возникает заболевание, называемое рахитом. Нарушается процесс костеобразования вследствие уменьшения содержания в костях солей кальция и фосфора. В настоящее время известны витамины D₁, D₂, D₃, D₄, которые близки по своей биологической активности и отличаются по химической структуре и происхождению. Синтезируются они только в животном организме, в растениях содержатся их провитамины, которые носят название стеролов. Одним из наиболее важных представителей стеролов является эргостерол (или эргостерин), содержащийся в большом количестве в дрожжах. Его используют в промышленности для получения витамина D₂. Эргостерол облучают ультрафиолетовыми лучами и таким образом превращают в витамин. Превращение эргостерола в витамин D₂ при облучении происходит путем разрыва одного из ароматических колец, содержащихся в его молекуле, что хорошо видно из структурной формулы эргостерина и витамина D₂:



В животных тканях широко распространен другой стерин — 7-дегидрохолестерин, который является провитамином D₃. Витамин D₃ из 7-дегидрохолестерина образуется в животном организме при облучении поверхности тела (кожи) солнечным светом или ультрафиолетовыми лучами кварцевой лампы. 7-дегидрохолестерин близок по своему химическому составу к эргостерину. Образование витамина D₃ идет также путем разрыва одного из ароматических колец.

Эргостерин, кроме дрожжей, содержится в значительном количестве в мицелии *penicillium* и в других растительных продуктах. Дрожжи используют в качестве сырья в производстве витаминов, поэтому количественное определение эргостерина в них имеет большое практическое значение.

Колориметрическое определение эргостерина в дрожжах. В основу этого метода положена цветная реакция эргостерина с уксусным ангидридом в присутствии концентрированной H₂SO₄.

Приготовление некоторых реактивов. Стандартный раствор эргостерина — эргостерин высушивают в вакууме при 45° С до постоянной массы, а затем в запаянном капилляре определяют его температуру плавления. Навеску эргостерина 0,1000 г взвешивают на аналитических или торзионных весах, растворяют в мерной колбе емкостью 500 мл в сухом бензоле, тщательно перемешивают и доводят объем до метки бензолом. Этот раствор хранят в склянке с притертой пробкой от 2 недель до 1 месяца в зависимости от температуры. Лучше хранить на холоду.

Методика опыта. В коническую колбу емкостью 150 мл помещают 4 г прессованных дрожжей и приливают 40—50 мл 25%-ного раствора KOH. Колбу соединяют с обратным холодильником и ставят в кипящую водяную баню на 1 ч. После омыления охлажденный раствор переносят в делительную воронку и экстрагируют неомыляемую часть эфиром 5 раз по 75 мл. Вытяжки промывают в большой делительной воронке дистиллированной водой, подкисленной HCl (1—2 капли концентрированной HCl на 1 л воды) до исчезновения щелочной реакции по лакмусу.

Эфирный раствор сушат, добавляя к нему безводный Na₂SO₄. Раствор оставляют на ночь. На второй день прозрачный раствор фильтруют, Na₂SO₄ промывают эфиром. Эфир отгоняют на водяной бане досуха. Сухую неомыляемую часть растворяют в бензоле в мерной колбе емкостью 50 мл и доводят бензолом до метки.

Из полученного раствора пипеткой Мора отбирают 5 мл (при температуре 18° С) в стакан и туда же добавляют 2 мл уксусного ангидрида, 6 капель концентрированной H₂SO₄ (d = 1,84), перемешивают и стакан помещают в воду при 18° С на 2 мин. Одновременно отбирают 5 мл стандартного раствора эргостерина и с ним выполняют все те операции, что и с испытуемым раствором, а также помещают в воду при 18° С на 2 мин. Через 2 мин стандартный и опытный растворы колориметрируют.

Содержание эргостерола определяют в фотоэлектроколориметре и вычисляют по формуле

$$x = \frac{cv \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1000}{gb}$$

где x — содержание эргостерола в дрожжах, мг%; c — содержание эргостерола, установленное согласно калибровочному графику, построенному по стандартному раствору эргостерола, г/мл; g — навеска, г; v — объем бензольного раствора неомыляемой фракции, мл; b — содержание сухих веществ в продуктах, %.

Пример расчета. Была взята навеска дрожжей 2,52 г. Определено 25,3% сухих веществ в дрожжах. Получено 50 мл бензольного раствора неомыляемой фракции. В растворе по графику содержится 0,0001 г/мл. Отсюда

$$x = \frac{0,0001 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1000 \cdot 50}{2,52 \cdot 25,3} = 15,7 \text{ мг \%}$$

Весовой метод определения эргостерина.

Приготовление раствора дигитонина: 1 г дигитонина растворяют при нагревании на водяной бане при 60—70° С в 80 мл 96%-ного раствора C₂H₅OH в мерной колбе емкостью 100 мл. После полного растворения дигитонина колбу охлаждают до 20° С и доводят спиртом до метки. Дигитонин (сапонин) получают из наперстянки (см. «Получение дигитонина по В. Н. Букину и И. Н. Горкиной»).

Методика опыта. На аналитических весах взвешивают 0,10 г исследуемого образца и растворяют его в мерной колбе емкостью 200 мл в 96%-ном растворе C_2H_5OH . Из полученного раствора отбирают 20 мл в стакан емкостью 100 мл. В другой стакан наливают 5 мл раствора дигитонина. Содержимое обоих стаканов доводят до кипения. Горячий раствор дигитонина приливают к горячему испытуемому раствору. Смесь кипятят 3 мин. Затем стакан накрывают часовым стеклом, охлаждают в холодной воде и оставляют на 24 ч в темном месте. Выпавший осадок количественно переносят на высушенный и взвешенный бумажный фильтр. Можно пользоваться высушенными стеклянными фильтрами № 3 и 4. Осадок на фильтре промывают вначале 50 мл 96%-ного раствора C_2H_5OH , затем 25 мл серного эфира. Фильтр с осадком высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при 90—95° С. Содержание эргостерина вычисляют по формуле

$$x = \frac{A \cdot 100}{g \cdot 4,034},$$

где x — содержание эргостерина, %; A — масса осадка после высушивания; g ; g — навеска вещества, г; 4,034 — коэффициент пересчета выпавшего осадка в эргостерин.

Качественная реакция на витамин D с анилином. 1 мл витаминизированного рыбьего жира смешивают в пробирке с 5 мл концентрированной HCl и нагревают на горелке до кипения в течение 0,5 мин. Эмульсия окрашивается в красный цвет.

Колориметрическое определение витамина D. Метод основан на цветной реакции витамина D с раствором $SbCl_3$, который с витамином D дает оранжевое окрашивание.

Приготовление некоторых реактивов. Серный эфир и насыщенный раствор $SbCl_3$ (см. стр. 119). Хлороформ промывают и сушат, как при определении витамина А, и дополнительно испытывают на содержание в нем хлора, спирта, воды и органических примесей. 10 мл хлороформа смешивают с 40 мл воды, причем водный слой не должен окрашиваться в синий цвет в присутствии KI и крахмала (реакция на содержание хлора). Хлороформ не должен восстанавливать перманганат в течение 15 мин (реакция на содержание спирта). При охлаждении его до 3—4° С не должно образовываться мути (реакция на содержание воды). С концентрированной H_2SO_4 в течение 1 ч при 15° С не должно появляться окрашивание (реакция на содержание органических примесей).

Ацетилхлорид, температура кипения 51° С (свежеперегнанный). При стоянии желтеет. Сохраняют в склянке или капельнице из темного стекла с притертой пробкой.

Методика опыта. Навеску исследуемого концентрата (0,1—1 г в зависимости от содержания витамина D), взвешенную на аналитических весах, омыляют 10 мл 0,5 н. спиртового раствора КОН в колбе с обратным холодильником в течение 30 мин. Неомыляемую часть извлекают так же, как и при определении витамина А.

Неомыляемый остаток растворяют в чистом сухом хлороформе в мерной колбе с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось не менее 100 и не более 2000 ИЕ витамина D. Отмеряют 1 мл этого раствора в кювету фотоэлектроколориметра, добавляют 3 капли свежеперегнанного ацетилхлорида, 6 мл раствора $SbCl_3$ в хлороформе и точно через 4 мин после добавления последнего реактива колориметрируют в фотоэлектроколориметре. Предварительно ставят контрольный опыт на

чистоту реактивов, сохраняя те же условия опыта, только вместо 1 мл раствора витамина D в хлороформе отмеряют 1 мл чистого хлороформа. Величину экстинкции контрольного опыта вычитают из величины экстинкции раствора рабочего опыта. На основании полученной разности вычисляют по калибровочной кривой содержание витамина D в 1 мл раствора, которое выражают в интернациональных единицах. Прибор устанавливают на нуль по чистому хлороформу.

Калибровочную кривую составляют по масляному стандартному раствору чистого витамина D с содержанием 10 000 ИЕ в 1 мл.

Масляный раствор обрабатывают по изложенной методике определения витамина D. В этом случае прибор приводят к нулю по раствору $SbCl_3$ в хлороформе. Для получения точек калибровочной кривой берут 0,75; 0,5 и 0,25 мл стандартного раствора витамина D. В остальном определение ведут по методике, описанной выше. Величины экстинкции откладывают на оси ординат, а соответствующие концентрации витаминов — на оси абсцисс. В пределах содержания витамина D от 200 до 2000 ИЕ в 1 мл изменение интенсивности окраски подчиняется закону Ламберта — Бера (на графике получается прямая линия).

Вместо масляного раствора витамина D для построения калибровочной кривой можно применять чистый кристаллический кальцийферол. Масляный раствор можно не омылять, но в этом случае необходимо ввести поправку на экстинкцию масла.

Содержание витамина D рассчитывают по формуле

$$x = \frac{cv_1d}{g},$$

где x — концентрация витамина D, ИЕ в 1 мл; c — количество витамина D в 1 мл раствора, найденное по калибровочной кривой, ИЕ; v_1 — общий объем раствора с учетом всех разбавлений; d — относительная плотность концентрата; g — навеска концентрата, г.

Ориентировочно витамин D можно определять без омыления. Навеску 0,1—1 г в зависимости от содержания витамина D взвешивают на аналитических весах, растворяют в чистом сухом хлороформе в мерной колбе с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось не менее 100 и не более 2000 ИЕ витамина D. Определение ведут по описанной методике.

При определении витамина D в природном материале хроматографически отделяют витамин А, осаждают стерныны 1%-ным раствором дигитонина в 96%-ном растворе этилового спирта. В этом случае берут навеску жира 5—10 г и растворяют неомыляемую часть хлороформом в мерной колбе емкостью 50 мл. Отбирают определенный объем этого раствора и определяют содержание витамина А.

Другую (точно измеренную) часть раствора хроматографируют на бентонитовой колонке¹ высотой 20—25 см и диаметром 1,5 см. Высота

¹ **Приготовление адсорбента** — бентонит заливают 2 н. раствором HCl (1 л 2 н. раствора HCl на 40 г бентонита), доводят до кипения, охлаждают, фильтруют и промывают дистиллированной водой до полного удаления иона хлора. Промытый бентонит высушивают при 120—130° С, растирают в ступке и хранят в склянке с притертой пробкой.

столба адсорбента зависит от содержания витамина А: на 1 г жира высота слоя должна равняться 5—6 см, при большей навеске — 10 см. Поверх адсорбента помещают свежепрокаленный Na_2SO_4 слоем 10 мм. Перед пропусканием исследуемого раствора через колонку адсорбент смачивают хлороформом, оставляя над ним слой хлороформа около 0,5 см. Скорость прохождения исследуемого раствора через адсорбент (40—50 капель в минуту) регулируют насосом, откачивающим воздух из колбы Бунзена. После прохождения исследуемого раствора через колонку адсорбент промывают хлороформом (три порции по 15 мл), не смывая при этом в приемник синего кольца витамина А. Элюат, лишенный витамина А, выпаривают на водяной бане в струе CO_2 досуха. Остаток растворяют в минимальном количестве подсушенного этилового спирта (спирт предварительно в течение суток обрабатывают безводным CuSO_4 и перегоняют с безводным NaOH).

Спиртовой раствор нагревают почти до кипения, добавляя к нему по каплям раствор дигитонина. Для полного осаждения стеринов добавляют в 6—8 раз больше дигитонина, чем требуется по уравнению реакции. Стерины отфильтровывают, а фильтрат разбавляют вдвое водой и экстрагируют в делительной воронке тремя порциями по 25 мл эфира. Затем выделяют неомыляемую часть и определяют описанным ранее способом витамин D.

Спиртовой раствор стеринов рекомендуют фильтровать через сухой взвешенный фильтр, чтобы попутно с определением витаминов А и D определить количество их в исследуемой пробе растительного продукта. Осадок стеринов промывают (как описано выше), сушат до постоянной массы и взвешивают.

Кроме того, для определения витамина D применяют биологический метод.

Получение дигитонина (по В. Н. Букину и И. Н. Горкиной). Дигитонин (сапонин наперстянки) имеет большое значение для анализа и исследования стеринов.

Методика опыта. В колбу емкостью 5 л (или эмалированную кастрюлю) помещают 300 г сухих листьев наперстянки (*Digitalis purpurea*), заливают 2,5 л воды, нагретой до 80°C . Выдерживают при 80°C 2—3 ч при помешивании. Затем листья отжимают, промывают водой, еще раз плотно отжимают, раскладывают тонким слоем и высушивают при комнатной температуре или при 30 — 40°C . Сухую массу измельчают, помещают в колбу и заливают 5—6 объемами этилового спирта. Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают 2 ч на водяной бане. Спиртовой экстракт фильтруют, к фильтрату добавляют 20% (по объему) хлороформа. Раствор осветляют углем (4% объема пропускаемой жидкости). Уголь помещают на фильтр и через него фильтруют раствор. Соломенно-желтый фильтрат выпаривают в вакууме до 1/9 объема и ставят в холодильник на кристаллизацию. Осадок дигитонина отфильтровывают, растворяют в небольшом количестве 85%-ного этилового спирта и вновь кристаллизуют на холоду. Выпавшие кристаллы дигитонина отфильтровывают и высушивают в вакуум-эксикаторе. Выход сырого дигитонина составляет 900 мг, перекри-

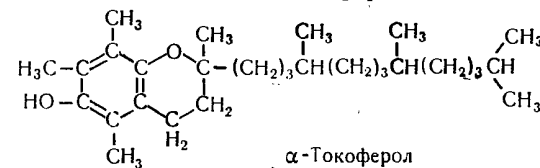
сталлизованного из спирта — 400 мг. Температура плавления дигитонина 235°C (с разложением); при 225°C он размягчается.

Материалом для извлечения дигитонина могут служить отходы наперстянки с химико-фармацевтических заводов.

ВИТАМИН Е (ТОКОФЕРОЛ, ВИТАМИН РАЗМНОЖЕНИЯ)

Витамин Е (греч. tokos — потомство, rhero — несу) широко распространен в природе. Особенно богаты витамином Е зародыши злаков и зеленые листья растений. Содержится в хлебе из муки грубого помола, в фасоли, горохе, в зеленых овощах, в льняном и хлопковом маслах, а также в мясе, печени и т. д. Играет большую роль в животноводстве. Недостаток витамина Е ведет к нарушению половой функции, бесплодию, поражению нервной и мышечной систем, а также других органов и тканей. Прибавление этого витамина к корму животных снижает эпидемический аборт у коров, устраняет заболевание молодых птиц энцефаломиоцитом.

Физиологически наиболее активной формой является α -токоферол:



Физиологическим действием витамина Е обладают несколько природных соединений: α -, β - и γ -токоферолы.

Определение витамина Е (по Б. Г. Савинову и Г. М. Луцевской). Метод основан на определении интенсивности красной окраски, возникающей при окислении α -токоферола азотной кислотой.

Приготовление стандарта для витамина Е — 20 мг бромтимолсинего растворяют в 50 мл 95—96%-ного раствора этилового спирта и 10 мг основного фуксина растворяют в 50 мл 95—96%-ного раствора этилового спирта. 50 мл первого раствора смешивают с 2 мл второго раствора.

Методика опыта. В фарфоровой ступке растирают 2—3 г свежего растительного материала с 1—2 г кварцевого песка до однородной массы.

Полученную массу небольшими порциями в 2—3 приема количественно переносят с 15—25 мл 96%-ного этилового спирта на стеклянный фильтр № 3 и отсасывают в колбу Бунзена. Ступку и пестик ополаскивают небольшим количеством бензола, которым экстрагируют материал на фильтре. Получают 15—25 мл экстракта (в 3—4 приема). Растворитель (бензол) добавляют после выключения вакуум-насоса. Массу на фильтре размешивают стеклянной палочкой, а экстракт отсасывают. Экстрагирование ведут до появления бесцветных капель фильтрата.

К полученному экстракту добавляют 1,5—2,5 мл 50%-ного раствора КОН. При этом имеющийся в фильтрате спирт образует 5%-ный раствор щелочи. Далее смесь омыляют, добавив к ней 12—20 мл дистиллированной воды, что обеспечивает расслаивание жидкости на 2 слоя:

нижний — спиртово-водный, верхний — бензольный, окрашенный каротиноидами в желто-оранжевый цвет. Нижний слой удаляют, а верхний отмывают водой от следов щелочи и обезвоживают фильтрованием через слой безводного Na_2SO_4 на стеклянном фильтре, присоединенном к мерному цилиндру на 50 мл. Фильтр промывают бензолом. Затем определяют каротиноиды во взятой навеске. Измеряют объем полученного фильтрата. Пробу колориметрируют в фотоэлектроколориметре при сравнении со стандартным раствором $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0,036%-ный водный раствор), который по окраске отвечает 2,08 мкг каротиноидов в 1 мл. Количество каротиноидов вычисляют по формуле

$$k = \frac{0,00208v l_1}{l}$$

где k — содержание каротиноидов в навеске исследуемого материала, мг; v — объем фильтрата, мл; l_1 — оптическая плотность исследуемого раствора; l — оптическая плотность стандарта.

Окисление витамина Е. Отбирают пробу бензольного экстракта в колбу Эрленмейера емкостью 50 мл и упаривают до 1 мл на песчаной бане, покрытой листом асбеста, остаток бензола удаляют продуванием воздухом.

Неомыляемую часть экстракта после удаления бензола растворяют в 5 мл абсолютного этилового спирта. Растворение ведут при нагревании с обратным холодильником до полного растворения маслянистой массы. Затем из бюретки добавляют 1 мл HNO_3 ($d = 1,4 \text{ г/см}^3$), тщательно взбалтывают, нагревают с обратным холодильником и кипятят в течение 3 мин. При охлаждении окрашенный раствор мутнеет. Выпавший осадок отфильтровывают через стеклянный фильтр № 3 или 4, присоединив его к мерному цилиндру на 10 мл. Фильтруют с отсасыванием. Фильтрат промывают смесью спирта с HNO_3 (5 : 1). Измеряют объем полученного фильтрата.

Колориметрируют в фотоэлектроколориметре. Результат вычисляют по формуле

$$x = \frac{100mv \cdot 139k}{g}$$

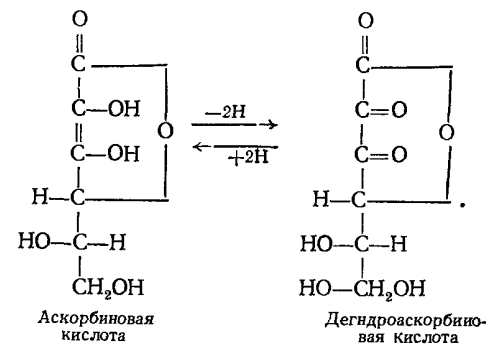
где x — содержание витамина Е в исследуемом материале, мг%; m — количество токоферола в исследуемом растворе, найденное по калибровочному графику; v — объем исследуемого раствора, соответствующий навеске исследуемого материала, мл; k — количество каротиноидов в навеске исследуемого материала (определено по приведенной выше формуле), мл; 139 — эмпирически найденная постоянная поправка на каротиноиды (наличие в 1 г материала 1 мг каротиноидов дает ошибку в сторону увеличения витамина Е на 139 мг%); g — навеска исследуемого материала, г.

Водорастворимые витамины

ВИТАМИН С (АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА)

Аскорбиновая кислота широко распространена в растительных и животных организмах. Она принимает участие в окислительно-восстановительных процессах, происходящих в живой клетке, и существует в двух формах: в виде аскорбиновой и окисленной (дегидроаскор-

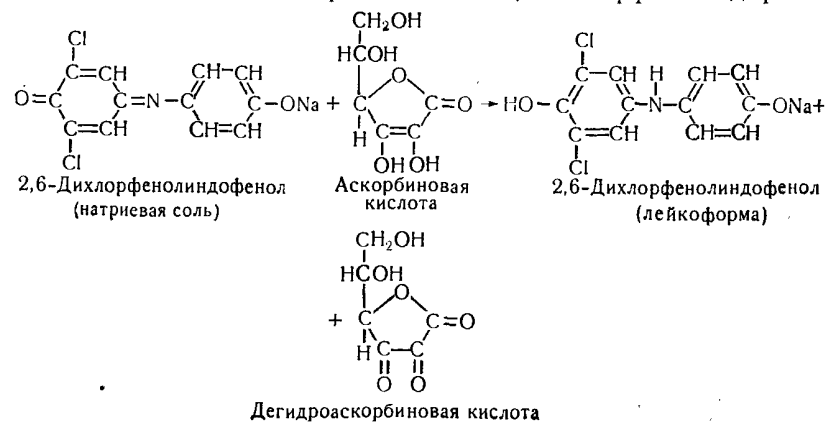
биновой) кислот. Аскорбиновая кислота благодаря диэнольной группировке ($-\text{COH}=\text{COH}-$) обладает сильно выраженными восстановительными свойствами, легко окисляется и превращается в дегидроаскорбиновую кислоту:



Дегидроаскорбиновая кислота, как и аскорбиновая, является биологически активной и предохраняет от заболевания цингой, т. е. эти две формы являются антицинговыми факторами. Дегидроаскорбиновая кислота может быть восстановлена до аскорбиновой кислоты H_2S или другими восстановителями. Окислительно-восстановительные реакции аскорбиновой кислоты положены в основу методов ее количественного определения.

Количественное определение витамина С. На основе редуцирующих свойств аскорбиновой кислоты разработан ряд химических методов ее количественного определения. Методы, построенные на принципе восстановления реактива Фелинга, аммиачного раствора нитрата серебра, раствора KMnO_4 и других окислителей, оказались недостаточно точными, так как при этом кроме аскорбиновой кислоты реагируют и другие редуцирующие вещества, содержащиеся в растительных организмах.

Поэтому для определения аскорбиновой кислоты используют реакцию восстановления натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола.



Темно-синяя окраска данной соли (окисленная форма) при добавлении аскорбиновой кислоты переходит в бесцветную (восстановленная форма).

При определении аскорбиновой кислоты для каждого анализа необходимо проводить не менее двух параллельных определений и не менее чем с двумя различными навесками. Для титрования необходимо пользоваться микробюреткой. Повторные титрационные числа не должны расходиться между собой более чем на 0,03 мл. Условия анализа подбирают так, чтобы количество пошедшей на титрование натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола находилось в пределах 1—2 мл. Титрование ведут не более 2 мин. При небольшом содержании витамина С в исследуемой пробе титровать нужно по каплям, при большом содержании витамина С можно вначале прибавлять сразу по несколько капель раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола. Результаты параллельных определений не должны расходиться между собой более чем на 5%.

Приготовление реактивов. 0,01 н. раствор соли Мора¹ — 3,92 г соли Мора растворяют в 1 л 0,02 н. раствора H₂SO₄. Титр полученного раствора соли Мора проверяют по 0,01 н. раствору KMnO₄ (0,316 г в 1 л воды), причем на 10 мл раствора соли Мора приливают 1,5 мл H₂SO₄, разбавленной в отношении 1 : 2. Титруют до слабо-розового окрашивания. Титр же раствора KMnO₄ устанавливают по химически чистому оксалату натрия (аммония) не менее чем на двух навесках.

При использовании точного 0,01 н. раствора оксалата натрия (аммония) берут соответственно навеску 0,067 или 0,62 г на 100 мл дважды перегнанной дистиллированной воды. Эти растворы должны быть всегда свежими. Перед взятием навесок нужное количество этих солей необходимо оставить на несколько часов в открытом бюксе над H₂SO₄ в эксикаторе, так как они гигроскопичны.

К 10 мл раствора оксалата натрия (аммония) прибавляют 2,5 мл H₂SO₄, разбавленной 1 : 2. Титруют раствором KMnO₄, нагревая на водяной бане до температуры, близкой к кипению (не допускать до кипения!). Конец реакции определяется по слабо-розовой окраске.

0,001 н. раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола готовят с фосфатным буфером pH = 6,9 ÷ 7,0, так как индикатор в водном растворе быстро разрушается. Для буфера готовят исходные растворы: KN₂PO₄ — 9,078 г в 1 л и Na₂HPO₄ · 2H₂O — 11,867 г в 1 л. Каждый фосфатный раствор хранят отдельно. Перед употреблением растворы смешивают, беря два объема раствора KN₂PO₄ и три объема раствора Na₂HPO₄.

0,25 г натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола переносят в мерную колбу емкостью 1 л, прибавляют 700 мл дистиллированной воды и доводят буферной смесью до 1 л. Хранят в темном месте не более 7 дней. Титр раствора проверяют ежедневно по 0,01 н. раствору соли Мора следующим образом. В колбу Эрленмейера наливают 10 мл раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола и 5 мл насыщенного раствора оксалата натрия (аммония) и титруют из микробюретки раствором соли Мора до тех пор, пока синий цвет не изменится сначала на зеленоватый, а затем на соломенно-желтый (нерезкая перемена окраски, возникновение оттенка бурого цвета указывает на то, что реактив испорчен).

Поправку *k* на титр 2,6-дихлорфенолиндофенола определяют по формуле

$$k = \frac{v_1 v_2}{v_3}$$

где *v*₁ — объем раствора соли Мора, затраченный на титрование 10 мл раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, мл; *v*₂ — объем раствора KMnO₄, затраченный на титрование 10 мл раствора соли Мора, мл; *v*₃ — объем раствора KMnO₄, пошедший на титрование 10 мл точно 0,01 н. раствора оксалата натрия (аммония), мл.

¹ О приготовлении соли Мора см.: Корякин Ю. В. Чистые химические реактивы. Л., ОНТИ, 1936, с. 449.

Кроме того, титр раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола можно установить следующими способами:

1) По Na₂S₂O₃. При этом используют способность соли 2,6-дихлорфенолиндофенола количественно окислить иодиды в иод.

В коническую колбу на 50 мл вносят 10 мл титрованного раствора индикатора и туда же прибавляют 0,5—1 мл H₂SO₄, разбавленной в отношении 1 : 4. Жидкость, налитую в колбу, слегка взбалтывают, а иод, освободившийся при окислении KI, титруют из микробюретки 0,01 н. раствором Na₂S₂O₃ с добавлением нескольких капель раствора крахмала. Количество аскорбиновой кислоты, соответствующее объему раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, определяют умножив объем пошедшего на титрование 0,01 н. раствора Na₂S₂O₃ на 0,88. Параллельно ставят контрольный опыт, в котором вместо испытуемого индикатора берут 10 мл дистиллированной воды и выполняют все то же, что и в рабочем опыте.

2) По аскорбиновой кислоте. В микробюретку на 2 мл наливают испытуемый раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола.

В 2—3 колбы Эрленмейера емкостью по 50 мл каждая отмеряют пипеткой по 1 мл 10%-ного раствора аскорбиновой кислоты, по 1 мл 2%-ного раствора HCl и 3 мл дистиллированной воды. Смесь титруют раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола при постоянном легком взбалтывании до получения стойкого окрашивания, которое удерживается в течение 0,5—1 мин.

По окончании титрования записывают объем раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедший на титрование 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, и прибавляют для контроля последовательно еще 2 капли раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола. Если окончание титрования было установлено правильно, то две контрольные капли дадут интенсивное розовое окрашивание. После этого вычисляют, какому количеству аскорбиновой кислоты соответствует 1 мл индикатора.

К концу титрования жидкость может приобрести желтый оттенок.

Материал для анализа и его подготовка. Все жидкие продукты, а также продукты, имеющие консистенцию паст и пюре, тщательно и осторожно перемешивают, переворачивая тару (но не взбалтывая) во избежание аэрации. В сиропообразных и жидких образцах определяют относительную плотность принятыми способами для пересчета объема в весовые количества. Сухие вещества тщательно перетирают или измельчают в мельнице или в ступке; в этом случае проба должна быть не менее 50 г.

При анализе плодов и овощей отбирают пробу не менее 200 г. Если плоды крупные, то из них вырезают сегменты, которые немедленно анализируют. Ягоды и мелкие сочные плоды берут для анализа целыми. Проба зелени должна быть не менее 100 г. При анализе консервов все содержимое банки полностью переносят в ступку, измельчают и перемешивают. Если состав консервов неоднородный, то их измельчают в мясорубке.

Из измельченного и перемешанного материала берут две-три навески, взвешивая их на теххимических весах с точностью до 0,01 г.

Жидкие продукты (соли, настои и т. п.) берут для анализа пипеткой; жидкости густой консистенции (густые сиропы, концентраты и пр.), плохо стекающие с пипеток, взвешивают в титрованной посуде на теххимических весах.

Навески для различных продуктов берут в зависимости от содержания в них витамина С. При небольшом содержании его в продукте навеску увеличивают, и наоборот.

Продукт	Величина навески, г
Свежие растительные продукты (фрукты, плоды, ягоды, клубни и зелень)	10—50
Соки и экстракты	1—50
Консервы	5—10
Сушеный картофель, плоды шиповника цельные	10
Витаминизированный хлеб	60

Принцип метода. Витамин С экстрагируют из исследуемого растительного материала CH₃COOH. Полученный экстракт освобождают от редуцирующих веществ и пигментов, осаждая их (CH₃COO)₂Pb. Затем экстракт титруют (при pH = 3 ÷ 4) раствором натриевой соли

2,6-дихлорфенолиндофенола и определяют эквивалентное количество витамина С по приведенной выше реакции.

Методика опыта. 1. Анализ жидких продуктов. Взятые для анализа (по объему или массе) навески разбавляют раствором 5%-ной CH_3COOH в мерной колбе емкостью 50 или 100 мл. Из мерной колбы отбирают пипеткой 10 мл раствора в центрифужный стакан емкостью 60—80 мл, прибавляют в него 0,4 г химически чистого CaCO_3 , слегка встряхивая ввиду возможного образования пены (рН при этом достигает 5). Затем добавляют 5 мл 5%-ного раствора $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, взбалтывают и тотчас же центрифугируют в течение 1—2 мин. Эту реакцию можно проводить и в обыкновенных химических стаканах. Осадок отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр. Фильтровать следует как можно быстрее, поскольку витамин С в условиях этой реакции не устойчив. Если витамина С мало, то следует пользоваться беззольными фильтрами или фильтрами, промытыми 2%-ным раствором HCl и затем высушенными.

Отбирают 1—10 мл полученного центрифугата или фильтрата в зависимости от количества витамина С и вносят тотчас же в коническую колбу, куда заранее наливают по 1 мл 2%-ного раствора HCl . Затем прибавляют столько дистиллированной воды, чтобы общий объем жидкости при титровании был равен 15 мл (рН $\approx 3 \div 4$); слегка взбалтывая содержимое колбы, титруют из микробюретки 0,01 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, которое удерживается в течение 0,5—1 мин.

По окончании титрования отмечают показания на бюретке и прибавляют еще две контрольные капли раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола. Если они дадут интенсивное розовое окрашивание, можно считать, что конец титрования определен правильно. Если титрационные числа при проведении двух параллельных определений лежат в пределе 0,03—0,04 мл, вычисляют среднее. Параллельно ставят контрольный опыт, в котором вместо центрифугата или фильтрата берут такой же объем дистиллированной воды; определение проводят описанным выше методом.

Как уже было указано, титрование не должно длиться более 2 мин, а количество раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, затрачиваемого на одно титрование, должно быть больше 1 и меньше 2 мл. Это требование обусловлено тем, что при количестве индикатора меньше чем 1 мл, ошибка анализа увеличивается, а при количестве больше чем 2 мл, время титрования по сравнению с установленными пределами увеличивается на 2—5 мин. Если расход раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола большой, то первоначальный раствор, из которого берут 10 мл для обработки CaCO_3 и $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, учитывая пробное титрование, соответственно надо разбавить 5%-ным раствором CH_3COOH . Это разбавление следует учитывать при конечном расчете результата анализа.

2. Анализ твердых продуктов. Навеску твердого растительного продукта растирают с битым стеклом (если это необходимо), постепенно добавляя 5%-ный раствор CH_3COOH (на 1 г навески не менее 3 мл). При использовании в ходе анализа мерной посуды стекло при растирании навески не добавляют. Необходимое количество CH_3COOH как стабилизатора витамина С отмеряют перед растиранием навески. Растертую смесь оставляют в ступке для настаивания

на 10 мин. Содержимое ступки количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл. Омывая ступку и пестик дистиллированной водой, доводят содержимое колбы до метки и взбалтывают. Смесь фильтруют через складчатый фильтр или центрифугируют. 10 мл прозрачного фильтрата или центрифугата помещают в фарфоровую чашку и титруют из микробюретки раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, сохраняющегося 0,5 мин. По окончании титрования и записи отсчета рекомендуют прибавить еще 2 капли раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола. Если при этом образуется устойчивое интенсивное розовое окрашивание, то конец титрования определен правильно. Содержание аскорбиновой кислоты в миллиграмм-процентах вычисляют по формуле исходя из того, что 0,001 н. раствора индикатора соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты.

Параллельно ставят контрольный опыт, в котором вместо навески исследуемого растительного материала берут такое же количество дистиллированной воды; определение проводят описанным выше методом. Содержание аскорбиновой кислоты (мг %) в исследуемом продукте можно определить по формуле

$$x = \frac{(a - b) k \cdot 0,088 \cdot 100}{g},$$

где $(a - b)$ — разность между объемами 0,001 н. растворов натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованными при титровании в рабочем и контрольном опытах; k — поправка на титр раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола; g — навеска исследуемого материала, находящегося в титруемой смеси, г.

Пример расчета. Была взята навеска лимона 1,1582 г. Для титрования отобрано 10 мл фильтрата из объема 100 мл, что соответствует 0,11582 г навески. На титрование рабочего опыта пошло 0,482 мл, а контрольного — 0,012 мл раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола; k — поправка на титр была равна 1,093. Чтобы определить содержание витамина С в лимоне, подставляем полученные данные в формулу

$$x = \frac{(0,482 - 0,012) 1,093 \cdot 0,088 \cdot 100}{0,11582} = 36 \text{ мг \%}.$$

Определение дегидроаскорбиновой кислоты. В исследуемом материале, кроме аскорбиновой кислоты, может присутствовать ее окисленная форма — дегидроаскорбиновая кислота. Дегидроаскорбиновую кислоту определяют, переводя ее в аскорбиновую, восстановлением H_2S . Кроме того, H_2S удаляет олово, которое попадает в анализируемый материал из консервных банок, и устраняет мутность в экстрактах при анализе хлебных продуктов.

Методика опыта. Определение до фазы титрования ведут так же, как и при определении без H_2S , а далее методика меняется. Сразу после обработки полученного экстракта CaCO_3 и $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ и центрифугирования (фильтрования) образовавшегося осадка через экстракт пропускают в течение 5 мин H_2S . Для более быстрого образования осадка PbS экстракт тотчас же после начала пропускания H_2S энергично взбалтывают. Осадок PbS отфильтровывают и через фильтр,

налитый в стаканчик или широкую пробирку с пробкой, в которую вставлены две стеклянные трубочки, согнутые под прямым углом, пропускают для удаления H_2S ток CO_2 из аппарата Киппа или баллона. Полноту удаления H_2S контролируют, сравнивая бумажку, смоченную насыщенным раствором $(CH_3COO)_2Pb$, с бумажкой, смоченной водой. После удаления H_2S анализируемую жидкость титруют 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола. Содержание дегидроаскорбиновой кислоты вычисляют по разности между содержанием аскорбиновой кислоты до и после восстановления.

Определение аскорбиновой кислоты в окрашенных вытяжках (по И. К. Мурри). Многие растительные продукты (плоды, ягоды и др.) дают интенсивно окрашенные экстракты, титровать которые раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола трудно, т. е. прямое титрование исключается. Для определения аскорбиновой кислоты в таких продуктах к вытяжке добавляют избыток индикатора, затем его экстрагируют растворителем, не смешивающимся с водой, и колориметрическим методом определяют остаток красителя.

Приготовление некоторых реактивов. Кроме тех реактивов, которые применяют для определения аскорбиновой кислоты, готовят еще смесь толуола и изобутилового спирта (1:1), которая не должна содержать пероксидов. Для очистки от пероксидов смесь взбалтывают в делительной воронке с раствором соли железа (II), которая при наличии пероксидов желтеет. Смесь толуола со спиртом можно заменить хлороформом.

Методика опыта. 10 г исследуемого продукта экстрагируют 1%-ным раствором щавелевой или 2%-ным раствором метафосфорной кислоты и доводят объем экстракта в мерной колбе до 100 мл. Экстракт фильтруют, отбирая из него пипеткой определенный объем окрашенного раствора в мерный цилиндр. Далее добавляют 2 мл 0,001 н. раствора индикатора и хорошо перемешивают. Через 2 мин приливают пипеткой 10 мл смеси толуола и изобутилового спирта. Затем цилиндр закрывают и очень осторожно взбалтывают, переворачивая 8—10 раз. Дают отстояться до полного разделения слоев. Часть окрашенного раствора отбирают и колориметрируют в фотоэлектроколориметре, сравнивая оптические плотности (или светопоглощение) с контролем. Контрольный раствор готовят так же, как и опытный, только вместо растительного экстракта берут равный объем той щавелевой или метафосфорной кислот, которая была взята для экстрагирования исследуемого материала. Количество аскорбиновой кислоты (в мг%) вычисляют по формуле

$$\frac{100 \cdot 2m \cdot 100l_2}{10v l_1}$$

где v — объем экстракта, взятого для анализа, мл; m — количество миллиграммов аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл индикатора; l_2 — оптическая плотность, или светопоглощение, испытуемого раствора; l_1 — оптическая плотность контрольного раствора.

Упрощенный метод определения витамина С. Витамин экстрагируют из исследуемого продукта 2%-ным раствором HCl и титруют непосредственно 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолин-

дофенола в кислой среде без предварительной обработки $CaCO_3$ и $(CH_3COO)_2Pb$.

Этим методом можно анализировать сырой растительный материал, плодовоощные консервы и различные витаминные препараты и нельзя исследовать сушеные и интенсивно окрашенные продукты.

Расхождение по сравнению с методом, описанным на стр. 132—133, в пределе $\pm 10\%$.

Приготовление некоторых реактивов. 2%-ный раствор HCl — 45,1 мл HCl ($d = 1,19$) в мерной колбе на 1 л доводят водой до метки.

Остальные реактивы те же, что и при определении аскорбиновой кислоты без применения сероводорода. Материал готовят так же, как и для определения аскорбиновой кислоты.

Методика опыта. Материал экстрагируют так же, как и при определении дегидроаскорбиновой кислоты, только для этого применяют 2%-ный раствор HCl или дистиллированную воду (для плодов шиповника).

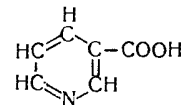
Для экстрагирования берут 3 мл 2%-ного раствора HCl на 1 г анализируемого материала. Отбирают пипеткой 1—10 мл экстракта в зависимости от содержания аскорбиновой кислоты в продукте (его определяют пробным титрованием) и вносят в коническую колбу емкостью 50—100 мл, в которую заранее наливают 1 мл 2%-ного раствора HCl и такое количество дистиллированной воды, чтобы объем жидкости был 15 мл. Титруют 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола. Жидкий материал перед титрованием разбавляют HCl в соотношении 1:1 или титруют без разбавления водой в присутствии 1 мл 2%-ного раствора HCl . Условия титрования и расчета те же, что и в предыдущем случае.

ВИТАМИН РР (НИКОТИНОВАЯ КИСЛОТА)

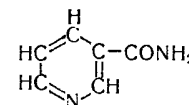
Антипеллагрический фактор предотвращает заболевание (поражение) кожи, главным образом на открытых участках. Заболевание получило название пеллагры (от итал. pelleagra — шершавая кожа).

Этот витамин широко распространен в природе (в дрожжах, пшенице, картофеле, кукурузе и др.). Много никотиновой кислоты найдено в оболочках зерна, меньше ее в питательной части.

В организме никотиновая кислота содержится в виде ее амида:



Никотиновая кислота



Амид никотиновой кислоты

Антипеллагрической активностью обладает как сама никотиновая кислота, так и ее амид.

Биологическая роль никотиновой кислоты заключается в том, что ее амид входит в состав кофермента никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ), анэробной дегидрогеназы, которая играет значительную роль в окислительно-восстановительных процессах при брожении и дыхании. Методы определения никотиновой кислоты построены на цветных реакциях.

Качественные цветные реакции на витамин РР. 1. В 10—20 каплях 10%-ного раствора CH_3COOH растворяют при нагревании 5—10 мг витамина РР. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем 5%-ного раствора $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$. Жидкость мутнеет и окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает синий осадок.

2. В пробирку вносят на кончике стеклянной палочки никотиновую кислоту и прибавляют 15 капель 10%-ного раствора NaHCO_3 , перемешивают и добавляют 15 капель свежеприготовленного 5%-ного раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Жидкость окрашивается в желтый цвет.

Колориметрическое определение витамина РР (по В. М. Иосиковой).

Приготовление некоторых реактивов. Водный раствор ZnSO_4 — одну весовую часть ZnSO_4 растворяют в одном объеме дистиллированной воды.

Раствор бромистого родана — к 1 г кристаллического KBr в 10 мл 0,1 н. раствора KNCS или NH_4NCS прибавляют 1 мл HCl (1 : 1) и по каплям 2 мл брома ($d = 3,14$). Раствор немедленно используют для реакции, не давая ему охладиться.

Стандартный раствор никотиновой кислоты — 25 мг кристаллической никотиновой кислоты растворяют в 96%-ном растворе $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в мерной колбе емкостью 50 мл. Раствор доводят спиртом до метки. Берут 1 мл этого раствора и разбавляют в мерной колбе емкостью 50 мл. В 1 мл такого раствора содержится 10 мкг никотиновой кислоты.

Спиртовой раствор анилина — один объем свежеперегнанного над цинковой пылью анилина растворяют в шести объемах 96%-ного раствора этилового спирта. Раствор должен быть бесцветным (хранить в склянке из темного стекла с притертой пробкой на холоду).

Методика опыта. Навеску 1—20 г тонкорастертого растительного материала (с предполагаемым содержанием никотиновой кислоты 100—150 мкг) гидролизуют со 100 мл 1 н. раствора HCl на кипящей водяной бане в течение 1 ч.

Охлажденный гидролизат нейтрализуют 40%-ным раствором щелочи до $\text{pH} = 6,5$ (проверяя иономером или индикатором) и обрабатывают 100 мл 96%-ного раствора этилового спирта при перемешивании. Выпавший осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера с отсасыванием. К прозрачному фильтрату добавляют 2 г бентонита (см. стр. 125) и встряхивают 3 мин. Никотиновая кислота адсорбируется на асканите. Асканит отфильтровывают на маленькой воронке Бюхнера с отсасыванием и переносят в коническую колбу, в которой элюируют никотиновую кислоту, встряхивая асканит с 25 мл 1 н. раствора NaOH в течение 3 мин.

Смесь переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют. Мерным цилиндром, которым измеряли щелочь, измеряют объем центрифугата. Затем центрифугат переносят в стакан и приливают раствор ZnSO_4 (1:1) до $\text{pH} = 6,5$ по иономеру или индикатору. Смесь снова фильтруют на маленькой воронке Бюхнера с отсасыванием. Фильтрат количественно сливают в коническую колбу и окисляют при нагревании на электрической плитке, прибавляя по каплям 1 н. раствор KMnO_4 до получения прозрачного раствора (обычно требуется 4—6 капель). Смесь охлаждают и центрифугируют; центрифугат обрабатывают кристаллическим K_3PO_4 (по фенолфталеину) до обесцвечивания, после чего доводят pH до 6,5, прибавляя разбавленный раствор HCl (1 : 1)

и фильтруя с отсасыванием. Для проведения цветной реакции к 5 мл испытуемой жидкости и 5 мл стандартного раствора (содержащего 10 мкг никотиновой кислоты), предварительно нагретым до 60—70° С, приливают по 2 мл раствора бромистого родана и 7 мл спиртового раствора (1 : 6) свежеперегнанного над цинковой пылью анилина. После отстаивания в течение 0,5—1 ч смесь фильтруют через сухой складчатый бумажный фильтр и фильтрат колориметрируют в фотоэлектроколориметре, применяя в качестве контроля смесь 95—96%-ного раствора этилового спирта и воды в соотношении 1 : 1. Содержание никотиновой кислоты в продукте (в мг%) вычисляют по формуле

$$x = \frac{25v_1 l_1 \cdot 10 \cdot 100}{gv \cdot 5l \cdot 1000},$$

где 25 — количество щелочи, взятой для элюации; g — навеска, г; v_1 — объем элюата после добавления к нему раствора ZnSO_4 ; v — объем элюата после извлечения никотиновой кислоты раствором NaOH ; 5 — количество вытяжки, взятой для реакции, мл; l_1 — оптическая плотность, или светопоглощение, испытуемого раствора; l — оптическая плотность стандартного раствора; 10 — содержание никотиновой кислоты в 1 мл стандартного раствора, мкг; 100 — коэффициент пересчета, мг%; 1000 — коэффициент пересчета, мг.

ВИТАМИН В₁ (ТИАМИН)

Этот витамин антиневритный, отсутствие или недостаток его в пище приводит к заболеванию, известному под названием «бери-бери». Авитаминоз сопровождается нарушениями со стороны нервной системы, воспалением нервных стволов (полиневрит), поражением периферической нервной системы, потерей кожной чувствительности и наступлением паралича. Кроме указанных симптомов, могут происходить и такие глубокие нарушения, как расстройство сердечной деятельности, нарушение водного обмена, функции желудочно-кишечного тракта и др.

Витамин B_1 содержится в большинстве пищевых продуктов, в пшеничной и ржаной муке, в дрожжах, печени, почках и др. Много витамина B_1 в пшеничных и рисовых отрубях, зародышах злаковых, во внутренних органах животных. Химическая структура витамина B_1 была окончательно установлена в 1937 г.; в этом же году он был синтезирован.

Было установлено, что в состав молекулы витамина B_1 входит сера и аминокгруппа, поэтому его называют еще тиамином.

Качественные реакции на витамин В₁ (тиамин).

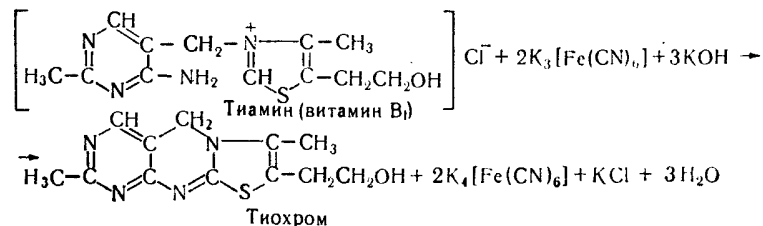
Диазореакция. Эта реакция сопровождается образованием азокрасителя (красного цвета) при добавлении к тиамину раствора диазореактива и щелочи. Образование сложного соединения тиамин с диазореактивом протекает так же, как и при определении гистидина и тирозина.

Приготовление диазореактива. К 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 1 мл 5%-ного раствора NaNO_2 .

Методика опыта. К десяти каплям диазореактива добавляют на кончике стеклянной палочки порошок тиамин и 5—7 капель 10%-ного раствора Na_2CO_3 . Жидкость окрашивается в оранжевый или красный цвет, что указывает на присутствие витамина B_1 . При осторожном спускании по наклонной стенке пробирки раствора Na_2CO_3 на границе двух жидкостей образуется красное кольцо.

Окисление тиамина в тиохром. Качественная реакция на витамин B_1 основана на окислении его в щелочной среде $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ с образованием тиохрома желтого цвета, раствор которого обладает голубой флуоресценцией в ультрафиолетовом свете.

Реакция образования тиохрома протекает по следующей схеме:



Методика опыта. В пробирку с небольшим количеством воды вносят на кончике стеклянной палочки порошок тиамина, растворяют его и прибавляют 5 капель 5%-ного раствора красной кровяной соли и 5 капель раствора KOH . Смесь перемешивают и нагревают. Жидкость окрашивается в желтый цвет вследствие превращения тиамина в тиохром, при освещении которого ультрафиолетовым светом видна голубая флуоресценция.

В смесь до ее нагревания прибавляют 15 капель изобутилового спирта и хорошо взбалтывают. Верхний слой при помощи капилляра или микропипетки переносят в сухую пробирку и наблюдают голубую флуоресценцию в ультрафиолетовом свете.

Определение количества витамина B_1 в пищевых продуктах методом флуороскопии (визуально). Реакция окисления тиамина в тиохром протекает количественно, а поэтому она была положена в основу метода определения витамина B_1 .

Для этой реакции исследуемый продукт подвергают предварительному ферментативному расщеплению, чтобы освободить связанный (фосфорилированный) тиамин. От посторонних флуоресцирующих веществ тиамин освобождают, обрабатывая его спиртами, извлекающими посторонние вещества и не растворяющими витамин B_1 .

Приготовление некоторых реактивов. Бутиловый, изобутиловый или изоамиловый спирты проверяют на отсутствие флуоресценции. Если флуоресценция обнаружена, то его обрабатывают активированным углем (15 г на 1 л спирта). Спирт, смешанный с углем, энергично встряхивают 30 мин в шуттель-аппарате. Затем фильтруют, высушивают безводным CaCl_2 и отгоняют в пределах указанных температур.

Ферментный препарат из мицелия пенициллияма (*P. notatum*, *P. crustosum*, *P. chrysogenum*) обрабатывают описанным ниже способом (см. стр. 139).

Стандартный раствор витамина B_1 : а) основной раствор: в колбе емкостью 100 мл 10 мг кристаллического тиамина растворяют в 0,001 н. растворе HCl , приготовленном на 25%-ном растворе спирта, и доводят этим же раствором HCl до метки. 1 мл стандартного раствора содержит 100 мкг тиамина. Раствор сохраняется 1—1,5 ме-

сяца в темной склянке на холоду; б) из основного раствора (а) перед анализом готовят рабочий раствор; 1 мл основного раствора (а) разбавляют водой в мерной колбе до 100 мл. 1 мл рабочего раствора содержит 1 мкг тиамина.

Стандартная шкала (из калиброванных пробирок). Из рабочего раствора (б) готовят несколько эталонов шкалы. Для этого в небольших делительных воронках к 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5 и 2 мл раствора (б), содержащего соответственно 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5 и 2 мкг тиамина, приливают 3,5; 3,25; 3; 2,75; 2,5 и 2 мл воды, по 1 мл 1%-ного водного раствора $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (приготовленного в день анализа) и по 3 мл 15%-ного раствора KOH , быстро перемешивают, добавляют из микробюретки по 10 мл изобутилового, изоамилового или бутилового спирта. Встряхивают в течение 2 мин, после разделения слоев удаляют нижний водно-щелочной слой. Спиртовой слой фильтруют через бумажный фильтр, в основание которого предварительно помещают около 1 г безводного Na_2SO_4 . Прозрачные растворы переиосят в калиброванные пробирки. Полученная стандартная шкала устойчива в течение двух-трех недель при хранении в закрытом виде, в темном месте, на холоду. Для продуктов с низким содержанием витамина B_1 готовят шкалу с 0,1; 0,2; 0,4 мкг тиамина.

Методика опыта. Взвешивают 5—10 г (в зависимости от ожидаемого содержания витамина) исследуемого растительного продукта и тщательно растирают в ступке с 10—25 мл 0,1 н. раствора H_2SO_4 , переносят в колбу и доводят объем тем же раствором H_2SO_4 приблизительно до 75 мл. Колбу нагревают на кипящей водяной бане 45 мин, время от времени перемешивая ее содержимое. Далее колбу охлаждают до 35—40° С и добавляют в нее суспензию ферментного препарата пенициллияма из расчета 0,03 г мицелия на 1 г сухого вещества навески. Суспензию готовят следующим образом: навеску мицелия растирают в небольшой фарфоровой ступке с 2—3 мл 2,5 н. раствора CH_3COONa и содержимое ступки количественно, при помощи 2—3 мл этого же раствора, переносят в колбу, доводя рН смеси раствором CH_3COONa до 5. Затем колбу помещают в термостат на 12—15 ч при температуре 38° С. После инкубирования смесь количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, доводят водой до метки и фильтруют.

В делительную воронку отмеряют пипеткой Мора 15—20 мл фильтрата, обрабатывают 1—2 раза равным объемом (отмеряют пипеткой) изобутилового, изоамилового или бутилового спирта (для удаления флуоресцирующих примесей) и сильно встряхивают 1—2 мин. Спирт отделяют, а из вытяжки в делительные воронки емкостью 25—50 мл отбирают четыре пробы по 4 мл. К отобранным пробам прибавляют 1%-ный раствор $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$: 0,05; 0,1; 0,45 или 0,2 мл и по 3 мл 15%-ного раствора KOH . Если окислителя добавлено много или мало, то тиамин может частично разрушиться или неполностью окислиться. Смесь в воронках быстро перемешивают, добавляют из микробюретки по 10 мл изобутилового, бутилового или изоамилового спирта для экстракции тиохрома и встряхивают 2 мин. После отстаивания удаляют водный слой, а спиртовой фильтруют через бумажный фильтр, на который предварительно насыпают Na_2SO_4 . Фильтрат наливают в калиброванную пробирку и интенсивность флуоресценции сравнивают со стандартной шкалой. Интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации тиамина. Для сравнения среди испытуемых растворов выбирают раствор с наиболее яркой флуоресценцией. Отобранный раствор затем сравнивают со стандартной шкалой. Определяют пробирку, в которой интенсивность флуоресценции раствора

совпадает с интенсивностью испытуемого раствора. Интенсивность окраски раствора в пробирках 1 и 2 (рис. 32) сравнивают в ультрафиолетовом свете, на пути между источником света ставят черный светофильтр 4 (стекло Вуда, увиолевое стекло). В качестве источника света берут ртутно-кварцевую лампу ПРК-4 З. Содержание тиамин в мг% вычисляют по формуле

$$x = \frac{cv_1 \cdot 100}{av \cdot 1000}$$

где v — объем вытяжки, взятой для окисления, мл; v_1 — объем, до которого доведена навеска после инкубации в термостате, мл (в данном случае 100 мл); a — навеска исследуемого образца, г; c — количество тиамин в эталоне стандартной шкалы, совпавшем при сравнении с испытуемым раствором, мкг; 1000 — цифра для пересчета в миллиграммы. Кроме флуороскопического и флуорометрического методов, известен объемный метод определения витамина B_1 . Этот метод применяют только для анализа кристаллического препарата витамина B_1 .

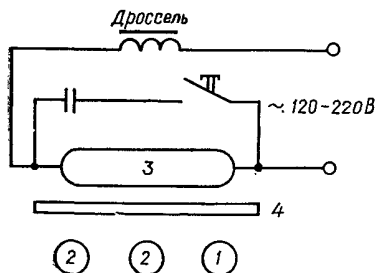


Рис. 32. Схема флуороскопа: 1 — пробирка с исследуемым раствором; 2 — пробирка со стандартным раствором; 3 — ртутно-кварцевая лампа ПРК-4; 4 — черный светофильтр.

Упрощенный объемный метод определения тиаминхлорида. Соляную кислоту, находящуюся в молекуле тиамин, титруют 0,1 н. раствором

NaOH и по количеству израсходованного раствора судят о содержании тиамин в исследуемом веществе.

Приготовление индикатора — 100 мг бромтимолового синего (бромтилблау) растворяют в 20 мл теплого 96%-ного этилового спирта при температуре 40—50° С и доводят водой до 100 мл.

Методика опыта. На аналитических весах взвешивают 0,3 г чистого тиаминхлорида (или 10 г витаминизированного драже), растворяют в 10—40 мл дистиллированной воды и титруют 0,1 н. раствором NaOH (или KOH) с 5 каплями индикатора до появления голубого окрашивания. Содержание тиамин (в %) рассчитывают по формуле

$$x = \frac{v \cdot 100 \cdot 0,33727}{g}$$

где v — объем 0,1 н. раствора NaOH, израсходованного на титрование, мл; 0,33727 — количество тиаминхлорида, соответствующее 1 мл 0,1 н. раствора NaOH, г; g — навеска исследуемого концентрата, г.

Если в исследуемом продукте есть аскорбиновая кислота, делают поправку: 10 г драже (или другого препарата) растирают в ступке, количественно переносят с водой в мерную колбу емкостью 250 мл и доводят водой до метки. Тщательно перемешивают, отбирают 25 мл и титруют 0,1 н. раствором иода до слабо-желтого окрашивания. Следующие 25 мл титруют 0,1 н. раствором NaOH. Содержание вита-

мина B_1 (в %) вычисляют по формуле

$$x = \left(v - \frac{v_1}{2} \right) \frac{100 \cdot 0,033727}{g}$$

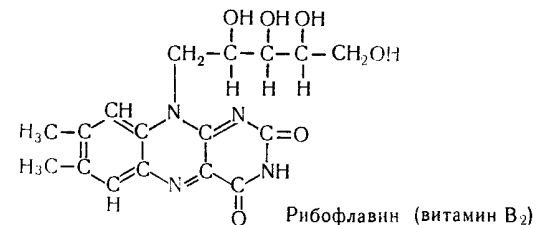
где v_1 — объем 0,1 н. раствора иода, затраченного на титрование, мл.

Остальные обозначения те же, что и в предыдущей формуле. Этот метод применяют только тогда, когда в исследуемом материале нет посторонних кислот или оснований. Для исследования природных растительных и животных пищевых продуктов этот метод не пригоден.

Известен объемный метод, который основан на титровании галоида, находящегося в тиамин, раствором $AgNO_3$. По количеству израсходованного раствора судят о количестве тиамин в исследуемом веществе.

ВИТАМИН B_2 (РИБОФЛАВИН)

Витамин B_2 содержится в дрожжах, пшенице, картофеле и других растительных продуктах. При недостатке этого витамина возникают болезненные явления: резь в глазах, головная боль, снижение аппетита, воспаление слизистых оболочек и др. Рибофлавин — это кристаллическое вещество желтого цвета, горький на вкус. Он представляет собой метилированный изоаллоксазин, соединенный с пятиатомным спиртом рибитолом:



Рибофлавин, связанный с фосфорной кислотой, входит в состав ферментов, обычно называемых флавиновыми ферментами. Желтый рибофлавин сообщает желтую окраску флавиновым ферментам, входящим в группу аэробных дегидрогеназ. Таким образом, витамин B_2 участвует в окислительно-восстановительных процессах. При восстановлении витамин B_2 (желтый цвет) переходит в лейкоформу (бесцветный). Рибофлавин встречается в виде флавиномононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД), а также в связанном с белками состоянии, образуя качественно новые системы — желтые дыхательные ферменты. Нейтральный водный раствор рибофлавина обладает желто-зеленой флуоресценцией. При подкислении или при подщелачивании флуоресценция рибофлавина уменьшается и исчезает. В щелочной среде витамин B_2 разрушается, в кислой среде он устойчив.

Качественная реакция на витамин B_2 основана на способности его легко восстанавливаться с образованием лейкоформы. Раствор

витамина В₂ желтого цвета при восстановлении сначала окрашивается в розовый цвет вследствие образования промежуточных соединений, а затем обесцвечивается благодаря образующейся бесцветной лейкоформе витамина В₂.

Методика опыта. В пробирку наливают 10 капель раствора витамина В₂, добавляют 5 капель раствора HCl ($d = 1,19$) и несколько гранул цинка. Наблюдают выделение водорода. Жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается, что указывает на восстановление рибофлавина до его лейкоформы. Если жидкость остается окрашенной, следуют еще прибавить цинка. При отстаивании верхний слой жидкости окрашивается в желтый цвет вследствие окисления лейкофлавина кислородом воздуха в рибофлавин.

Флуорометрический метод определения витамина В₂ в пищевых продуктах (по К. А. Половолоцкой, Н. И. Зайцевой, Е. П. Скоробогатовой). Метод основан на измерении интенсивности флуоресценции раствора витамина В₂. В флуорометре световая энергия флуоресценции превращается при помощи фотоэлементов в электрическую, которая измеряется чувствительным гальванометром. Восстановленная форма рибофлавина утрачивает свою флуоресцирующую способность. Недостатком флуорометрического метода является то, что флуоресценция вытяжек может зависеть не только от содержания в них рибофлавина, но и от содержания других веществ. Это учитывают, дополнительно определяя в отдельной пробе флуоресценцию сопутствующих веществ после восстановления рибофлавина («гашения» флуоресценции восстановителями, например Na₂S₂O₄ · H₂O).

Приготовление некоторых реактивов. 2,5 М раствор CH₃COONa — 340 г CH₃COONa растворяют в 1 л воды. Раствор SnCl₂ — 10 г SnCl₂ растворяют в 25 мл концентрированной HCl. Раствор хранят в темной склянке с притертой пробкой. Из этого (исходного) раствора готовят рабочий, разбавляя 0,2 мл исходного раствора водой до 100 мл. Раствор Na₂S₂O₄ — 0,25 г Na₂S₂O₄ · 2H₂O растворяют в 10 мл 2%-ного раствора Na₂CO₃. Раствор готовят перед употреблением. 4 М раствор K₂HPO₄ — 69,6 г соли растворяют в 100 мл воды. Ферментные препараты — трипсин либо панкреатин или препарат из мицелия пенициллиума. Мицелий отжимают на лабораторном прессе и высушивают при температуре не выше 45° С. При внесении в вытяжку ферментный препарат рекомендуют растирать в ступке с небольшим объемом буферного раствора или раствора CH₃COONa.

Стандартный раствор рибофлавина — в мерную колбу емкостью 250 мл вносят 10 мг чистого кристаллического рибофлавина, растворяют в 0,01 н. растворе HCl и доводят этим же раствором кислоты до метки. В 1 мл такого раствора содержится 40 мкг витамина В₂. Раствор сохраняют в темноте и на холоду (срок годности — один месяц). Для определения содержания рибофлавина готовят рабочий раствор: в мерную колбу емкостью 100 мл вносят 37,5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты, добавляют 25 мл 4 М раствора K₂HPO₄ и 1 мл стандартного раствора рибофлавина. Затем доводят содержимое колбы водой до метки.

Методика опыта. При определении общего количества рибофлавина в исследуемом растительном пищевом продукте навеску 5—10 г продукта тщательно растирают в ступке с небольшим объемом фосфатной буферной смеси (рН = 7,8 ÷ 8,0). Растертую массу количественно (при помощи буфера) переносят в колбу с таким расчетом, чтобы общее разбавление соответствовало 1 : 15 или 1 : 20. Смесь помещают на 40 мин в кипящую водяную баню. Затем охлаждают до 30° С

и проверяют рН. При сдвиге рН ниже 7 его вновь доводят до 7,8—8,0. К смеси добавляют ферментный препарат (из расчета 30 мл препарата на 1 г сухого вещества навески) и помещают в термостат на 12—20 ч при 37° С.

Белок благодаря ферменту гидролизует, при этом отщепляется прочно связанный с белком рибофлавин. Гидролизат разбавляют водой так, чтобы общее разбавление соответствовало 1 : 25 или 1 : 30, и фильтруют через сухой складчатый фильтр. В колбу пипеткой Мора отбирают 5 мл фильтрата, добавляют 5 мл 20%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Содержимое колбы нагревают 10 мин на кипящей водяной бане для расщепления нуклеотидной формы и освобождения рибофлавина. После охлаждения к смеси добавляют 4 М раствора K₂HPO₄ до рН=6. Затем по каплям приливают 4%-ный раствор КМпО₄ (обычно 0,2—0,5 мл) до появления красноватой окраски. Смесь оставляют на 10 мин, после чего добавляют по каплям 3%-ный раствор H₂O₂ до исчезновения окраски. Далее добавляют 0,2 мл раствора SnCl₂ и 0,1 мл 2,5%-ного раствора Na₂S₂O₄ и 20 мин энергично встряхивают в шуттель-аппарате. Объем смеси доводят до 15 мл и, если есть муть, смесь фильтруют. В фильтрате измеряют флуоресценцию. Опытную смесь и стандартный рабочий раствор рибофлавина помещают в кюветы флуорометра и замечают показания флуорометра. Затем в обе кюветы прибавляют по 0,1 г Na₂CO₃ и около 0,1 г Na₂S₂O₄ · H₂O и вновь измеряют флуоресценцию. Флуоресценцию рибофлавина «гасят» до нуля. В опытной смеси остается еще небольшая флуоресценция, вызываемая посторонними флуоресцирующими веществами. «Гашение» флуоресценции проводят 2—3 раза, так как в некоторых случаях оно протекает очень медленно. К пробам повторно добавляют Na₂S₂O₄ · H₂O и вновь измеряют флуоресценцию. Содержание рибофлавина (в мкг) на 1 г исследуемого вещества вычисляют по формуле

$$x = \frac{(A - B) 0,4v}{cg}$$

где А — показание флуорометра для опытной смеси (первый отсчет); В — показание флуорометра для опытной смеси после «гашения» флуоресценции рибофлавина (второй отсчет); v — общий объем исследуемого раствора с учетом всех разбавлений, мл; с — показание флуорометра для стандартного раствора, содержащего 0,4 мкг рибофлавина в 1 мл (концентрация стандартного раствора рибофлавина в мкг); g — навеска. В отдельной пробе определяют содержание кислотно-гидролизуемого и фосфатазаноотщепляемого рибофлавина. В первом случае определяют сумму свободного и мононуклеотидного рибофлавина, так как учет ведут в кислотном гидролизате, содержащем две формы рибофлавина, во втором — весь рибофлавин. Исследование кислотно-гидролизуемой фракции рибофлавина проводят следующим образом. Навеску вещества тщательно растирают с небольшим количеством 0,1 н. раствора H₂SO₄. Затем смесь переносят в колбу, добавляют 0,1 н. раствор H₂SO₄ до общего разбавления 1 : 15 или 1 : 20 и нагревают 40 мин на кипящей водяной бане. Смесь охлаждают до 40° С, разбавляют водой в соотношении 1 : 25 или 1 : 30 и фильтруют. 8 мл фильтрата

обрабатывают растворами $KMnO_4$, $SnCl_2$ и $Na_2S_2O_4$, а затем измеряют флуоресценцию.

При определении рибофлавина в кислотно-гидролизуемой фракции после охлаждения кислотного гидролизата до $40^\circ C$ производят ферментативное расщепление флавинадениндинуклеотида, для чего насыщенным раствором CH_3COONa доводят рН до 4,5, добавляют ферментный препарат (мицелий пенициллиума) из расчета 30 мг на 1-г сухого вещества навески и инкубируют в термостате 12—16 ч при $37^\circ C$. Далее опыт проводят так же, как на стр. 142—143.

Полученный результат вычитают из общего количества рибофлавина, устанавливая таким образом количество рибофлавина, прочно связанного с белком.

Колориметрическое определение витамина B_2 (по Л. Н. Кравчиной). В витаминизированных пищевых продуктах (драже), т. е. при высоком содержании витамина B_2 , его определяют колориметрически. Этот метод проще описанного, но не пригоден для определения рибофлавина в обычных естественных продуктах. В основу метода положено изменение интенсивности окраски раствора рибофлавина в зависимости от его концентрации.

Приготовление стандартного раствора. Перед анализом 1 мл исходного раствора, содержащего 40 мкг рибофлавина, разбавляют водой до 10 мл.

Методика опыта. Навеску 1—2 г (в зависимости от предполагаемого содержания рибофлавина) тонко измельченной средней пробы концентрата (30—50 шт. драже) растворяют в мерной колбе емкостью 100 мл и доводят водой до метки. В 1 мл такого раствора должно быть 4—8 мкг рибофлавина. Если рибофлавина больше, навеску растворяют в большом объеме воды. Смесь фильтруют и прозрачный фильтрат колориметрируют в фотоэлектроколориметре, сравнивая со стандартом. Содержание рибофлавина в 1 г исследуемого концентрата вычисляют по формуле

$$x = \frac{c_1 v}{l_2 g \cdot 1000}$$

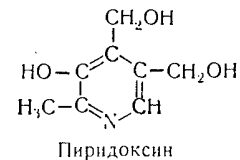
где c — концентрация стандартного раствора, мкг/мл; l_1 — оптическая плотность исследуемого концентрата; l_2 — оптическая плотность стандартного раствора; v — объем раствора, мл; g — навеска концентрата, г; 1000 — коэффициент пересчета, мг.

ВИТАМИН B_6 (ПИРИДОКСИН, АДЕРМИН)

Витамин B_6 содержится в капусте, моркови, картофеле, свекле. Особенно богаты этим витамином рисовые и пшеничные дрожжи, зародыши пшеницы, бобы, пекарские и пивные дрожжи.

Отсутствие этого витамина в пище сопровождается специфическим заболеванием кожи (дерматитом), а также полиневритом и анемией. Дерматит не излечивается другими антидерматитными витаминами, никотиновой кислотой и др. Однако он сравнительно легко проходит при добавлении в пищу продуктов, содержащих витамин B_6 .

Витамин B_6 является производным пиридина:



Производные пиридоксина — фосфопиридоксаль и фосфопиридоксамин — являются коферментами аминотрансфераз, которые выполняют важную функцию при обмене белков в процессе переаминирования аминокислот, а также коферментами декарбоксилаз некоторых аминокислот (лизина, орнитина и др.).

Качественная реакция на витамин B_6 . С раствором $FeCl_3$ пиридоксин образует красное соединение типа фенолята железа.

Методика опыта. К пяти каплям 5%-ного водного раствора пиридоксина прибавляют каплю 5%-ного раствора $FeCl_3$ и встряхивают; жидкость приобретает красную окраску.

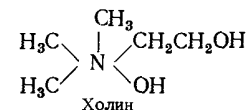
ХОЛИН

Холин является составной частью лецитинов, а также распространен в природе в свободном виде. Холин входит в состав растений и многих пищевых продуктов, особенно много его в сахарной свекле, в мелассе и др. В сахарном производстве холин относят к мелассообразователям.

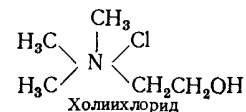
Холин широко применяют в медицине, так как он активизирует процессы обмена веществ. При недостатке холина в организме наблюдаются тяжелые изменения в печени и почках.

Холин является источником метильных групп. Его относят к группе витаминов. Недостаток холина в организме возникает, если в употребляемой пище отсутствует метионин, который является одним из источников образования холина. В растениях холин образуется в результате реакции ферментативного метилирования аминоэтилового спирта (коламина). Кроме того, в растениях холин может образоваться вследствие гидролитического расщепления лецитинов, в состав которых он входит.

Холин представляет собой бесцветное кристаллическое гигроскопическое вещество, растворимое в воде и спирте, нерастворимое в хлороформе и эфире:



В медицине холин применяют в виде холинхлорида:



Колориметрическое определение холина. Холин определяют с помощью соли Рейнеке $\text{NH}_4 [\text{Cr} (\text{NH}_3)_2 (\text{CNS})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$. Полученный осадок рейнеката отфильтровывают на стеклянном фильтре с отсасыванием, растворяют в ацетоне и раствор колориметрируют.

Приготовление некоторых реактивов. Абсолютный метиловый спирт — продажный метиловый спирт сушат в течение 1—2 суток безводным CuSO_4 . Быстро фильтруют через большой складчатый фильтр и перегоняют в приборе, изолированном от влаги воздуха (рис. 33). Отгонанный метиловый спирт хранят в плотно закрытой склянке. Насыщенный раствор $\text{Ba} (\text{OH})_2$ — 5—5,5 г $\text{Ba} (\text{OH})_2$ растворяют в 100 мл воды и хранят в герметически закрытой склян-

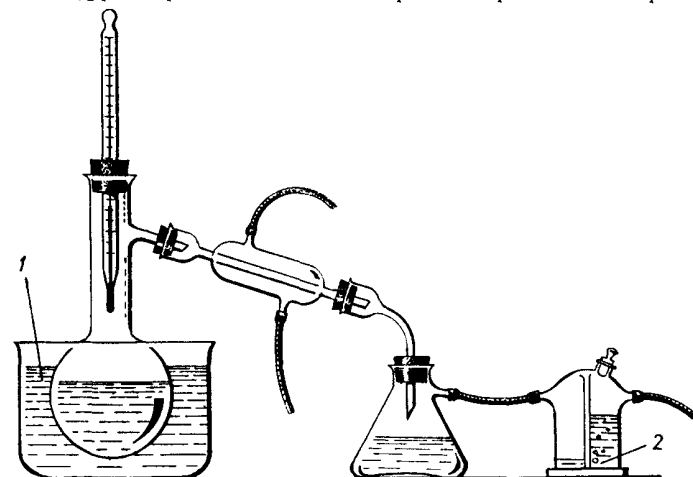


Рис. 33. Прибор для отгонки абсолютного метилового спирта: 1 — водяная баня; 2 — склянка Тищенко с концентрированной серной кислотой.

ке, на дне склянки должно быть несколько нерастворившихся прозрачных кристаллов. Стандартный раствор холинхлорида — холинхлорид перекристаллизовывают 4 раза из абсолютного этилового спирта и сушат в вакууме 48 ч при 84°C в ампуле, которую после сушки запаивают и взвешивают. Для работы ампулу осторожно вскрывают, содержимое ее растворяют в определенном объеме дистиллированной воды. Пустую сухую ампулу взвешивают и по разности устанавливают содержание холинхлорида в растворе. Вода, насыщенная при 3°C рейнекатом холина — к небольшому количеству раствора холинхлорида добавляют 2—3 мл 2%-ного раствора соли Рейнеке и оставляют на 3 ч в холодильнике. Выпавший осадок отфильтровывают на холоду через стеклянный фильтр № 2 или после промывания охлажденным метиловым спиртом и водой переносят в холодную воду, где он, незначительно растворяясь, образует насыщенный раствор. При промывании воду осторожно декантируют с осадка или профильтровывают через фильтр, охлаждаемый в холодильнике. Этиловый спирт, насыщенный при 3°C рейнекатом холина — насыщают так же, как и воду. Перед употреблением спиртовой раствор фильтруют на холоду.

Методика опыта. На аналитических весах взвешивают 1—3 г исследуемого растительного материала, в зависимости от предполагаемого содержания холина (должно быть 1—5 мг холина), растирают в ступке с безводным Na_2HPO_4 до получения сухого порошка. Растиртую массу количественно переносят в гильзу аппарата Сокслета, оста-

ток на ступке собирают ватой, которую также помещают в гильзу. В аппарат Сокслета наливают 100 мл абсолютного метилового спирта, небольшими порциями которого 2—3 раза быстро омывают пестик и ступку. Продолжительность экстракции до 20 ч. Аппарат во время экстракции изолируют от влаги воздуха при помощи хлоркальциевой трубки. По окончании экстракции метиловый спирт отгоняют, изолировав прибор от влаги воздуха.

К сухому остатку после удаления растворителя прибавляют 30 мл насыщенного раствора $\text{Ba} (\text{OH})_2$ и омыляют на кипящей водяной бане около 2 ч. Смесь охлаждают, добавляют несколько капель тимолфталина и нейтрализуют ледяной уксусной кислотой до изменения цвета раствора.

Раствор фильтруют на воронке Бюхнера через беззольный фильтр с небольшим отсасыванием. Фильтр несколько раз промывают водой; промывные воды вместе с фильтратом количественно переводят в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят водой до метки.

К содержимому мерной колбы добавляют 6 мл 2%-ного раствора соли Рейнеке и оставляют на 3 ч в холодильнике. Образовавшийся осадок рейнеката холина отфильтровывают на холоду через стеклянный фильтр № 2 или 1. Колбу ополаскивают 3—5 раз по 2,5 мл охлажденной профильтрованной водой (со льда), насыщенной рейнекатом холина. Осадок на фильтре промывают охлажденным профильтрованным этиловым спиртом, насыщенным рейнекатом холина. После промывания осадок сушат, пропуская через него воздух. Сухой осадок растворяют в ацетоне (последовательно приливая небольшие порции его на фильтр). Раствор рейнеката холина в ацетоне выливают в мерную колбу емкостью 50 мл и доводят ацетоном до метки. Одновременно таким же способом (исключая экстрагирование и омыление) готовят рейнекат холина из определенного количества стандартного раствора холинхлорида.

Полученные растворы колориметрируют в фотоэлектроколориметре со светофильтрами с максимумом поглощения в диапазоне между 510—540 нм.

Холин вычисляют по формуле

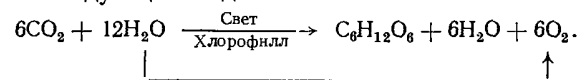
$$x = \frac{a l_1 v \cdot 100}{l g},$$

где x — количество холина в исследуемом продукте, мг%; a — содержание холина в 1 мл стандартного раствора, мг%; l_1 — оптическая плотность исследуемого раствора; l — оптическая плотность стандартного раствора; v — объем исследуемого раствора, мл; g — навеска исследуемого вещества, г.

УГЛЕВОДЫ

Углеводы — самые распространенные в природе органические вещества. Они составляют до 85—90% сухих веществ растительного организма. А если учесть, что подавляющая часть живого вещества на земном шаре приходится на долю растений, то можно представить ту огромную роль, которую играют углеводы в живой природе.

Синтез углеводов в растениях происходит в результате усвоения CO_2 под действием световой энергии в присутствии хлорофилла. Этот процесс, называющийся фотосинтезом, является источником образования органических соединений на Земле. Суммарное уравнение фотосинтеза имеет следующий вид:



Фотосинтез — единственный источник свободного кислорода на нашей планете. Углеводы в живом организме используются для самых разнообразных процессов обмена веществ. Из них образуются органические кислоты, спирты, жиры и другие органические соединения. За счет углеводов развиваются новые органы и ткани растений. Углеводы откладываются в виде запасных веществ в зерне, клубнях, корнеплодах и т. п. Они являются опорным материалом растительных клеток и тканей, обеспечивающих прочность. Пищевая ценность растительных продуктов как источника энергии определяется главным образом содержанием в них углеводов, которые пополняют энергетические затраты организма человека и животных.

По химическому составу углеводы делят на простые и сложные. К простым углеводам относятся моносахариды, к сложным — полисахариды, которые подразделяют на полисахариды первого и второго порядка.

К моносахаридам относятся гексозы (глюкоза, фруктоза, манноза и галактоза) и пентозы (ксилоза, арабиноза, рибоза, дезоксирибоза и рамноза). Моносахариды благодаря свободной кетонной или альдегидной группировке способны окисляться до соответствующих кислот. Таким образом, они обладают редуцирующими свойствами, которые используются для качественных и количественных определений моносахаридов. Редуцируют не только моносахариды, но и некоторые дисахариды, имеющие в своей структуре полуацетальный (глюкозидный) гидроксил.

Сложные углеводы состоят из моносахаридов. Например, в молекуле дисахарида два остатка моносахарида связаны глюкозидной связью. В зависимости от того, какой атом углерода связан глюкозидной связью, дисахариды делят на мальтозу, сахарозу, целлобиозу, гентибиозу, мелибиозу и др. Трисахариды состоят из трех остатков моносахаридов (раффиноза), тетрасахариды — из четырех остатков (стахиоза). Эта группа (ди-, три- и тетрасахариды) относится к полисахаридам первого порядка, или олигосахаридам. Все представители ее являются кристаллическими веществами и растворяются в воде.

Углеводы, состоящие из большего числа остатков моносахаридов, относятся к полисахаридам второго порядка. Это сложные высокомолекулярные соединения. Количество остатков простых сахаридов для многих из них еще точно не установлено. В воде они или не растворяются, или же образуют коллоидные растворы. К ним принадлежат такие углеводы, как крахмал, гликоген, гемицеллюлозы, пектиновые вещества, клетчатка, инулин и др.

Моно- и олигосахариды

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА САХАРА

Реакция с α -нафтолом. Очень чувствительной реакцией на сахара является реакция с α -нафтолом и тимолом (чувствительность с α -нафтолом 1 : 50 000).

Приготовление 0,2%-ного спиртового раствора α -нафтола: 0,5 г α -нафтола растворяют в 50 мл этилового спирта (перед употреблением основной раствор разбавляют в 5 раз водой).

Методика опыта. В две пробирки наливают по 2 мл раствора сахара. В первую добавляют 5 капель 0,2%-ного раствора α -нафтола, во вторую — 5 капель 1%-ного спиртового раствора тимола. В обе пробирки осторожно по стенкам доливают по 2 мл концентрированной H_2SO_4 ($d = 1,84$). На границе раздела серной кислоты и раствора сахара в первой пробирке (с α -нафтолом) появляется фиолетовое окрашивание, во второй (с тимолом) — красное.

Реакция кетоз с резорцином (по Селиванову). Кетозы, в том числе фруктоза, дают вишнево-красное окрашивание при нагревании с HCl и резорцином. При этом часто образуется буро-красный осадок. Кетоза при нагревании с кислотой теряет три молекулы воды и превращается в оксиметилфурфурол, который при взаимодействии с резорцином образует продукт вишнево-красного цвета.

При нагревании альдоз с кислотами также образуется оксиметилфурфурол.

Однако эта реакция протекает медленнее, чем с кетогексозами, что и обуславливает достаточную специфичность реакции Селиванова.

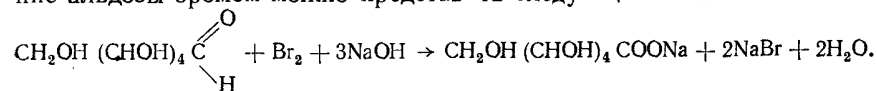
Приготовление реактива Селиванова: в 100 мл 20%-ного раствора HCl растворяют 0,050 г резорцина.

Методика опыта. В пробирку наливают 1—2 мл реактива Селиванова и 2 капли раствора испытуемого сахара. Нагревают на кипящей водяной бане и через 1—2 мин наблюдают, образуется ли красное окрашивание. При наличии альдоз красное окрашивание не появляется даже через 10 мин после нагревания.

Реакция кетоз с дифениламином.

Методика опыта. К 1 мл испытуемого раствора добавляют 0,5 мл 20%-ного раствора дифениламина в 96%-ном этиловом спирте и 1 мл 20%-ного раствора HCl . Смесь нагревают 5 мин на кипящей водяной бане. После появления окраски продолжают нагревать еще 5 мин. В присутствии кетогексоз появляется интенсивное синее окрашивание. Эту реакцию используют для количественного определения фруктозы колориметрическим методом.

Реакция альдоз с бромной водой и FeCl_3 . Альдозы легко окисляются бромом и иодом в щелочной среде, что отличает их от кетоз. Окисление альдозы бромом можно представить следующей схемой:



Приготовление бромной воды — дистиллированную воду взбалтывают с бромом, готова насыщенный водный раствор брома — бромную воду. Воду отделяют от избытка брома декантацией.

Методика опыта. В небольшую колбу вносят 20—30 мг сахара или сахарного сиропа, добавляют 10 мл свежеприготовленной бромной воды и нагревают на водяной бане при 60—70° С. Избыток брома удаляют кипячением. Затем к бесцветному раствору прибавляют 10 мл 0,75%-ного раствора FeCl₃ и 2 капли HCl (*d* = 1,19). Появляется интенсивная желтая окраска, которая указывает на наличие альдоз.

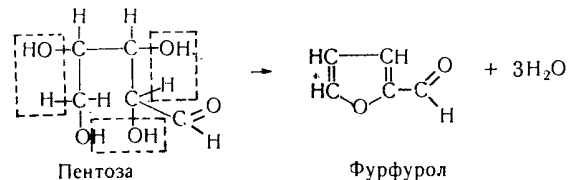
Реакция на редуцирующие сахара с CuO. Как уже указывалось, раствор редуцирующего сахара в щелочной среде восстанавливает CuO до Cu₂O.

Методика опыта. В четыре пробирки наливают по 2 мл раствора сахаров, добавляют по 2 мл 10%-ного раствора NaOH и по каплям 5%-ный раствор CuSO₄ до появления исчезающей мути Cu(OH)₂. Верхнюю часть содержимого пробирки осторожно нагревают. Вначале появляется желтое окрашивание (CuOH), которое затем переходит в красное (Cu₂O). С крахмалом и сахарозой, которые не обладают редуцирующими свойствами, эта реакция будет отрицательной. Редуцирующие сахара восстанавливают также висмут, серебро и ртуть из их солей.

Качественные реакции на пентозы. Пентозы широко распространены в растительном мире. Ксилоза и арабиноза редко встречаются в растениях в свободном виде, они образуются при расщеплении пентозанов. Пентозы не сбраживаются дрожжами.

Образование фурфурола. В основе качественного определения пентоз лежит образование фурфурола при нагревании пентоз с кислотами и последующее обнаружение его.

Образование фурфурола при взаимодействии пентоз с разбавленными кислотами можно представить следующей схемой:



Методика опыта. 2 мл испытуемого раствора пентозы наливают в пробирку и добавляют столько же концентрированной HCl (*d* = 1,19). Содержимое пробирки вначале некоторое время слабо нагревают, а затем кипятят. В парах держат бумажку, смоченную уксуснокислым анилином (одна часть анилина и две части уксусной кислоты). Бумажка окрашивается в красный цвет вследствие реакции фурфурола с анилином.

Реакция с флороглюцином.

Методика опыта. 2 мл 0,2%-ного раствора флороглюцина в 30%-ном растворе HCl наливают в пробирку и нагревают до кипения, тотчас же добавляют 6 капель раствора пентозы. Немедленно появляется розовое окрашивание, которое затем переходит в красное.

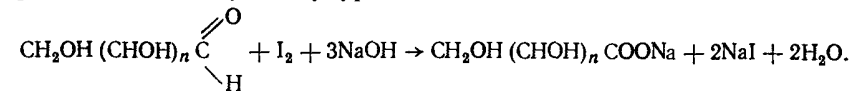
Реакция с орцином

Приготовление орцинового реактива — 1 г орцина растворяют в 500 мл 30%-ного раствора HCl и добавляют 4—5 мл 10%-ного раствора FeCl₃. Реактив хранят в темной, плотно закупоренной склянке.

Методика опыта. 2 мл орцинового реактива наливают в пробирку и нагревают до кипения. К нагретому орциновому реактиву добавляют 6 капель раствора пентозы. Появляется розовое окрашивание, которое в дальнейшем переходит в зеленое.

Количественное определение сахаров. Для количественных определений используют различные свойства сахара. Чаще всего в контроле производства различных углеводов применяют поляриметрический метод, который основан на измерении угла вращения плоскости поляризации растворов сахаров. На результаты при определении сахаров этим методом влияют другие оптически активные вещества, которые затрудняют анализ смесей сахаров. Большое распространение при исследовании растительных веществ и физиологических процессов в живых организмах получили химические и колориметрические методы.

Иодометрический метод определения альдоз (по Вильштеттеру и Шудлю). В основу метода положен процесс окисления альдегидной группы иодом в щелочной среде до соответствующей кислоты. Реакция протекает по следующему уравнению:



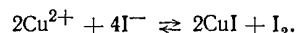
В этих условиях кетозы не окисляются.

Методика опыта. Тщательно измельченную навеску вещества (1 г) переносят в колбу емкостью 100 мл, растворяют в воде и доводят водой до метки. Затем содержимое колбы фильтруют или центрифугируют, из фильтрата в колбу Эрленмейера отбирают 10 мл раствора, что соответствует 0,1 г исходного вещества. В колбу добавляют 25 мл 0,1 н. раствора иода и через 2—3 мин при энергичном помешивании медленно наливают 35 мл 0,1 н. раствора NaOH до исчезновения окраски иода. Колбу закрывают хорошо пригнанной резиновой или притертой стеклянной пробкой и ставят на 20 мин в темное место. Затем колбу вынимают, добавляют в нее 1 н. раствора H₂SO₄ и оттитровывают выделившийся иод 0,1 н. раствором Na₂S₂O₃, добавляя к концу титрования раствор крахмала в качестве индикатора. Одновременно проводят контрольный опыт с 10 мл дистиллированной воды. Количество глюкозы (в %) при данном анализе вычисляют по формуле

$$G = \frac{(a - b) \cdot 0,009v_1 \cdot 100}{gv_2}$$

где *a* — количество раствора Na₂S₂O₃, пошедшее на титрование в контрольном опыте; *b* — количество раствора Na₂S₂O₃, пошедшее на титрование в рабочем опыте; 0,009 — титр глюкозы по иоду (молекулярная масса глюкозы 180, эквивалент 90, титр 0,1 н. раствора 0,009); *v*₁ — объем растворения навески; *g* — навеска; *v*₂ — объем, взятый для титрования.

Определение редуцирующих сахаров (по Офнеру). С целью упрощения метода Офнер для определения редуцирующих веществ предложил раствор, в состав которого входит CuSO_4 , сегнетова соль и Na_2CO_3 . Таким образом, в этом растворе концентрация ионов гидроксидов понижена по сравнению с реактивом Фелинга, и поэтому раствор хорошо сохраняется. Редуцирующие сахара окисляются несколько медленнее, чем с раствором Фелинга. Однако, используя этот метод, не надо отфильтровывать Cu_2O , так как его количество легко определяется иодометрическим титрованием по следующей реакции:



Иодометрическим методом определяют оставшийся невосстановленный ион Cu^{2+} или непосредственно Cu_2O . При этом используют ту же обратимую реакцию, только равновесие должно быть смещено влево. Весь Cu_2O , перед окислением иодом, переводят в раствор, прибавляя достаточное количество HCl . Избыток иода оттитровывают раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ и, таким образом (по разности), определяют количество иода, связанного Cu_2O .

Приготовление некоторых реактивов. Реактив Офнера — 5 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 300 г сегнетовой соли и 10 г Na_2CO_3 растворяют на холоду в 900 мл дистиллированной воды, затем нагревают 2 ч на кипящей водяной бане, охлаждают и переводят в мерную колбу емкостью 1 л. Содержимое колбы доводят водой до метки. 0,0323 н. раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ — 8 г $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ растворяют в 1 л воды, проверяют титр и вносят соответствующую поправку (1 мл такого раствора соответствует 1 мг глюкозы). 0,323 н. раствор иода — 4,10 г иода и 20 г KI растворяют в мерной колбе на 1 л в небольшом количестве дистиллированной воды, а затем доводят водой до метки. Раствор HCl — 82 мл HCl ($d = 1,19$) разбавляют до 1 л.

Методика опыта. В колбу Эрленмейера емкостью 300 мл вносят 5 мл исследуемого раствора (гидролизата), 45 мл дистиллированной воды и 50 мл реактива Офнера, прибавляют немного (на кончике ножа) талька или грубо измельченной пемзы и нагревают (на асбестовой сетке) в течение 4—5 мин до кипения. Затем на небольшом пламени поддерживают умеренное кипение в течение 5 мин. Охлаждают в холодной воде (не взбалтывая). В колбу наливают 15 мл раствора HCl , тотчас же (иначе перешедшая в раствор Cu_2O начнет окисляться кислородом воздуха) прибавляют из бюретки избыток раствора иода (около 20 мл). Колбу закрывают хорошо подогнанной резиновой или пришлифованной стеклянной пробкой и время от времени перемешивают содержимое, вращая колбу, затем оставляют на 2 мин и титруют 0,0323 н. раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Параллельно ставят контрольный опыт. Количество редуцирующего сахара (в %) вычисляют по формуле

$$x = \frac{(a - b) K \cdot 100 \cdot 1000v_1}{gv_2},$$

где a — количество $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, пошедшее на титрование в контрольном опыте; b — количество $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, пошедшее на титрование в рабочем опыте; K — коэффициент пересчета $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в исследуемый редуцирующий сахар, мг; v_1 — объем растворения навески; g — навеска; v_2 — объем, взятый для титрования.

Колориметрическое определение фруктозы (по Церевитинову и Радзевичу).

Приготовление некоторых реактивов. 100 мл 96%-ного этилового спирта смешивают с 25 мл H_2SO_4 ($d = 1,84$) и 1 г дифениламина. Готовят вытяжку из растительных продуктов (в частности, из плодов), которую обрабатывают $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$. Избыток соли свинца удаляют Na_2SO_4 , фильтруют и фильтрат используют для колориметрического определения фруктозы.

Методика опыта. В две конические колбы емкостью 50 мл вносят по 2,5 мл в одну испытуемого, в другую стандартного раствора фруктозы, добавляют по 10 мл реактива. Смесь нагревают на кипящей водяной бане 15 мин, после чего быстро охлаждают. Полученный раствор количественно переносят в мерные колбы емкостью 25 мл и доводят 96%-ным этиловым спиртом до метки, а затем колориметрируют одним из описанных выше способов, применяя соответствующие формулы расчета.

Таблица 8. Шкала для пересчета меди в фруктозу

Фруктоза	Медь	Фруктоза	Медь	Фруктоза	Медь
10	20,2	40	73,1	70	123,8
20	38,1	50	90,3	80	140,2
30	55,7	60	107,2	90	156,3
				100	172,2

Дифференцированное определение фруктозы и глюкозы (по Кольтофу). Иногда необходимо определить не только общее содержание редуцирующих сахаров, но и отдельно количество фруктозы и глюкозы. Количество глюкозы обычно вычисляют по разности между общим количеством редуцирующих сахаров и количеством фруктозы.

Вначале определяют общее количество сахаров по Бертрону или по Офнеру. В отдельной пробе окисляют альдозы иодом в щелочной среде и затем определяют оставшуюся фруктозу по Бертрону¹ или по Офнеру.

Методика опыта. В мерную колбу емкостью 100 мл отмеряют пипеткой Мора 25 или 50 мл гидролизата, приливают пипеткой 5—10 мл 0,5 н. раствора иода в 10%-ном растворе KI (из расчета, чтобы хватило иода для окисления альдоз) и полуторный объем 0,5 н. раствора NaOH . Смесь оставляют на 15 мин при комнатной температуре, по истечении которых она становится слабоокрашенной. Далее смесь подкисляют 5%-ным раствором H_2SO_4 (на 7,5 мл щелочи достаточно 5 мл кислоты). Выделившийся избыток иода² удаляют, прибавляя 10%-ный раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до появления желтой окраски раствора. Затем раствор полностью обесцвечивают, добавляя к нему 1%-ный раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Прибавляют несколько капель метилоранжа и нейтрализуют 4 н. раствором NaOH . Объем жидкости доводят водой до 100 мл. Из полученного раствора берут пробы по 20 мл и определяют сахар по Бертрону и Офнеру. Для вычисления фруктозы по Бертрону пользуются табл. 8.

¹ Трегубов Н. Н., Трегубова М. М. Технохимический контроль крахмало-паточного производства. М., «Пищевая промышленность», 1974, с. 76.

² Если после прибавления H_2SO_4 иод не выделяется, значит его мало. Опыт повторяют, взяв большее количество иода.

Сахароза чрезвычайно широко распространена в растениях (листья, стебли, семена, фрукты, ягоды и т. д.). В сахарном тростнике и в корнеплоде сахарной свеклы сахароза накапливается в больших количествах, и поэтому они являются источником промышленного получения сахарозы (тростниковый и свекловичный сахар). Сахароза играет огромную роль в питании человека.

Обычно сахарозу извлекают из растительных продуктов, экстрагируя ее этиловым спиртом, а далее исследуют полученные спиртовые экстракты тем или иным способом.

Поляриметрический метод определения сахарозы основан на экстрагировании сахара 95—96%-ным этиловым спиртом в аппарате Сокслета с последующим поляриметрическим определением содержания его в спиртовом экстракте.

Методика опыта. На аналитических весах взвешивают по разности весов в гильзу аппарата Сокслета около 26 г исследуемого растительного материала. Экстрагируют 95—96%-ным этиловым спиртом в течение 2—3 ч. По истечении этого срока отбирают из сифона каплю экстракта и проверяют α -нафтолом на наличие сахара. Отрицательная реакция указывает на конец экстракции.

Полученный экстракт количественно (с этиловым спиртом) переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят спиртом до метки. Поляриметр в трубке длиной 200 мм. В поляриметре (сахариметре) отсчитывают непосредственно процент сахара в экстракте.

Химический метод определения сахарозы (по Сокслету). В основе этого метода лежит расщепление сахарозы на глюкозу и фруктозу и восстановление последними ионов Cu^{2+} до Cu^+ в щелочной среде. Данный метод отличается от метода Бертраиа тем, что в нем определенный объем реактива Фелинга титруют непосредственно вытяжкой, содержащей редуцирующий сахар. Индикатором является метиленовая синь, которая к концу титрования восстанавливается сахаром в щелочной среде в бесцветное лейкосоединение. По обесцвечиванию индикатора судят о конце титрования.

Приготовление некоторых реактивов. Раствор CuSO_4 — на аналитических весах взвешивают 34,69 г перекристаллизованного $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и переносят в мерную колбу на 1 л. Соль растворяют в дистиллированной воде и доводят водой до метки. Щелочной раствор сегнетовой соли — на технических весах взвешивают 173 г тартрата калия-натрия и 50 г NaOH , растворяют в 1 л дистиллированной воды. Если раствор мутный, его фильтруют через стеклянную вату или стеклянный фильтр. Вытяжка из растительного материала — при определении сахарозы в водных вытяжках результаты могут быть искажены, так как в вытяжку частично или полностью переходят некоторые высокомолекулярные полисахариды, которые при дальнейшем гидролизе образуют редуцирующие моносахариды. Кроме того, такие вытяжки обычно трудно фильтруются, поэтому вместо водной вытяжки рекомендуют готовить спиртовые. Навеску исследуемого продукта (10—25 г) заливают в колбе горячим 96%-ным этиловым спиртом. Количество спирта вычисляют заранее из расчета, чтобы в колбе концентрация его при экстракции была равна 75—80%. Колбу на 30 мин помещают в водяную баню при 75—80° С. Жидкость декантацией фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу (емкостью 250 мл), твердый остаток снова экстрагируют спиртом два раза по 10—15 мин на горячей водяной бане. Экстракт доводят водой в мерной колбе

до метки. Отбирают 50 мл полученного раствора в коническую колбу емкостью 100 мл, добавляют 5 мл 5%-ного раствора HCl , соединяют колбу с обратным холодильником и помещают в горячую водяную баню (чтобы жидкость в колбе кипела) для гидролиза сахарозы. Через 30 мин колбу охлаждают, содержимое ее тотчас же нейтрализуют щелочью или лучше насыщенным раствором Na_2CO_3 по метилроту до слабокислой реакции. Затем количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл, доводят водой до метки и перемешивают. Если жидкость мутная, ее фильтруют.

Методика опыта. Гидролизат разбавляют водой так, чтобы концентрация сахара в нем равнялась примерно 0,5%, и наливают в бюретку (вытяжка должна быть совершенно прозрачной). В две конические колбы наливают по 10 мл раствора Фелинга № 1 и 2. В одну из них наливают из бюретки 3—5 мл вытяжки, колбу нагревают на сетке до кипения и кипятят точно 2 мин, после чего добавляют 5 капель метиленового синего. Сразу же кипящую жидкость (не снимая с сетки) титруют, добавляя по каплям сахарную вытяжку из бюретки до исчезновения окрашивания. Титровать надо быстро, чтобы общая продолжительность кипячения составляла точно 3 мин. Это титрование считают ориентировочным.

Во вторую колбу приливают сразу почти все количество вытяжки, израсходованной на титрование первой пробы (на 0,2 мл меньше). Раствор из бюретки необходимо приливать хотя и сразу, но не быстро, чтобы обеспечить нормальное стекание вытяжки со стенок бюретки. Если результат второго титрования близок к первому и отличается не более чем на 0,1 мл при общей затрате на титрование одной пробы 8—10 мл, то нет необходимости повторять титрование. Если же разница превышает 0,1 мл, то титруют третью пробу. Встречаются некоторые затруднения при титровании первой пробы. Например, иногда индикатор не дает синего окрашивания, что указывает на избыток вытяжки сахара. Тогда количество вытяжки следует уменьшить. Количество инвертного сахара (в %) вычисляют по формуле

$$x = \frac{v_1 \cdot 0,049 \cdot 100}{av_2g},$$

где v — объем жидкости, полученной после фильтрования спиртовых экстрактов, мл; v_1 — объем, до которого был доведен инвертный сахар, мл; 0,049 — коэффициент пересчета на инвертный сахар, г (т. е. 10 мл раствора Фелинга, приготовленного по Сокслету, соответствует 0,049 г сахара); a — количество раствора инвертного сахара, затраченного на титрование 10 мл раствора Фелинга, мл; v_2 — объем спиртового экстракта, взятый для иверсии с HCl , мл; g — навеска исследуемого растительного материала, г.

Пример расчета. Спиртовая вытяжка из навески сахарной свеклы 10 г разбавлена в мерной колбе до 250 мл (v). Для инвертирования взято 50 мл (v_2). После нейтрализации кислотой этот раствор доведен в мерной колбе до 100 мл (v_1). На титрование параллельных проб с растворами Фелинга пошло 10,35 мл. Для определения содержания инвертного сахара в свекле подставляем полученные данные в формулу:

$$\frac{250 \cdot 100 \cdot 0,049 \cdot 100}{10,35 \cdot 50 \cdot 10} = 23,67 \%$$

Определение углеводов методом хроматографии на бумаге

Метод качественного и количественного хроматографического анализа углеводов на бумаге дает возможность точно определить сахара, содержащиеся в сложной смеси, используя для этого небольшое количество исследуемого материала.

Прежде всего необходимо добиться четкого разделения сахаров на хроматограммах, что достигается подбором сорта хроматографической бумаги, систем растворителей и соответствующих проявителей.

Качественный анализ сахаров методом хроматографии на бумаге (по В. В. Рачинскому и Е. И. Князевой).

Приготовление аммиачного раствора AgNO_3 (готовят перед употреблением). Смешивают в соотношении (1 : 1) 0,1 н. раствор AgNO_3 и 5 н. раствор NH_3 .

Методика опыта. Навеску 3—5 г свежего растительного материала (ячменя, ржи, пшеницы, молодых листьев и т. д.) помещают невысоким рыхлым слоем в фарфоровую чашку и фиксируют паром, для чего чашку помещают в работающий стерилизатор Коха на 20 мин. После этого растительную массу растирают и переносят с 15—20 мл теплой воды в коническую колбу емкостью 50 мл и ставят в водяную баню (для экстракции) при температуре 60—80° С на 30 мин. Полученную разваренную массу фильтруют вначале через стеклянную вату, а затем через стеклянный фильтр № 4, осадок промывают 3—4 мл дистиллированной воды. Фильтрат и промывные воды собирают в мерную колбу емкостью 25 мл и содержимое ее доводят водой до метки. Отбирают пипеткой Мора 10 мл экстракта и выпаривают в небольшой фарфоровой чашке досуха. Сухой остаток растворяют в 1 мл воды. На полоску хроматографической бумаги (длина 55—60 см, ширина 5—6 см), отпустив 5 см от нижнего края, наносят в виде поперечной полосы 0,01 мл полученного концентрата. Пятно высушивают на воздухе и конец бумаги опускают в растворитель (насыщенный водой

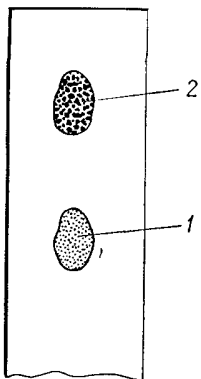


Рис. 34. Хроматограмма, проявленная аммиачным раствором AgNO_3 :
1 — глюкоза;
2 — фруктоза.

фенол). Хроматографическое разделение ведут нисходящим способом. Влажной камерой служит плотно закрывающийся аквариум, в который налито немного воды. После прохождения по бумаге фронта растворителя на расстоянии 400 мм (за 24—30 ч) от места нанесения испытуемого раствора хроматограмму подсушивают в вытяжном шкафу при комнатной температуре, а затем в сушильном шкафу при 70—80° С. Сухую хроматограмму проявляют, опрыскивая ее из стеклянного пульверизатора аммиачным раствором AgNO_3 . После опрыскивания хроматограмму снова сушат в сушильном шкафу при 100—105° С. Через 5 мин бумага приобретает светло-коричневый цвет, а в местах расположения редуцирующих сахаров появляются темно-коричневые пятна (рис. 34). Эта реакция основана на восстановлении серебра редуцирующими сахарами. Для получения более четкой хроматограммы рекомендуют

исходный раствор подвергнуть дополнительно хроматографической очистке. Для этого 10 мл экстракта пропускают через колонку, заполненную катионитом, анионитом или же активированным углем. Таким способом из водной вытяжки удаляются пигменты, белки и другие несахара. Чтобы увеличить четкость получаемых хроматограмм, бумагу следует предварительно промыть фенолом, это предотвратит образование на хроматограммах темных затеков. Кроме аммиачного раствора AgNO_3 , проявляющего на бумаге редуцирующие сахара, хроматограммы обрабатывают и другими проявителями. Резорциновый проявитель готовят перед употреблением, смешивая в соотношении 1 : 1 (по объему) 1%-ный спиртовой раствор резорцина и 2 н. раствор HCl . Нафтоловый проявитель также готовят перед употреблением, смешивая в соотношении 1 : 10 (по объему) 15%-ный спиртовой раствор α -нафтола и 0,1 н. раствор H_2SO_4 . Существует ряд других проявителей, которые применяют в зависимости от группы сахаров в анализируемой смеси. Берут также разные растворители в зависимости от состава анализируемых сахаров. В качестве подвижных растворителей применяют такие смеси: 1) бутанол, уксусная кислота и вода в соотношении 4 : 1 : 5; 2) бутанол, масляная кислота и вода в соотношении 1 : 1 : 1; 3) бутанол, изомасляная кислота и вода в соотношении 1 : 1 : 1. Для идентификации сахара параллельно с исследованием природного материала готовят хроматограммы из смесей сахаров, составленных искусственно: 1) раффиноза — лактоза — ксилоза — арабиноза; 2) раффиноза — сахароза — глюкоза — ксилоза — арабиноза; 3) раффиноза — сахароза — глюкоза — ксилоза — фруктоза.

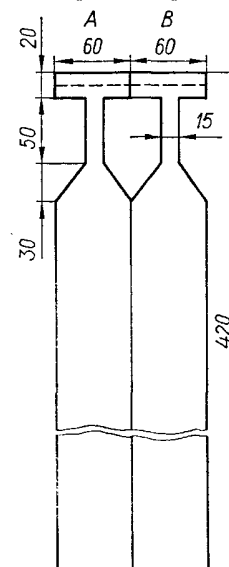


Рис. 35. Форма бумаги, применяемая для хроматографирования сахаров.

Количественное определение углеводов методом нисходящей хроматографии на бумаге (по Г. Н. Зайцевой и Т. П. Афанасьевой).

Приготовление некоторых реактивов. Система подвижных растворителей — бензол — *n*-бутанол — пиридин — вода (1 : 5 : 3 : 3), фенол — бутанол — уксусная кислота — вода (2 : 2 : 1 : 4) — для разделения маннозы, арабинозы и фруктозы.

Хроматографическая бумага «медленная» № 4 ленинградской фабрики им. Вододарского. К бумаге предъявляют особые требования: она не должна быть рыхлой и толстой во избежание попадания в сахарные элюаты волокон, которые мешают определению. Бумагу выкраивают по определенной форме (рис. 35).

Анилинфталатный проявитель — 1,66 г фталиевой кислоты и 0,75 мл свежеперегнанного анилина растворяют в 100 мл водонасыщенного бутанола. Рекомендуют применять свежеприготовленный раствор.

Методика опыта. Вытяжку из растительного сырья (или гидролизат полисахаридов) наносят чертой из микропипетки на полоску бумаги (рис. 35) с таким расчетом, чтобы количество нанесенных сахаров, рассчитанных по редуцирующей способности, составляло не менее

500 мкг. Бумагу подсушивают на воздухе и верхний конец погружают в смесь растворителей: бензол — бутанол — пиридин — вода, помещенную в ванночку, которая укреплена в верхней части влажной камеры. Получают нисходящую хроматограмму. Через 24 ч хроматограмму сушат на воздухе и снова погружают на сутки в ту же смесь подвижных растворителей. Так повторяют трижды. Для разделения маннозы, арабинозы и фруктозы применяют смесь подвижных растворителей: фенол — бутанол — уксусная кислота — вода. Смесь пропускают через хроматограмму трое суток, затем хроматограмму сушат

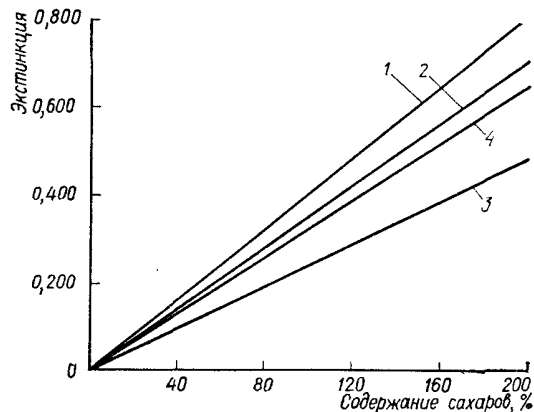


Рис. 36. Стандартные кривые для колориметрирования сахаров при использовании анилинфталата: 1 — арабиноза; 2 — галактоза и манноза; 3 — рамноза; 4 — глюкоза.

на воздухе и снова погружают в смесь растворителей. Повторяют это три раза. После окончания разделения смеси углеводов и высушивания хроматограмм на воздухе полоску А (см. рис. 35) проявляют анилинфталатным проявителем, равномерно опрыскивая ее из стеклянного пульверизатора. Полоску В оставляют непроявленной. Полоску, смоченную проявителем, подсушивают 5—10 мин на воздухе, а затем 30 мин в шкафу при $80 \pm 1^\circ \text{C}$. При этом альдогексозы проявляются в виде коричневых, а альдопентозы в виде красно-бурых пятен.

Пятна сахаров на проявленной полосе А вырезают, помещают в пробирку и элюируют 3 мл (химически чистой!) ледяной уксусной кислотой, которая не должна иметь примесей альдегидов (реакция с анилином). Окрашенные продукты элюируют из полосы А в течение трех суток при комнатной температуре. Интенсивность окрашивания этого элюата измеряют на фотоэлектроколориметре, сравнивая с элюатом бумаги, взятой с неокрашенного участка хроматограммы, однотипно обработанной анилинфталатом (контроль на бумагу). Содержание сахаров рассчитывают по стандартным кривым (рис. 36).

Определение количества сахаров, разделенных на хроматограмме, специфическими методами

Непроявленную хроматограмму В анализируют методами, которые позволяют провести дифференцированное определение количества сахаров.

Элюирование сахаров. Участки размещения сахаров на непроявленной хроматограмме В вырезают соответственно проявленной полосе А и освобождают от следов растворителя, многократно экстрагируя сухим эфиром. После испарения эфира кусочки бумаги помещают в пробирки, заливают дистиллированной водой (около 3 мл) и сахара

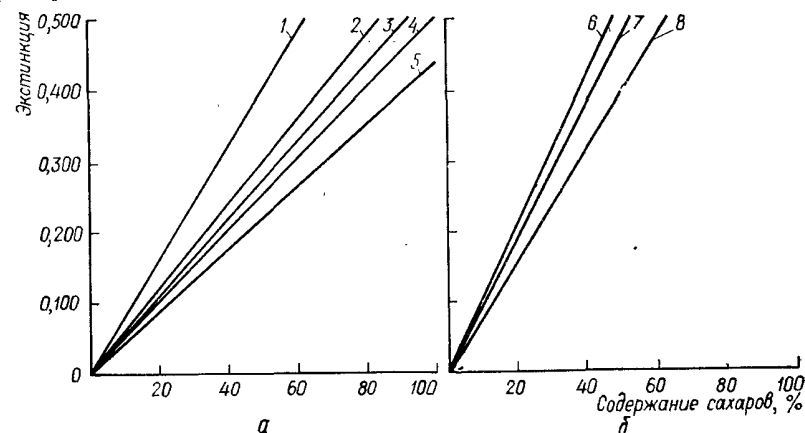


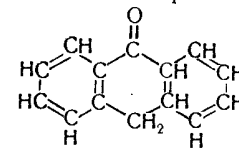
Рис. 37. Стандартные кривые для определения сахаров различными методами:

а — антроновым; б — орциновым; 1 — фруктоза; 2 — галактоза; 3 — глюкоза; 4 — рамноза; 5 — манноза; 6 — арабиноза; 7 — ксилоза; 8 — рибоза.

элюируют в течение 10—12 ч при комнатной температуре. Водные элюаты сахаров тщательно освобождают от волокон бумаги, фильтруя через стеклянные фильтры № 2 (диаметром 10 мм) под вакуумом. Фильтрат собирают непосредственно в градуированные пробирки емкостью 5 мл (внутренний диаметр 5 мм). Для полноты элюирования кусочки бумаги с пятнами сахаров трижды промывают небольшими порциями горячей воды.

Антроновый метод. С помощью антрона в водных растворах определяют галактозу, глюкозу, маннозу, фруктозу, рамнозу и другие сахара.

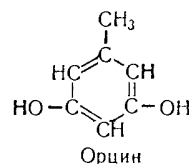
Приготовление антронового реактива — растворяют 100 мг антрона в 100 мл H_2SO_4 ($d = 1,84$). Применяют только свежеприготовленный реактив.



Анtron

Методика опыта. В пробирку вносят по 3 мл антронового реактива, охлажденного во льду, и осторожно по стенке приливают 1 мл водного раствора испытуемого сахара (глюкозу, галактозу и т. д.). Содержимое пробирок быстро перемешивают и помещают в водный термостат. Для каждого сахара соблюдают определенную установленную температуру и продолжительность обработки: глюкоза при 90° С — 16 мин; манноза при 90° С — 15 мин; галактоза при 90° С — 8 мин; рамноза при 70° С — 13 мин; фруктоза при 60° С — 10 мин. При нагревании следят, чтобы в пробирку не попала вода, которая мешает колориметрированию, создавая муть. По окончании нагревания пробирку быстро охлаждают во льду и содержимое колориметрируют, сравнивая с контролем на бумагу. Колориметрирование проводят около 1 ч на фотоэлектроколориметре с красным светофильтром, толщина кювет 0,5 см. Граница определения каждого сахара 10—100 мкг. Количество сахара рассчитывают по определенной для него кривой (рис. 37). Относительная погрешность этого метода составляет ± 5%. Метод требует тщательного соблюдения разработанного режима.

Орциновый метод. Реакция с орцином



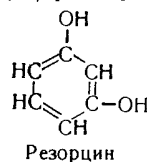
является специфической для обнаружения пентоз: арабинозы, ксилозы, рибозы и рамнозы.

Приготовление реактива орцина. Растворяют 50 мг FeCl₃ в 250 мл HCl марки «х. ч.» (d = 1,19). Перед опытом добавляют реактив орцина из расчета 4,76 мг на 1 мл раствора.

Методика опыта. В длинных градуированных пробирках диаметром 5 мм смешивают 1 мл водного элюата сахара с 1 мл орцинового реактива. Пробирки плотно закрывают пробками, содержимое их перемешивают и нагревают 30 мин в кипящей водяной бане. Охладив пробирку под струей водопроводной воды, их содержимое тотчас колориметрируют в фотоэлектроколориметре, сравнивая с контрольным опытом на бумаге. Толщина кювет 0,5 см. Если концентрация сахара велика, то раствор разбавляют соответственно дистиллированной водой (обычно до 4 мл). Пределы чувствительности реакции для пентоз от 5 до 40 мкг, для метилпентоз — от 15 до 80 мкг в пробе (см. рис. 37). Относительная погрешность метода составляет ± 3%.

Определение кетосахаров (по Кульку).

Реактив на кетозы: раствор А — 0,05%-ный раствор резорцина в 96%-ном спирте; раствор Б — в 1 л HCl (d = 1,18) растворено 0,216 г FeNH₄(SO₄)₂ · 12H₂O.



В пробирку вносят от 1 до 2 мл элюата (в зависимости от содержания сахаров) и доводят дистиллированной водой до 2 мл. Затем добавляют по 3 мл растворов А и Б. Пробирку соединяют с воздушным холодильником и помещают на 40 мин в водяную баню при 80° С. Параллельно ставят контрольный опыт на бумагу с водным элюатом из «пустого» участка непроявленной полосы хроматограммы. По окончании нагревания пробирку охлаждают под струей водопроводной воды. Окраску измеряют на фотоэлектроколориметре в кюветах толщиной 1 см. Содержание фруктозы в исследуемом продукте определяют по градуированной кривой (рис. 38). Чувствительность метода от 5 до 80 мкг в пробе. Погрешность метода составляет ± 1 мкг от содержания кетозы в исследуемом материале.

Фенольный метод позволяет определить все моносахариды (гексозы, пентозы, метилпентозы), обладает большой чувствительностью и не требует дорогостоящих и редких реактивов. Анализ элюатов сахаров проводят с применением фенола и H₂SO₄. Для получения хороших результатов анализа следует брать растворы сахаров, концентрация которых в пределах от 4 до 40 мкг.

Методика опыта. В пробирку вносят 1—2 мл испытуемого раствора сахара (в зависимости от его концентрации). Доводят объем, если это необходимо, дистиллированной водой до 2 мл. Приливают 0,05 мл водного раствора фенола (92 г свежеперегнанного фенола и 8 мл воды) и 5 мл химически чистой концентрированной H₂SO₄ (d = 1,84). Содержимое пробирок перемешивают и дают отстояться в течение 1 ч. Параллельно ставят контрольный опыт «пустых» непроявленных участков хроматограммы В. Количество сахара в пробе определяют в фотоэлектроколориметре с фильтром № 4 (λ = 500 нм) в кюветах с толщиной 1 см. Результат вычисляют по одной из кривых (рис. 38). Для получения достоверных результатов проводят не менее трех параллельных определений. При этом элюаты сахарных пятен необходимо тщательно освободить от волокон бумаги. Погрешность метода ± 5%. Сахара можно анализировать и методом электрофореза на бумаге, в котором используют боратные буферные растворы.

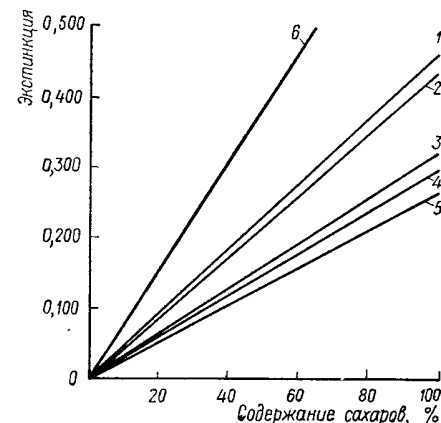


Рис. 38. Стандартные кривые для определения фруктозы по Кульку и для определения сахаров фенольным методом:
1 — манноза; 2 — глюкоза; 3 — фруктоза;
4 — галактоза; 5 — рамноза; 6 — арабиноза.

Полисахариды второго порядка

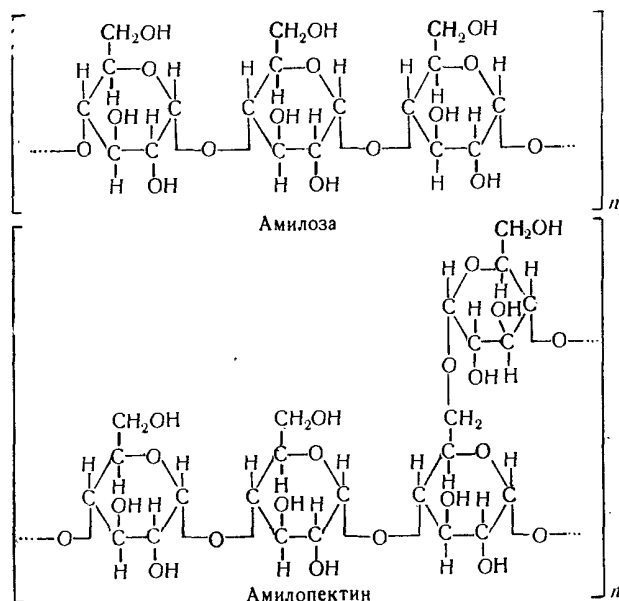
КРАХМАЛ

Крахмал является одним из наиболее распространенных в растительном мире веществ и относится к основным запасным углеводам растений. Он содержится в семенах, клубнях, плодах, вегетативных частях растений, в переходной форме — в зеленых листьях и других растительных органах.

В отдельных частях растений откладывается большое количество крахмала. В зерновых культурах содержание его достигает 70%, в клубнях и корнях — 25—30%.

Крахмал откладывается в виде зерен различной формы и размеров: от 0,002 до 0,15 мм. Наиболее крупными являются зерна картофельного крахмала (рис. 39, а). Относительная плотность крахмала в среднем равна 1,5.

Крахмал состоит из двух полисахаридов: амилозы и амилопектина. В молекуле амилозы остатки α -D-глюкозы связаны гликозидной связью между первым и четвертым углеродными атомами, в амилопектине не только между первым и четвертым углеродными атомами, но и между первым и шестым:



Родственным растительному крахмалу веществом является животный крахмал — гликоген, который содержится в различных тканях и органах животных. Гликогена также много и в некоторых растениях: в зерне сахарной кукурузы, дрожжах и грибах. В настоящее время разработаны методы определения количества крахмала. Их можно разделить на пять групп: методы, основанные на прямом определении

крахмала или на определении веществ, сопутствующих ему, с определением крахмала по разности; химические методы, основанные на гидролизе кислотами или ферментами, а также на комбинированном гидролизе этими реагентами, с определением крахмала в виде глюкозы

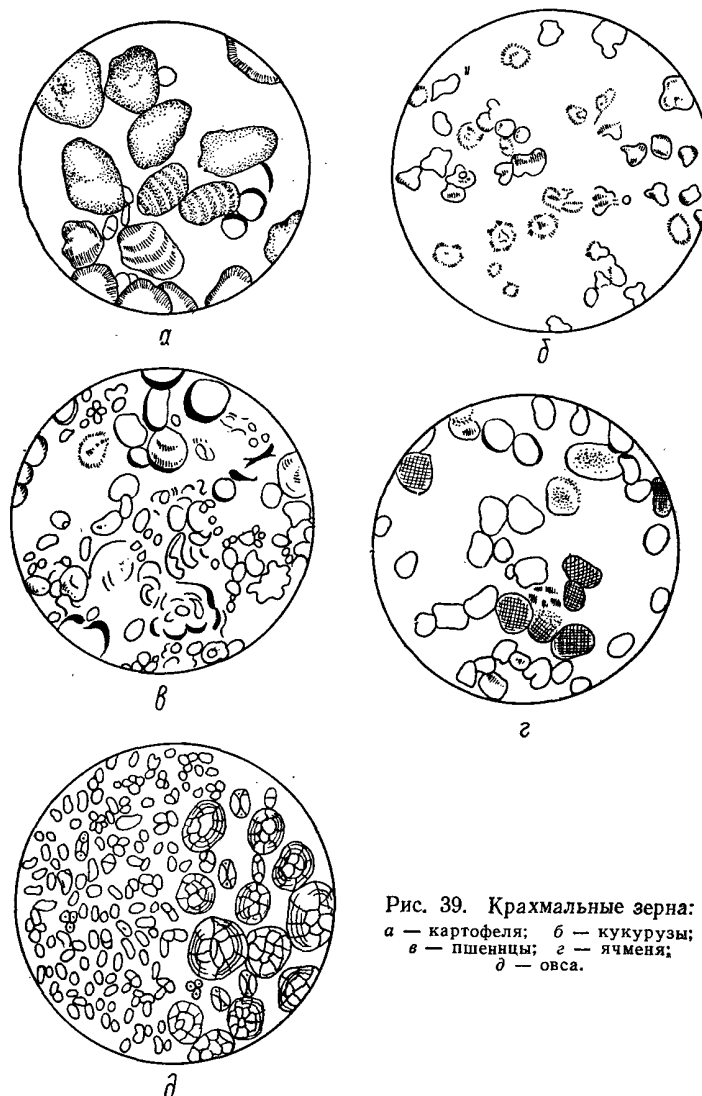


Рис. 39. Крахмальные зерна:
а — картофеля; б — кукурузы;
в — пшеницы; г — ячменя;
д — овса.

или мальтозы редукционными методами; поляриметрические и рефрактометрические методы; методы определения количества крахмала по относительной плотности растворов; биологические методы. Выбор того или иного метода зависит от характера исследуемого растительного продукта.

Определение происхождения растительного крахмала. Происхождение крахмала сравнительно легко можно установить, сравнивая с известными образцами, рисунками или микрофотографиями. Полученный образец крахмала детально изучают под микроскопом при разных увеличениях, зарисовывают и сравнивают с известными образцами (см. рис. 39).

Определение количества крахмала (по Н. И. Проскуракову и А. Н. Кожевниковой). Этот метод пригоден для исследования зерна, муки и других растительных продуктов, богатых крахмалом, но содержащих мало гемицеллюлоз. В основе этого метода лежит растворение крахмала щелочью, осаждение его иодом и спиртом, кислотный гидролиз крахмала и определение глюкозы по одному из редуцирующих методов.

Методика опыта. На аналитических весах взвешивают 1—2 г тонкоизмельченного растительного материала и помещают в колбу Эрленмейера емкостью 50 мл, куда приливают 20 мл 0,7%-ного раствора КОН. Колбу ставят на 1 ч в водяную баню с температурой 90° С, перемешивая смесь несколько раз стеклянной палочкой. После охлаждения содержимое колбы количественно вместе с дистиллированной водой переносят в мерную колбу емкостью 50 мл; вытяжку доводят до метки. Содержимое мерной колбы встряхивают и фильтруют через слой ваты или центрифугируют. Из прозрачного фильтрата или центрифугата отбирают 10 мл в центрифужную пробирку, нейтрализуют 5%-ным раствором CH_3COOH по фенолфталеину и по каплям добавляют 1,5 мл 0,1 н. раствора иода в растворе KI до коричневого окрашивания. Спустя 5 мин приливают 3 мл 25%-ного раствора H_2SO_4 и смесь центрифугируют. Центрифугат осторожно сливают с осадка или осторожно отсасывают с помощью специального приспособления (см. рис. 19). Осадок промывают дважды 10 мл 60%-ного этилового спирта или 2,5%-ным раствором H_2SO_4 . После каждого промывания содержимое колбы центрифугируют, а центрифугат удаляют. Осадок количественно смывают 18 мл дистиллированной воды и переносят в колбу Эрленмейера емкостью 150 мл. Затем добавляют 5 капель 10%-ного раствора Na_2SO_3 и 2 мл 20%-ного раствора HCl. Колбу соединяют с обратным холодильником, охлаждаемым водой, и ведут гидролиз в течение 3 ч на кипящей водяной бане.

Гидролизат нейтрализуют и определяют глюкозу одним из известных методов определения редуцирующих веществ, например иодометрическим.

Иодометрический метод.

Методика опыта. К полученному гидролизату крахмала добавляют 15 мл 0,1 н. раствора иода в растворе KI и через 2—3 мин медленно приливают при энергичном помешивании 25 мл 0,5 н. раствора NaOH до исчезновения окраски иода. Колбу накрывают часовым стеклом и оставляют при комнатной температуре на 20 мин. После этого раствор слабо подкисляют, добавляя по каплям 20%-ный раствор H_2SO_4 до появления интенсивно коричневого окрашивания. Остаток иода титруют 0,1 н. раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, прибавив к концу 0,5 мл 1%-ного раствора крахмала. Параллельно ставят контрольный опыт, в котором

вместо гидролизата приливают воду. Содержание крахмала в продукте (в %) рассчитывают по формуле

$$x = \frac{(a - b) v \cdot 0,009 \cdot 100 \cdot 0,9}{g v_1},$$

где a — количество 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл; b — количество 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, израсходованного на титрование в рабочем опыте, мл; 0,009 — коэффициент пересчета результатов титрования в глюкозу; 0,9 — коэффициент пересчета глюкозы в крахмал; v — объем вытяжки из растительного материала; g — навеска исследуемого материала, г; v_1 — объем фильтрата или центрифугата, взятого для гидролиза.

Пример расчета. Для исследования взята навеска муки 0,2186 г, из которой получено 50 мл вытяжки. Для гидролиза берут 10 мл фильтрата или центрифугата. На титрование в контрольном опыте израсходовано 15,32 мл 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. На титрование в рабочем опыте израсходовано 13,16 мл 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Подставляем полученные данные в формулу:

$$\frac{(15,32 - 13,16) 50 \cdot 0,009 \cdot 100 \cdot 0,9}{10 \cdot 0,2186} = 40,0 \%$$

Существенный недостаток определения количества крахмала методом кислотного гидролиза заключается в том, что наряду с крахмалом частично расщепляются и гемицеллюлозы, вследствие чего искажаются данные об истинном содержании крахмала. Особенно это наблюдается при анализе растительных продуктов, содержащих много гемицеллюлоз. Чтобы избежать этого, был разработан диастатический (ферментативный) метод¹ определения крахмала. Обработка навески растительного материала в определенных условиях диастазом позволяет отделить крахмал от других углеводов. Диастаз, как и другие ферменты, обладает строгой специфичностью и расщепляет только крахмал, переводя его в растворимое состояние. Растворимые продукты ферментативного расщепления крахмала отфильтровывают, отбирают определенное количество прозрачного фильтрата и проводят гидролиз HCl. В гидролизате определяют глюкозу описанными методами. Весьма существенным недостатком ферментативного метода является длительность определения.

Поляриметрический метод определения количества крахмала (по Н. А. Архиповичу). В производстве часто пользуются поляриметрическим методом Эверса, однако по точности он уступает методу Н. А. Архиповича.

Методика опыта. На технокимических весах взвешивают 15 г измельченного зерна или крахмала и количественно с дистиллированной водой переносят в мерную колбу на 200 мл, добавляют 45 мл раствора HCl ($d = 1,19$), что отвечает 10%-ному раствору кислоты. Колбу наполняют приблизительно до 180 мл водой и помещают в кипящую водяную баню на 25 мин для гидролиза крахмала.

¹ Ерм'аков А. Н. и др. Методы биохимических исследований растений. М., Сельхозгиз, 1952, с. 183.

По окончании гидролиза колбу быстро охлаждают под краном до 20° С, затем заполняют водой до метки, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр.

Полученный фильтрат осветляют 0,3 г сухой фосфорновольфрамовой кислоты и 0,25 г активированного угля в течение 5 мин. Осветленный фильтрат снова фильтруют и поляризуют в 400-миллиметровой трубке.

Количество крахмала (в %) определяют по формуле

$$K = \frac{0,2896P \cdot 100}{g} \cdot P,$$

где 0,2896 — коэффициент перевода на нормальную навеску¹; P — показатель сахариметра; g — навеска, г.

При определении вносят поправку на влияние растворимых углеводов. Навеску — около 15 г — переносят водой в мерную колбу на 200 мл, добавляют 19 мл 1 н. раствора HCl для инактивации амилотических ферментов и доводят дистиллированной водой до объема 180—190 мл.

Содержимое колбы 20 мин перемешивают при 20° С, затем доводят водой до метки, снова перемешивают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр.

Из полученного фильтрата в мерную колбу на 200 мл отбирают 100 мл и добавляют 45 мл HCl ($d = 1,19$), смесь доводят водой примерно до 180 мл. Колбу помещают на 25 мин в кипящую водяную баню. По истечении этого времени гидролизат охлаждают и при 20° С содержимое колбы осветляют, добавляя 0,2—0,3 г сухой фосфорновольфрамовой кислоты и такое же количество активированного угля, доводят водой до метки, перемешивают, фильтруют и поляризуют в 400-миллиметровой трубке.

Результат пересчитывают на навеску пробы, взятой при определении прямой поляризации, по формуле

$$P_1 = \frac{2P_0g}{g_1},$$

где P_0 — показания сахариметра при последней поляризации; g — навеска при определении прямой поляризации, г; g_1 — навеска при определении поправки на растворимые вещества, г; 2 — коэффициент, учитывающий разбавление пробы.

ИНУЛИН

Инулин — полисахарид, образующий при гидролизе β -D-фруктозу. Он хорошо растворяется в горячей воде и осаждается из водных растворов спиртом. Большое количество инулина содержится в клубнях земляной груши и георгина, незначительные количества есть в корнях и листьях многих растений семейства сложноцветных. В этих растениях инулин заменяет крахмал. Фруктозные остатки в инулине

¹ Нормальной навеской, принятой в СССР, называется навеска чистой сахарозы, растворенной в 100 мл, для трубки длиной 200 мм при 20° С. Поляриметр при этих условиях должен показывать 100 делений его линейной шкалы.

связаны по первому и второму углеродным атомам. Инулин расщепляется до фруктозы ферментом инулазой (инулиназой).

Определение количества инулина.

Методика опыта. В колбу Эрленмейера емкостью 250 мл насыпают 5 г мелко измельченного, воздушно-сухого растительного продукта. Из взятой навески предварительно извлекают сахара описанным выше способом (см. стр. 154), после чего приливают 200 мл воды. Смесь нагревают 2 ч в бурно кипящей водяной бане (колба должна быть погружена в кипящую воду). Остывший экстракт количественно переносят в мерную колбу емкостью 250 мл, доводят водой до метки, хорошо перемешивают и фильтруют. Отбирают 100 мл фильтрата в отдельную колбу, туда же добавляют 5 мл 10%-ного раствора HCl (из расчета содержания ее 0,5%). Колбу соединяют с обратным холодильником и нагревают в горячей водяной бане в течение 1 ч. По окончании гидролиза смесь охлаждают и тотчас же нейтрализуют 10%-ным раствором щелочи до слабокислой реакции ($pH = 4,5$). Нейтрализованную смесь количественно переносят в мерную колбу емкостью 200 мл, осаждают коллоидные вещества $Pb(CH_3COO)_2$ и доводят водой до метки. Содержимое мерной колбы перемешивают и фильтруют. Отбирают определенную часть фильтрата и определяют сахар по Кольгофу (см. стр. 153), для чего берут пробы по 20 или 10 мл. Содержание (x) инулина (в %) в исследуемом материале вычисляют по формуле

$$x = \frac{w_2 a \cdot 100 \cdot 0,9}{g v_1 v_3},$$

где v — первоначальный объем экстракта, мл; v_2 — объем гидролизата после осаждения коллоидных веществ $Pb(CH_3COOH)_2$, мл; a — количество сахара, найденное в отобранной пробе гидролизата, г; 0,9 — коэффициент пересчета фруктозы в инулин; g — навеска исследуемого вещества, г; v_1 — объем экстракта, отобранного для солянокислого гидролиза, мл; v_3 — объем пробы, отобранной для определения сахара, мл.

Пример расчета. Из навески исследуемого образца 5,15 г получено 250 мл вытяжки v . Из вытяжки отобрано 100 мл v_1 , проведен гидролиз; гидролизат после всех операций доведен до объема 200 мл v_2 . Из 200 мл отобрано 20 мл v_3 фильтрата, в которых определено 0,035 г сахара. Для определения количества инулина (в%) в исследуемом образце полученные данные анализа подставляем в формулу:

$$\frac{250 \cdot 200 \cdot 0,035 \cdot 100 \cdot 0,9}{5,12 \cdot 100 \cdot 20} = 15,38 \%$$

В спиртовой вытяжке параллельно (при необходимости) определяют сахар. Из отдельной пробы растительного материала получают водную вытяжку, проводят кислотный гидролиз описанным способом и определяют количество сахара. Разность между суммарным количеством сахара и сахара в спиртовой вытяжке составляет сахар, полученный из инулина.

ГЕМИЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Гемицеллюлозы — это большая группа высокомолекулярных полисахаридов, входящих в состав клеточных стенок. Содержатся они в соломе, кукурузных кочерыжках, семенах и др. Гемицеллюлозы

не растворимы в воде, но растворимы в щелочных растворах, гидролизуются кислотами легче, чем целлюлозы, и труднее, чем крахмал. При гидролизе гемицеллюлозы образуют маннозу, галактозу, арабинозу и ксилозу. По продуктам гидролиза гемицеллюлозы делят на гексозаны (маннаны и галактаны) и пентозаны (арабаны и ксиланы).

Приготовление некоторых реактивов. 2%-ный раствор HCl: в мерной колбе емкостью 1 л 54 мл HCl ($d = 1,19$) доводят дистиллированной водой до метки.

Раствор $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ —25 г $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 100 мл воды.

Методика опыта. В колбу емкостью 1 л насыпают 25 г измельченного растительного материала, взвешенного на теххимических весах и приливают 500 мл горячей дистиллированной воды. Смесь нагревают 1 ч на кипящей водяной бане. По окончании нагревания вытяжку декантируют через фильтр в мерную колбу, а твердую часть заливают новой порцией горячей воды и снова экстрагируют 30 мин на кипящей бане. Фильтраты соединяют и, если необходимо, определяют в них сахар после дополнительного гидролиза кислотой. Твердый остаток количественно переносят обратно в колбу при помощи 2%-ного раствора HCl и объем этим же раствором доводят до 150 мл. Колбу соединяют с обратным холодильником и помещают на 3 ч в бурно кипящую водяную баню. Затем гидролизат осторожно декантируют на фильтр, стараясь не переносить осадка из колбы.

К оставшемуся твердому осадку приливают еще 75 мл 2%-ного раствора HCl и колбу помещают на кипящую баню на 1 ч. Смесь фильтруют и гидролизаты смешивают в мерной колбе емкостью 250 мл, нейтрализуют щелочью до слабокислой реакции (по метиловому красному), примеси осаждают $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ и избыток его удаляют Na_3PO_4 или Na_2SO_4 . Жидкость отфильтровывают и в фильтрате определяют сахар одним из методов (по Бертрану, Сокслету или др.).

Определение количества пентозанов. Ксилоза и арабиноза редко встречаются в растениях в свободном состоянии, они обычно входят в состав высокомолекулярных полисахаридов — пентозанов, которые широко распространены в природе и, как указывалось, входят в состав гемицеллюлоз. Эти полисахариды составляют основу ржаного теста, которое почти на 90% состоит из пентозанов. Слизи ржаного теста растворимы в воде и обладают высокой гидрофильностью, они влияют на физические свойства теста, уменьшая разжижение его при брожении. Эти свойства слизей связаны с набухающей способностью пентозанов.

Метод количественного определения пентозанов основан на гидролизе их кислотой и превращении образующихся при этом пентоз в фурфурол, который отгоняют и определяют весовым, объемным или колориметрическим способом.

Приготовление 0,1 н. раствора NaBr и NaBrO₃: 2,515 г NaBrO₃ и 11,577 г NaBr помещают в мерную колбу емкостью 1 л, растворяют в воде и доводят водой до метки.

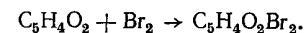
Методика опыта. В круглодонную колбу емкостью 250—500 мл вносят 5 г воздушно-сухого растительного продукта. Колбу соединя-

ют каучуковой пробкой с капельной воронкой, а отводную трубку — с холодильником. Приемником служит мерный цилиндр емкостью 100 мл (рис. 40).

Через капельную воронку 1 в колбу наливают 100 мл 12%-ного раствора HCl и содержимое нагревают при 160° С на песчаной или масляной бане 2. Для измерения температуры в бане устанавливают термометр 3. Отгоняемую жидкость собирают в цилиндр 4. После отгона первых 30 мл дистиллята через капельную воронку, добавляют еще

30 мл 12%-ного раствора HCl. Кислоту следует прибавлять не сразу, а небольшими порциями, чтобы жидкость в колбе не переставала кипеть. После отгона 30 мл дистиллята вновь прибавляют 30 мл раствора кислоты. За 10 мин должно отгоняться около 30 мл дистиллята. Кислоту прибавляют до тех пор, пока капля дистиллята не перестанет окрашивать бумажку, смоченную уксуснокислым анилином в малиново-красный цвет. Общий объем дистиллята должен составлять около 360 мл. Дистиллят в мерной колбе на 500 мл доводят водой до метки. Для получения правильных результатов необходимо соблюдать одни и те же условия отгонки.

Фурфурол определяют объемным методом. В 4 колбы Эрленмейера (емкостью 500 мл) с пришлифованными пробками отмеряют пипеткой Мора по 25 мл 0,1 н. раствора NaBr и NaBrO₃. В две колбы приливают по 200 мл дистиллята фурфурола. В другие две контрольные колбы приливают по 200 мл 12%-ного раствора HCl (для определения титра бромид-бромата). Колбы закрывают и выдерживают 1 ч в темном месте. В это время фурфурол присоединяет бром по уравнению



Затем в колбы добавляют по 10 мл 10%-ного раствора KI и титруют избыток иода 0,1 н. раствором Na₂S₂O₃. Количество пентозанов (в %) вычисляют по формуле

$$x = \frac{(a - b) \cdot 0,0024v \cdot 1,88 \cdot 100}{v_1 g},$$

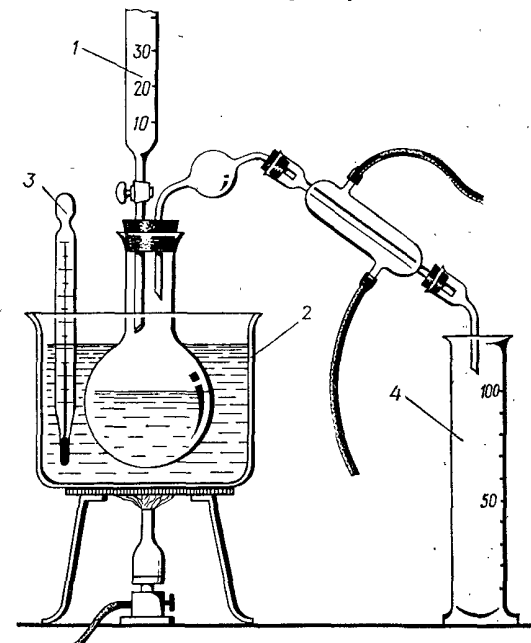


Рис. 40. Прибор для определения пентозанов.

где a — количество 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, затраченного на титрование в контрольных опытах, мл; b — количество 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, затраченного на титрование в рабочих опытах, мл; 0,0024 — коэффициент пересчета результатов титрования на фурфурол (молекулярная масса фурфурола 96, эквивалент $96 : 4 = 24$, 1 мл 0,1 н. раствора эквивалентен 0,0024 г фурфурола); v — объем всего дистиллята; 1,88 — коэффициент пересчета фурфурола в пентозаны; v_1 — объем дистиллята, взятый для титрования; g — навеска исследуемого материала, г.

Пример расчета. Для определения пентозанов брали навеску растительного материала, равную 4,67 г. На титрование в контрольном опыте затрачено 24,68 мл 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, а в рабочем — 9,85 мл. Объем всего дистиллята составлял 500 мл. На титрование было взято 200 мл дистиллята. Для определения пентозанов подставляем полученные данные в формулу:

$$\frac{(24,68 - 9,85) \cdot 0,0024 \cdot 500 \cdot 1,88 \cdot 100}{200 \cdot 4,67} = 3,47 \%$$

Кроме описанного метода, сравнительно простого и точного, известны и другие методы определения пентозанов по фурфуролу. Колориметрический метод определения фурфурола основан на его свойстве окрашиваться в присутствии солей анилина. В основу весового метода положена реакция фурфурола с флороглюцином. Осадок фурфуроглюцина, образовавшийся в результате реакции, отфильтровывают, промывают холодной водой и сушат до постоянной массы при температуре 97—100° С. По количеству фурфуроглюцина вычисляют содержание фурфурола и пентозанов в исследуемом веществе.

Получение L-арабинозы и определение ее констант. Для приготовления L-арабинозы берут 100 г очищенного от загрязнений вишневого клея. Гидролиз ведут с 700 мл 4%-ного раствора H_2SO_4 . Смесь нагревают при постоянном помешивании на сильно нагретой водяной бане до растворения клея, затем колбу соединяют с обратным холодильником и ведут гидролиз в кипящей водяной бане в течение 5—6 ч. Горячий гидролизат выливают в большую фарфоровую чашку, а избыток кислоты постепенно нейтрализуют 30—33 г чистого CaCO_3 . После нейтрализации массу фильтруют на воронке Бюхнера с отсасыванием. Осадок промывают теплой водой. Гидролизат, кроме L-арабинозы, содержит галактозу и глюкозу, от которых его очищают путем их сбраживания, для чего к фильтрату добавляют 5—10 г прессованных дрожжей. Колбу закрывают каучуковой пробкой с гидравлическим затвором и ставят в термостат при 30° С на 3—4 дня до окончания брожения. Затем жидкость отфильтровывают, а фильтрат упаривают до сиропа и охлаждают. При слабом подогревании к сиропу приливают небольшими порциями 96%-ный этиловый спирт, примерно в двухкратном количестве. Жидкости дают отстояться до полного осветления, а затем декантируют. Декантат сгущают в вакууме до сиропа, прибавляют снова спирт, декантируют, упаривают и так до полного прекращения выпадения осадка при прибавлении спирта к сиропу. Из очищенного сиропа после прибавления затравки (несколько кристалликов арабинозы) начинает выкристаллизовываться арабиноза. Кристаллы отсасывают на воронке Бюхнера, промывают спиртом и перекристал-

лизуют из 50%-ного этилового спирта. Из маточного раствора, полученного после промывания кристаллов спирта, можно дополнительно получить еще немного арабинозы. Очистка кристаллов значительно улучшается, если их спиртовые растворы прокипятить с животным углем. Чистоту полученного препарата проверяют, определяя его температуру плавления ($t_{\text{пл}} = 160^\circ \text{C}$). Удельное вращение плоскости поляризации водных растворов после окончания мутаротации $+104,5^\circ$. Выход арабинозы составляет 10—15 г.

Получение ксилозы и определение ее констант.

Методика опыта. 100 г мелконарезанной соломы обрабатывают 1 л 2%-ного раствора NH_3 в течение 48 ч, время от времени перемешивая. Во время этой обработки солома очищается от веществ (в особенности от белков), мешающих выделению ксилозы. Обработанную солому отжимают, смешивают с 1 л дистиллированной воды, снова отжимают и так повторяют два раза. Затем солому хорошо отсасывают на воронке Бюхнера, уплотняя ее пестиком или плоской стороной стеклянной пробки. Солому из воронки переносят в колбу емкостью 2 л и заливают 1 л 4%-ного раствора H_2SO_4 . Колбу соединяют с обратным холодильником и смесь кипятят 4 ч на сетке. Жидкость фильтруют через стеклянный фильтр с отсасыванием и выливают в большую фарфоровую чашку. H_2SO_4 удаляют, нейтрализуя ее CaCO_3 или BaCO_3 . Осадок отфильтровывают на воронке Бюхнера с отсасыванием, фильтрат упаривают в вакууме до консистенции сиропа.

Сироп обрабатывают двумя объемами 96%-ного этилового спирта при нагревании на водяной бане. Ксилоза переходит в раствор, а в осадке остаются смолообразные продукты. После отстаивания осадка спиртовой раствор ксилозы декантируют на фильтр и фильтрат снова упаривают в вакууме до сиропа. Сироп еще раз обрабатывают двойным объемом спирта и отфильтровывают от осадка.

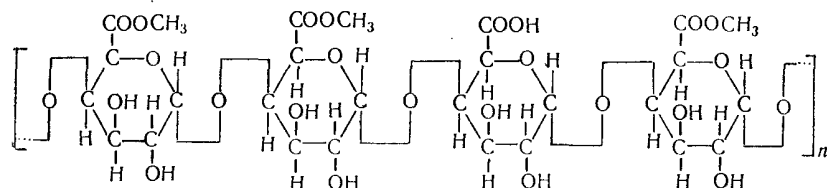
Фильтрат выпаривают до небольшого объема, сливают в кристаллизатор, вводят несколько кристалликов ксилозы и помещают в вакуум-эксикатор. После некоторого стояния выпадают кристаллы ксилозы, которые отсасывают, растворяют в небольшом количестве горячего 70%-ного этилового спирта, сгущают до небольшого объема, вторично вводят кристаллы ксилозы и ставят в вакуум-эксикатор. Выделившиеся кристаллы отсасывают. Маточный раствор сгущают наполовину и из него добавочно извлекают кристаллы ксилозы. Чистоту ксилозы проверяют по температуре плавления, которая равна 144° С. Удельное вращение плоскости поляризации водных растворов после окончания мутаротации $+18,8^\circ$. Ксилоза образует характерный озон в виде длинных красивых игл с температурой плавления 163° С.

Пектиновые вещества

Эти высокомолекулярные соединения углеводной природы широко распространены в растениях. Молекулярная масса пектиновых веществ от 50 000 до 300 000. Они входят в состав клеточных стенок, склеивают растительные клетки между собой, накапливаются в фруктах, ягодах, клубнях, корнеплодах и стеблях растений.

В основе химической структуры пектиновых веществ лежит высокомолекулярная полигалактуроновая кислота, которая состоит из остатков галактуроновой кислоты, связанных кислородным мостиком по первому и четвертому углеродным атомам. В растениях пектиновые вещества содержатся в виде протопектина, химическая природа которого еще недостаточно изучена. Полагают, что пектин связан с арабинозой клеточной стенки, с целлюлозой и с ионами металлов. Арабиноза сопутствует протопектину, связываясь с его молекулой водородными связями. Нерастворимый протопектин переходит в растворимый под влиянием разбавленных кислот или фермента протопектиназы.

Растворимый пектин представляет собой примерно на 70% этерифицированную метиловым спиртом полигалактуроновою кислоту следующего строения:



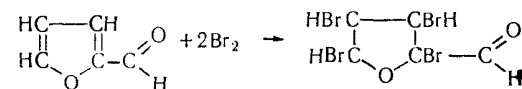
Как видно из приведенной схемы, на два этерифицированных остатка галактуроновой кислоты приходится одна неэтерифицированная карбоксильная группа.

Растворимый пектин расщепляется разбавленными щелочами или при каталитическом воздействии фермента пектинэстеразы (пектазы). В результате гидролиза отщепляется метиловый спирт и пектиновая (полигалактуроновая) кислота. Пектиновая кислота расщепляется ферментом полигалактуроназой, в результате гидролиза которой образуется галактуроновая кислота. Пектиновая кислота не образует с сахаром студня, подобно растворимому пектину. В промышленных условиях стремятся предотвратить щелочной или ферментативный гидролиз пектина, так как это снижает его желирующую способность, которая используется в кондитерском производстве для приготовления желе, джема, мармелада, пастилы и других изделий. Из плесневых грибов в производственных условиях получают ферментные препараты, расщепляющие пектиновые вещества. Эти препараты используют для превращения пектиновых веществ в растворимое состояние с целью осветления фруктовых соков, плодовых и виноградных вин. Содержание большого количества пектиновых веществ в этих напитках затрудняет фильтрование и является одной из причин непрозрачности. Пектиновая, или галактуроновая, кислота легко дает соли (пектаты), которые осаждают из раствора.

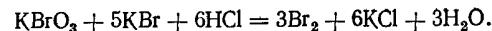
Определение количества пектиновых веществ. Методы количественного определения пектина основаны на косвенных определениях веществ, образующихся после гидролиза растворимого пектина. Гидролиз пектиновых веществ проводят обработкой HCl до получения фурфурола или же щелочью после суточной экстракции растворимого пектина водой при 85° С.

Одним из методов определения количества пектина является осаждение пектиновой кислоты в виде пектата кальция и определение его весовым методом.

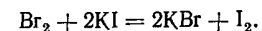
И. М. Литвак разработал более простой объемный броматный метод определения пектиновых веществ, основанный на образовании фурфурола. При анализе применяют метод солянокислотной дистилляции по Толленсу. При нагревании с кислотой полигалактуроновая кислота превращается в галактуроновою, которая далее декарбоксилируется и превращается в арабинозу. Арабиноза под влиянием кислоты теряет три молекулы воды и превращается в фурфурол. Реакция фурфурола с бромом протекает по уравнению



Количество фурфурола определяют по количеству брома, затраченного на реакцию. В качестве источника брома берут раствор KBrO₃ и KBr, который в кислой среде (добавляют HCl) выделяет бром по уравнению



Остаток брома после реакции с фурфуролом определяют иодометрически:



Выделившийся иод титруют 0,1 н. раствором Na₂S₂O₃.

Объемный метод определения количества пектиновых веществ.

Методика опыта. Навеску исследуемого продукта 5—10 г, взвешенную на аналитических весах, переносят в круглодонную колбу емкостью около 300 мл, соединенную с делительной воронкой, которая имеет метку на 30 мл и холодильник Либиха. В колбу наливают 100 мл 12%-ного раствора HCl и ведут перегонку (см. рис. 40). Приемником служит мерный цилиндр. После того, как в приемнике соберется 30 мл жидкости, в колбу добавляют делительной воронкой 30 мл 12%-ного раствора HCl. Кислоту следует добавлять медленно, чтобы кипение не прекращалось. Таким способом отгонку ведут дальше: взамен 30 мл отогнанной жидкости добавляют 30 мл 12%-ного раствора HCl. За 10 мин должно отгоняться 30 мл дистиллята. Кислоту прибавляют до тех пор, пока капля дистиллята не перестанет окрашивать бумажку, смоченную уксуснокислым анилином в малиново-красный цвет. Дистиллят переносят в мерную колбу объемом 250 мл и в конце перегонки содержимое мерной колбы доводят 12%-ным раствором HCl до метки.

Чтобы удалить оксиметилфурфурол, который может образоваться и тем самым исказить результаты определения, проводят двойную перегонку. Однако для получения относительно сравнимых результатов можно ограничиться одной перегонкой.

Для бромирования отбирают в колбу Эрленмейера 100 мл дистиллята и параллельно в такую же колбу, в качестве контроля, отбирают 100 мл 12%-ного раствора HCl. В обе колбы прибавляют по 25 мл 0,1 н. раствора NaBr и NaBrO₃. Колбы помещают в темное место на

1 ч, в течение которого выделившийся бром в солянокислой среде реагирует с фурфуролом. По истечении 1 ч в обе колбы добавляют по 10 мл 10%-ного раствора KI и титруют 0,1 н. раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Разность между результатами титрования в контрольном опыте и с фурфуролом равна количеству (в мл) 0,1 н. раствора NaBr и NaBrO_3 , затраченного на реакцию с фурфуролом.

1 мл раствора NaBr и NaBrO_3 соответствует 0,0024 г фурфуrolа, 0,0041 г пентозанов или $0,0024 \cdot 3,7$ пектиновых веществ.

Количество фурфуrolа, пентозанов или пектиновых веществ (в %) вычисляют по формуле

$$x = \frac{(a - b) K \cdot 100 \cdot v}{gv_1},$$

где x — количество фурфуrolа, пентозанов или пектиновых веществ, %; $(a - b)$ — разность объемов 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, израсходованных на титрование в контрольном и рабочем опытах; K — коэффициент пересчета в фурфуrol (0,0024), пентозаны (0,0041) или в пектиновые вещества ($0,0024 \cdot 3,7$); v — объем полученного дистиллята для определения фурфуrolа, мл; g — навеска исследуемого продукта; v_1 — объем отгона, взятого для определения количества фурфуrolа, мл.

Пример расчета. Из навески исследуемого продукта (g) 6,3756 г получено дистиллята (v) 250 мл. Для определения взято (v_1) 100 мл дистиллята. Разность $a - b$ составила 9,75 мл.

$$x_{\text{ф}} = \frac{9,75 \cdot 0,0024 \cdot 250 \cdot 100}{6,3756 \cdot 100} = 0,92\%.$$

Меняя коэффициент пересчета, так же вычисляют количество пентозанов, или пектиновых веществ.

Определение пектина проводят еще по количеству CO_2 , отщепляемого от галактуроновой кислоты при воздействии на нее 12%-ного раствора HCl. При нагревании с соляной кислотой уроновые кислоты разлагаются на фурфуrol и CO_2 .

Уроновые кислоты еще определяют колориметрическим методом. В основу этого метода положена реакция с карбозолом, в результате которой образуется соединение фиолетово-розового цвета. Колориметрический метод дает возможность определить небольшие количества уроновых кислот. Но применение его ограничено, так как хорошие результаты получаются с относительно чистыми растительными материалами, например с полиуранидами, полисахаридами и др. Кроме этих методов, пектиновые вещества можно определить по степени метоксилирования пектиновой кислоты.¹

Клетчатка (целлюлоза)

По своему распространению в растениях клетчатка занимает первое место среди всех органических веществ. Высокомолекулярный полисахарид, нерастворимый в воде, состоит из остатков β -D-глюкозы, свя-

занной гликозидной связью по первому и четвертому углеродным атомам. При кипячении с концентрированной H_2SO_4 клетчатка полностью расщепляется на глюкозу. При слабом гидролизе клетчатка расщепляется на дисахарид целлобиозу. Целлюлоза гидролизуется до целлобиозы также ферментом целлюлазой, которая содержится в проросшем зерне, в некоторых бактериях и плесневых грибах. Особенно активную целлюлазу имеют грибы, развивающиеся на древесине, а поэтому они являются ее опасными вредителями.

Весьма активная целлюлаза также содержится в бактериях, живущих в желудке жвачных животных, которые гидролизуют клетчатку. Таким образом, благодаря этим бактериям травоядные животные могут усваивать клетчатку. В отдельных растениях содержится большое количество целлюлозы, так, в древесине ее более 50%, в волокнах хлопка более 90%, в оболочке зерна свыше 50%, а в питательной части зерна менее 1%.

Определение клетчатки (по А. И. Ермаковой). Метод основан на окислении и растворении различных веществ, сопутствующих клетчатке, при обработке ее HNO_3 в этиловом спирте и водном растворе щелочи. Метод простой, быстрый и достаточно точный.

Методика опыта. В колбу емкостью 200—300 мл помещают по 1—3 г измельченного растительного продукта. Величину навески изменяют в зависимости от содержания в исследуемом материале целлюлозы. Если в растительном продукте клетчатки 10—20%, то навеску берут от 1,5 до 2 г, 40—50% — от 1 до 1,3 г, меньше 10% — от 2,5 до 3 г. К навеске добавляют 50 мл смеси спирта и азотной кислоты (в соотношении 4 : 1). Колбу с помощью резиновой пробки соединяют с обратным холодильником и помещают на кипящую водяную баню на 1 ч. Колбу в воду не погружают, кипение должно быть равномерным. По окончании нагревания осадку дают осесть, раствор декантируют на стеклянный фильтр, на поверхность которого насыпают 1—2 мм мелко-толченого стекла и отсасывают. Фильтр вместе со стеклом перед фильтрованием предварительно подсушивают. Жидкость декантируют очень осторожно, чтобы не взмутить осадка. К осадку, оставшемуся в колбе, прибавляют еще 50 мл смеси спирта с кислотой и снова нагревают 30 мин. После вторичной декантации через тот же стеклянный фильтр осадок в колбе промывают маленькими порциями 96%-ного этилового спирта. Затем к промытому осадку в колбе прибавляют 50 мл 1,25%-ного раствора щелочи и смесь нагревают на плитке. Щелочной раствор с осадком переносят на стеклянный фильтр, отсасывают и промывают два раза по 10—15 мл дистиллированной водой и 1—2 раза 96%-ным этиловым спиртом. Стеклянный фильтр с чистой белой клетчаткой сушат до постоянной массы при 105°C (обычно в течение 2 ч). Для ускорения сушки осадок после промывания спиртом следует промыть еще серным эфиром. Количество клетчатки рассчитывают (в %) по разности между массой фильтра с осадком целлюлозы и массой сухого фильтра с тертым стеклом.

Примечание. Фильтровать растворы следует горячими, иначе они становятся очень вязкими. При замедлении фильтрования надо перемешивать стекло на фильтре, что снимает с фильтровальной пластинки труднопроницаемый слой. Для предотвра-

¹ Сапожникова Е. В. Пектиновые вещества плодов. М., «Наука», 1965, с. 31.

щения просасывания воздуха через осадок на фильтре всегда должен быть слой жидкости. Как только вся жидкость прошла, отсасывание тотчас же прекращают. С целью наиболее полного удаления лигнина при обработке навески исследуемого материала к HNO_3 добавляют 80% -ный раствор уксусной и кристаллической трихлоруксусной кислоты.

Лигнин

В древесине (лигнин от лат. lignum — дерево) в зависимости от породы дерева содержится от 20 до 35% лигнина. Он находится вместе с целлюлозой в оболочках клеток растений.

Лигнин не является однородным химическим веществом определенного состава. Препараты, выделенные из различных растений,

отличаются по химическому составу, но в своей основе все лигнины содержат ароматические ядра. Так, при обработке кочерыжек и стеблей кукурузы получают смесь различных ароматических соединений — пирокатехина, гваякола и др.

В структуре лигнина есть метоксильные ($-\text{OCH}_3$), диоксиметиленовые ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$), гидроксильные, ацетильные и карбонильные группировки. Лигнин является отходом, который получают при переработке клетчатки в глюкозу. В настоящее время в связи с развитием промышленности проблема рационального использования лигнина имеет большое народнохозяйственное значение. Количество лигнина, получаемое при гидролизе целлюлозы, почти вдвое превышает количество продуктов гидролиза целлюлозы.

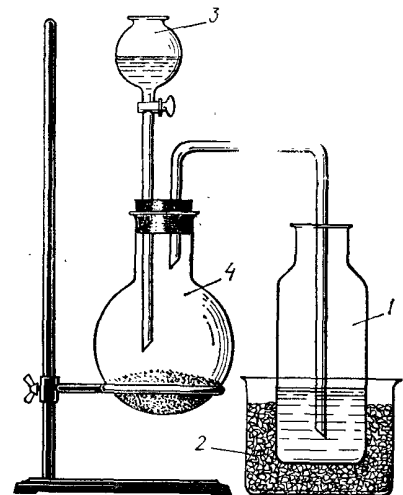


Рис. 41. Прибор для получения насыщенной соляной кислоты:

1 — сосуд с соляной кислотой; 2 — баня со льдом; 3 — капельная воронка с серной кислотой; 4 — колба с сухим хлоридом натрия.

Лигнин определяют при помощи характерных для него цветных реакций с фенолами или с ароматическими аминами в присутствии соляной кислоты. Количество лигнина обычно определяют, удалив целлюлозу и гемицеллюлозу с помощью концентрированных H_2SO_4 или HCl . Другие методы определения лигнина построены на учете количества метоксильных групп, содержащихся в исследуемом материале.

Определение лигнина (по Вильштеттеру и Цехмейстеру). Этот метод заключается в гидролизе клетчатки соляной кислотой, насыщенной хлороводородом ($d = 1,20 \div 1,21$) при комнатной температуре. После гидролиза определяют массу оставшегося лигнина.

Приготовление насыщенной хлороводородом соляной кислоты ($d = 1,20 - 1,21$). Соляную кислоту ($d = 1,19$) насыщают на холоду сухим хлороводородом, который получают при действии концентрированной серной кислоты на сухую NaCl . Работу проводят в установке (рис. 41), помещенной в вытяжной шкаф. Насыщенная

соляная кислота ($d = 1,20 \div 1,21$) содержит 41—42% HCl . Хранят кислоту в холодном месте, в склянке с притертой пробкой и с притертым стеклянным колпачком.

Методика опыта. На аналитических весах взвешивают 3 г мелкоизмельченного растительного материала, просеянного через сито диаметром 1 мм и высушенного до постоянной массы (при 100°C). Навеску помещают в аппарат Сокслета и экстрагируют серным эфиром для удаления смол, воска и жиров. Обезжиренную навеску переносят в мерную колбу емкостью 200 мл с притертой пробкой и приливают туда 100 мл насыщенной соляной кислоты. Колбу закрывают пробкой, смесь осторожно встряхивают и дают отстояться сутки при комнатной температуре. Во время настаивания колбу периодически встряхивают. За 24 ч клетчатка полностью гидролизует. По окончании гидролиза содержимое колбы доводят водой до метки и фильтруют или через стеклянный фильтр с отсасыванием, или через заранее приготовленный асбестовый фильтр в трубке Аллина, или в фильтровальном тигле с асбестом. Фильтры перед фильтрованием высушивают до постоянной массы при $100-105^\circ \text{C}$. Осадок на фильтре промывают горячей водой до получения бесцветных фильтратов. Затем фильтр вместе с осадком высушивают до постоянной массы при $100-105^\circ \text{C}$. По разности между массой фильтрата с осадком и его начальной массой определяют количество лигнина, которое вычисляют в процентах к навеске. В полученном фильтрате (при необходимости) определяют количество редуцирующего сахара и пересчитывают его на клетчатку.

ЖИРЫ

К жирам и жироподобным веществам относят различные по химической природе вещества, общими свойствами которых является их нерастворимость в воде. Они растворяются в органических растворителях (эфире, хлороформе, толуоле, спиртах, бензине, дихлорэтане, ацетоне и других подобных растворителях). К этой группе веществ относят жиры, воски, фосфолипиды, стерины и стериды. Они носят общее название липидов. Вместе с белками и углеводами липиды входят в состав живой клетки, где играют большую физиологическую роль.

Жиры широко распространены в природе, они находятся в цитоплазме клетки (в ядре клетки не найдены). Содержание жиров в различных тканях колеблется от десятых долей до 96% (в костном мозгу). Они играют большую роль в жизненных функциях живого организма.

Жиры подразделяются на запасные и цитоплазматические, которые являются составной частью цитоплазмы клетки, имеют постоянный состав и не расходуются даже при голодании организма. Запасные жиры накапливаются в семенах, зародышах и плодах многих растений, которые нередко служат сырьем для получения жиров, называемых маслами. Жиры и масла, извлекаемые из жировой ткани обычными методами, представляют собой сложную химическую смесь. Главную массу ее составляют сложные эфиры глицерина и высокомолекулярных жирных кислот. Эти сложные эфиры называются глицеридами. В жировой смеси

тора (в зависимости от экстрагируемого материала) может быть различным (100, 200, 300, 400 мл). При экстракции учитывают, что количество растворителя в колбе не должно быть больше $\frac{3}{4}$ ее объема. Шлифы аппарата необходимо тщательно очищать. Вода в холодильнике должна циркулировать с такой скоростью, чтобы он не запотевал. Не допускается накопление влаги на шлифах. Навеску помещают

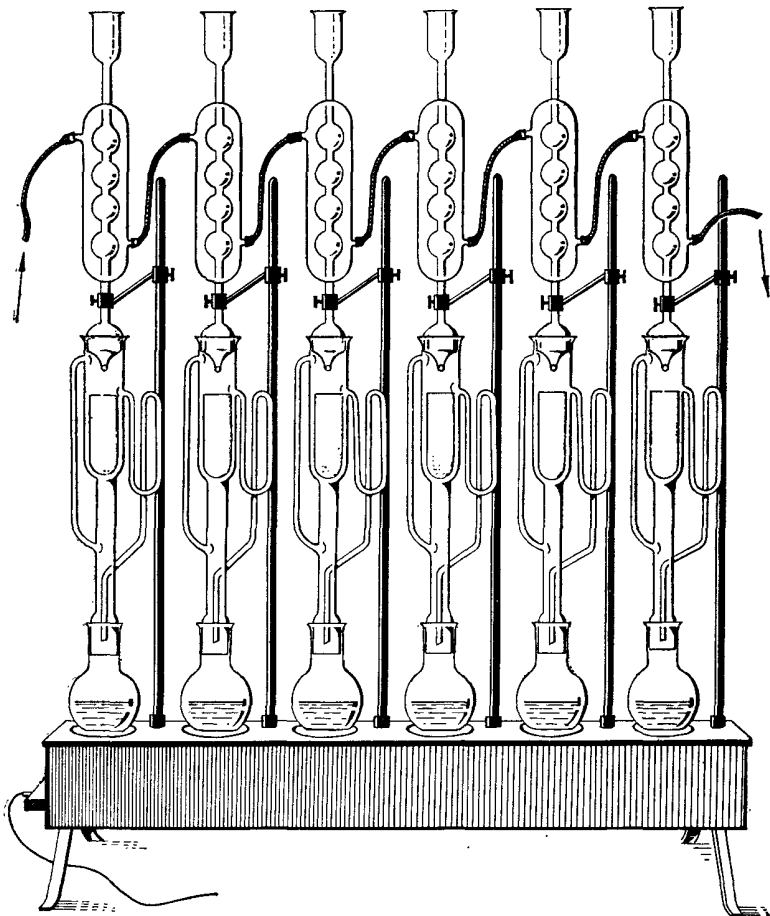


Рис. 42. Аппарат Сокслета.

в специальный бумажный патрон фабричного или собственного изготовления. Патрон изготавливают наворачиванием фильтровальной бумаги на деревянную болванку или стеклянный цилиндр меньшего диаметра, чем экстрактор. Края бумаги подвертывают, а патрон завязывают обезжиренной ниткой. Затем патрон снимают с болванки и на дно его помещают тампон обезжиренной ваты.

Для определения содержания жира в исследуемом продукте две параллельные навески от 3 до 7 г помещают в фарфоровые ступки,

на дно которых предварительно насыпают немного безводного Na_2HPO_4 . Количество безводной соли должно в два или три раза превышать массу навески (в зависимости от ее влажности). Смесь тщательно перетирают до порошкообразного состояния.

Сухой порошок количественно перемещают на небольшой квадратный лист фильтровальной бумаги. В ступку добавляют еще немного безводной соли и после растирания также переносят на лист бумаги. Остатки со ступки и пестика собирают при помощи небольших кусочков ваты, которые переносят на бумагу. Лист фильтровальной бумаги аккуратно свертывают в виде пакетика, завязывают обезжиренной ниткой и помещают в патрон. Сверху в патрон закладывают небольшой тампончик ваты и помещают в аппарат Сокслета. Ступку обмывают небольшими порциями эфира, которые сливают в экстрактор, соединенный с колбой. Далее собирают аппарат и приливают эфир, обмывая им патрон. Затем включают источник нагревания. Пары растворителя, образующиеся в колбе, конденсируются в холодильнике и собираются в экстракторе. Нагревание регулируют и, если оно недостаточно (например, при высококипящих растворителях — спирте, хлороформе и др.), утепляют (лучше асбестом) паропроводную трубку. Нагревание и кипение эфира следует отрегулировать так, чтобы за 1 ч происходило 3—4 сливания растворителя из экстрактора через сифон. Экстрагирование ведут около 12 ч (этого времени достаточно для полного извлечения жира). По окончании экстрагирования растворитель из колбы отгоняют, а остаток растворителя удаляют, поместив колбу на 1 ч в вакуум-сушильный шкаф при температуре $40\text{--}45^\circ\text{C}$ с подачей сухого CO_2 (пропускают через концентрированную H_2SO_4). Содержимое колбы сушат до постоянной массы. Колбу перед каждым взвешиванием для удаления углекислоты продувают воздухом при помощи резиновой груши. Колбу взвешивают на аналитических весах. Количество жира (в %) вычисляют по формуле

$$x = \frac{(a - b) 100}{g},$$

где a — масса колбы с жиром; b — масса колбы; g — навеска исследуемого материала, г. При сушке продукта в сушильном шкафу при $100\text{--}105^\circ\text{C}$ высоконепредельные продукты в растительном масле значительно окисляются. Окисленное растительное масло трудно извлекается из навески, поэтому результаты бывают занижены. Изложенный же метод предотвращает возможное окисление высоконенасыщенных продуктов и дает хорошие результаты. В настоящее время существует множество методов определения количества жира. В большинстве случаев они представляют собой модификации метода Сокслета с различными изменениями экстракционных аппаратов. Количество жира определяют также по уменьшению массы материала после экстракции. При определении количества жира используют также реакцию окисления его хромовой кислотой, которую учитывают иодометрическим методом.¹

¹ Балаховский С. Д., Балаховский И. С. Методы химического анализа крови. М., Медгиз, 1953, с. 473.

Определение количества жира (по Рушковскому). При проведении большого количества анализов пользуются методом Рушковского (определение ведут по обезжиренному остатку). В пакетик из фильтровальной бумаги насыпают 2—3 г исследуемого материала. Пакетик с пробой вкладывают в другой такой же пакетик так, чтобы их швы не совпадали. Затем пробу помещают в бюкс и высушивают в вакуум-сушильном шкафу в токе сухого CO_2 до постоянной массы при температуре 40—45° С. Заготавливают 4—6 таких пакетиков с пробами. Высушив навеску до постоянной массы, пакеты помещают в экстракторы аппарата Сокслета и экстрагируют серным эфиром в течение 10—12 ч. После этого пакетики сушат в вакуум-сушильном шкафу в токе сухого CO_2 до постоянной массы. Содержание жира в исследуемом продукте вычисляют по формуле

$$x = \frac{(a - b) 100}{g},$$

где x — количество жира, %; a — масса пакетика до экстрагирования, г; b — масса пакетика после экстрагирования, г; g — навеска, г.

Определение жира в аппарате Зайченко. Аппарат состоит из колбы, обратного холодильника и подвешенного внутри колбы экстрактора. Холодильник и колба соединяются на шлифах. К пробке холодильника припаяны два крючка, на которые подвешивают экстрактор (рис. 43). Экстрактор представляет собой стеклянный стаканчик с продырявленным дном.

Навеску 1—1,5 г обезживают Na_2HPO_4 или Na_2SO_4 и помещают в стаканчик аппарата. Экстрагируют серным эфиром в течение 3—5 ч, эфир отгоняют, а остатки его удаляют в вакуум-сушильном шкафу так же, как и в методе Сокслета.

Среди быстрых способов следует отметить рефрактометрический метод определения количества жира в семенах по А. Н. Ермакову.¹

Определение физических и химических показателей жира. Качество жира и его происхождение определяют, исследуя его химические свойства. Так, при хранении жира происходит расщепление глицеридов, сопровождающееся накоплением свободных жирных кислот, т. е. возрастанием кислотности. Повышенная кислотность жира указывает на снижение его качества. Ненасыщенные жирные кислоты окисляются по двойным связям, в результате чего в жире увеличивается количество перекисей, альдегидов и других продуктов распада. Они сообщают жиру прогорклый вкус. Уменьшение иодного числа и повышение числа омыления в процессе хранения масла являются показателями его порчи.

Кислотным числом называют количество миллиграммов едкого ка-

¹ Ермаков А. Н. и др. Методы биохимических исследований растений. М., Сельхозгиз, 1952, с. 263.

ли, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, находящихся в 1 г масла.

Методика опыта. Берут две конические колбы емкостью 250 мл, в одну из них помещают навеску жира (по разности) 3—10 г в зависимости от его кислотности, в другую — 50 мл смеси спирта с эфиром (1 : 2). Смесь во второй колбе нейтрализуют 0,1 н. раствором КОН с 3—5 каплями фенолфталеина до розового окрашивания и приливают к жиру. После растворения жира (при вращении колбы по кругу) смесь титруют 0,1 н. раствором КОН, отсчитывая от нуля до появления не исчезающей после взбалтывания в течение 0,5—1 мин розовой окраски. Кислотное число (КЧ) вычисляют по формуле

$$\text{КЧ} = \frac{aK \cdot 5,61}{g},$$

где a — количество 0,1 н. раствора КОН, израсходованного на титрование взятой навески жира, мл; K — поправочный коэффициент к титру 0,1 н. раствора КОН; 5,61 — коэффициент пересчета объема 0,1 н. раствора КОН в миллиграммы (в 1 мл 0,1 н. раствора КОН содержится 5,61 мг КОН); g — навеска жира, г.

При определении кислотного числа в окрашенных жирах, когда трудно заметить изменение окраски фенолфталеина, титруют с 1%-ным спиртовым раствором тимолфталеина, который в кислой среде бесцветен, а в щелочной становится голубым, в темных жирах — голубовато-зеленым или грязно-зеленым. В жирах сильно окрашенных и с высокой кислотностью КЧ определяют следующим образом: 3—5 г жира растворяют в 30—50 мл нейтральной спирто-эфирной смеси (1 : 1), прибавляют в колбу 10%-ного (нейтрального) раствора BaCl_2 (для осаждения жирных кислот и некоторых окрашенных продуктов), 1 мл 1%-ного раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором КОН при энергичном взбалтывании до появления розового окрашивания водного слоя при разделении жидкости после некоторого отстаивания. Кислотное число вычисляют по формуле, приведенной выше.

Кроме того, применяют электрометрический метод титрования, который позволяет определить кислотное число независимо от окраски жира.¹

Кислотность жира иногда выражают в процентах свободной олеиновой кислоты. Для этого полученную величину КЧ умножают на 0,5026.

Число омыления (ЧО) показывает, какое количество миллиграммов КОН необходимо для нейтрализации как свободных, так и связанных (в форме триглицеридов) жирных кислот, содержащихся в 1 г масла.

Приготовление 0,5 н. спиртового раствора КОН. Этиловый спирт, применяемый для приготовления раствора щелочи, следует очистить от альдегидов и, если нужно, от сивушных масел.

Для очистки спирт обрабатывают небольшим количеством кристаллического KMnO_4 , а затем отгоняют с добавлением CaCO_3 для связывания кислот. Спиртовой раствор КОН готовят следующим образом: 30 г химически чистого КОН растворяют

¹ Лазаревский А. А. Технохимический контроль в рыбообрабатывающей промышленности. М., «Пищепромиздат», 1955, с. 317.

Из фильтрата в колбу 4 отмеряют 3 мл раствора глицерина, прибавляют кусочек пемзы и 15 мл разбавленного раствора HI. Колбу тотчас присоединяют к аппарату и пропускают CO₂ (который проходит через разбавленный раствор соли) в боковую трубку 5 со скоростью 3 пузырька в секунду. Смесь нагревают, поместив колбу 4 в умеренно нагреваемую глицериновую баню так, чтобы уровень жидкости внутри и снаружи колбы был одинаковым. Раствор HI во время перегонки должен слабо кипеть. Дистиллят проходит в насадке 1 через водную

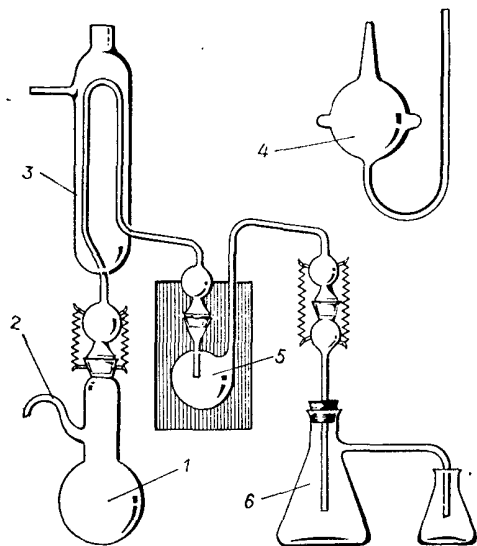


Рис. 45. Модифицированный аппарат Цейзеля и Фанто.

смесь красного фосфора, где из него удаляется иод и иодоводород. Очищенный иодистый изопропил связывается в колбе 2 AgNO₃ и остатки его поглощаются в колбе 3, которая служит контролем на полноту поглощения иодистого изопропила в колбе 2.

Перегонку продолжают до тех пор (2—4 ч), пока жидкость над осадком AgI не станет прозрачной. Поглотительную жидкость заменяют свежим раствором AgNO₃ и продолжают дистилляцию. В конце реакции содержимое колб 2 и 3 количественно переносят в стакан, разбавляют водой до 450 мл и прибавляют 10—15 капель разбавленной HNO₃. Смесь нагревают на водяной бане, чтобы сделать AgI легко

фильтруемым, и фильтруют через заранее взвешенный стеклянный фильтр, промывают водой и сушат до постоянной массы. Масса AgI, умноженная на 0,3920, соответствует массе глицерина. Параллельно для проверки чистоты реактивов проводят контрольный опыт, в котором не должно быть осадка AgI в спиртовом растворе AgNO₃.

Содержание глицерина в исследуемом масле вычисляют (в %) по формуле

$$x = \frac{va \cdot 0,3920 \cdot 100}{v_1 g}$$

где v — объем глицеринового раствора после отделения жирных кислот, мл; a — количество AgI в конце реакции, г; 0,3920 — коэффициент пересчета AgI в глицерин, г; v_1 — объем фильтрата, взятого на анализ, мл; g — навеска жира, взятого для омыления, г.

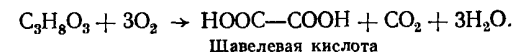
Пример расчета. Для анализа была взята навеска жира 19,89 г. После омыления и отделения жирных кислот получено 150 мл раствора глицерина (фильтрата). В колбу аппарата Цейзеля и Фанто отмерено 3 мл фильтрата. Получено 0,1035 г AgI. Для определения содержания глицерина в масле подставляем полученные ре-

зультаты в формулу:

$$\frac{150 \cdot 0,1035 \cdot 0,3920 \cdot 100}{3 \cdot 19,89} = 10,20\%$$

В производственной практике для количественного определения глицерина в различных продуктах (не только в жире) применяют модифицированный аппарат Цейзеля и Фанто (рис. 45), который состоит из колбы 1 емкостью 40 мл с трубкой 2 для пропускания CO₂, через холодильник 3 циркулирует вода, температуру которой поддерживают около 60° С (при помощи универсального термостата 4). Внутреннюю трубку холодильника соединяют с колбой 1 шлифом и укрепляют пружинками. Приставку 5 погружают в воду при 60—70° С, в ней водная смесь красного фосфора поглощает иод и иодоводород. Все части аппарата соединяют шлифами, за исключением колбы Эрленмейера 6, которую соединяют с аппаратом пробкой.

Методика опыта та же, что и при определении с помощью немодифицированного аппарата, разница только в подготовке исследуемых глицериновых растворов. Она изменяется в соответствии с характером материала, поступающего на анализ. Кроме весовых методов, известны и объемные методы определения глицерина. Они построены на принципе окисления глицерина KMnO₄ или K₂Cr₂O₇. Окисление глицерина KMnO₄ в щелочной среде идет по уравнению



По количеству образовавшейся щавелевой кислоты вычисляют количество глицерина. Окисление дихроматом идет по уравнению



По количеству K₂Cr₂O₇, израсходованного на окисление глицерина (определяемого иодометрическим методом), вычисляют содержание глицерина в исследуемом продукте.

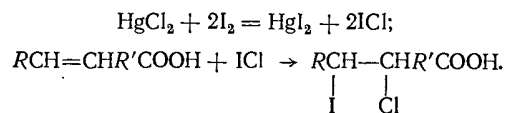
Иодным числом (ИЧ) называют количество иода в граммах, присоединяемое к 100 г жира. Это число является одним из наиболее важных показателей для жиров. Оно указывает на содержание в жире непредельных жирных кислот, свидетельствует о склонности его к высыханию, прогорканию и другим изменениям, происходящим при хранении и переработке пищевого (и технического) жира, а также пищевых продуктов, богатых жиром. Иодное число для свежего жира является характерным показателем, определяющим происхождение его. Для природного жира оно постоянно.

По месту двойной связи присоединяется не только иод, но и другие галоиды — хлор и бром, которые реагируют энергичнее, чем иод; они присоединяются не только к двойным связям, но и замещают водород в радикале. Поэтому обычно применяют иод, который в определенных условиях реагирует преимущественно с двойными связями. В настоящее время разработано множество различных методов определения иодного числа. Чаще всего применяется метод Гюбля, обладающий высокой точностью.

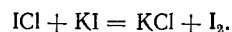
Определение иодного числа (по Гюблю). В основе метода лежит реакция присоединения двух атомов галоидов к одной двойной связи.

Иод без воды не способен непосредственно количественно насыщать непредельные связи жира. Поэтому применяют хлорид иода, бромид иода или иодоватистую кислоту. По этому методу жир обрабатывают спиртовым раствором иода и сулемы (реактив Гюбля). Образующийся хлорид иода количественно присоединяется по месту двойных связей.

Реакция протекает по уравнению



Хлорид иода, не израсходованный в реакции присоединения к двойным связям, вступает в реакцию с KI, раствор которого добавляют в конце настаивания по методике. Иод из хлорида иода вытесняется по уравнению



Выделившийся иод оттитровывают раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Действие хлорида иода не ограничивается только насыщением двойных связей. При продолжительном настаивании галоиды могут замещать водород

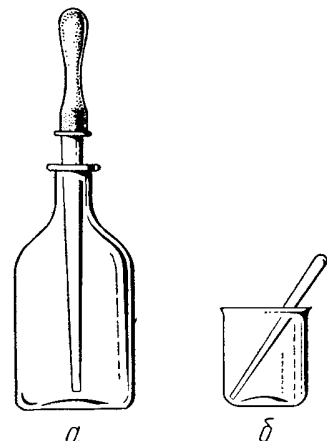


Рис. 46. Капельница и бюкс для отбора навесок жира.

в насыщенных группах, поэтому следует строго придерживаться методики.

Приготовление некоторых реактивов. Реактив Гюбля составляют из двух растворов: а) 25 г иода в 500 мл 96%-ного этилового спирта;

б) 30 г сулемы в 500 мл спирта. Раствор сулемы при смешивании в случае необходимости фильтруют. Полученные растворы смешивают за 24 ч перед употреблением и хранят в хорошо закупоренных склянках в темном месте, так как состав свежеприготовленной смеси быстро меняется.

Раствор KI: 10 г KI растворяют в 100 мл дистиллированной воды.

Методика опыта. Для отбора проб по разности массы необходима капельница или бюкс со стеклянной трубкой, оттянутой на конце; последней пользуются в качестве пипетки (рис. 46). В чистую сухую склянку или в колбу Эрленмейера емкостью 300 мл с хорошо пришлифованной стеклянной пробкой помещают взвешенные по разности (на аналитических весах) 0,1—0,2 г (2—5 капель) жира, в зависимости от содержания непредельных соединений в нем. Капли жира не должны попадать на стенки и горло склянки (колбы). Если же это случилось, надо взять другую навеску и заменить склянку. К жиру приливают 15 мл хлороформа и осторожно взбалтывают для растворения жира. Пипеткой Мора, несколько опустив ее в склянку, приливают 25 мл реактива Гюбля. Склянку тотчас закрывают хорошо пришлифованной пробкой, предварительно смоченной раствором KI. Склянку ставят в темное место на 18 ч. Если смесь начнет обесцвечиваться через несколько часов, следует добавить еще строго отмеренное количество реактива Гюбля. Реактива Гюбля требуется приблизительно в 2 раза больше, чем по расчету.

По истечении указанного времени приливают 10 мл раствора KI. Если выпадает красный осадок HgI_2 , то добавляют еще раствора KI, чтобы растворился выпавший осадок. В склянку приливают 100 мл воды и титруют выделившийся иод 0,1 н. раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до слабо-желтого цвета. Затем добавляют 1 мл раствора крахмала и титруют при сильном взбалтывании. Иод задерживается хлороформным слоем и при взбалтывании переходит в раствор, окрашивая его в синий цвет. Обесцвечивание раствора наступает обычно от одной последней капли 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Параллельно ставят контрольный опыт без добавления жира. Разность между титрованием в контрольном и рабочем опытах является показателем количества иода, связанного жировой жиру. Иодное число вычисляют по формуле

$$\text{ИЧ} = \frac{(a - b) K \cdot 0,01269 \cdot 100}{g},$$

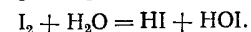
где $(a - b)$ — разность объемов 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, израсходованных для титрования в контрольном и рабочем опытах, мл; K — поправочный коэффициент к титру эмпирического 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,01269 — коэффициент пересчета израсходованного раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в иод, г (1 мл 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ эквивалентен 0,01269 г иода); g — навеска, г.

Пример расчета. Для титрования в контрольном опыте израсходовано 25,32 мл 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, а в рабочем — 14,16 мл. Навеска жира равна 0,1068 г. Поправочный коэффициент к 0,1 н. раствору $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ $K = 0,9965$. Для определения иодного числа жира подставляем полученные данные в формулу:

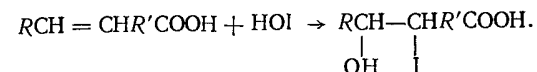
$$\text{ИЧ} = \frac{(25,32 - 14,16) 0,9965 \cdot 0,01269 \cdot 100}{0,1068} = 132,8.$$

При точном сохранении условий опыта получаются хорошо совпадающие данные, расхождения в параллельных опытах допускают лишь в десятых долях.

Быстрый метод определения иодного числа. Одним из простых быстрых методов определения иодного числа является метод, основанный на способности иода реагировать с водой по уравнению



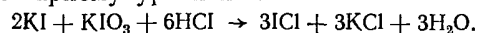
В обычных условиях эта реакция не протекает, но в присутствии ненасыщенных соединений, поглощающих HOI, указанная реакция протекает количественно:



Методика опыта. В чистую сухую склянку или колбу Эрленмейера емкостью 500 мл с хорошо пришлифованной стеклянной пробкой помещают взвешенные на аналитических весах 0,2—0,3 г жира (2—3 капли) и добавляют 30 мл 96%-ного этилового спирта для растворения навески (если необходимо, подогревают на водяной бане). Затем пипеткой Мора добавляют 25 мл 0,2 н. раствора иода, смешивают, приливают 200 мл дистиллированной воды и хорошо встряхивают (закрыв пробкой). Колбу с содержимым оставляют на 5 мин, после чего

титруют 0,1 н. раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Параллельно проводят контрольный опыт и рассчитывают результаты по приведенной выше формуле.

Определение иодного числа с хлоридом иода (без сулемы). Этот метод, как и предыдущий, является быстрым методом и относится к числу стандартных. Хлорид иода образуется с соляной кислотой по следующему суммарному уравнению:



Приготовление 0,2 н. раствора хлорида иода. В склянку с притертой пробкой вносят 11,1 г KI, 7,0 г KIO_3 , добавляют 50 мл воды, 50 мл HCl ($d = 1,19$) и взбалтывают до полного растворения иода. Затем прибавляют 20 мл хлороформа и образовавшуюся фиолетовую окраску хлороформенного слоя обесцвечивают, добавляя по каплям 1%-ный раствор KIO_3 при энергичном взбалтывании. После отстаивания водный слой сливают в мерную колбу на 1 л и доводят водой до метки. Реактив хранят в хорошо закрытой склянке в темном месте.

Методика опыта. В чистую сухую склянку или колбу Эрленмейера емкостью 250—300 мл с хорошо притертой стеклянной пробкой помещают взвешенные на аналитических весах 0,1—0,5 г (2—7 капель) жира (см. стр. 119), приливают 3 мл серного эфира, не содержащего перекисей. Пипеткой Мора добавляют 25 мл 0,2 н. раствора хлорида иода. Перемешивают, закрывают плотно пробкой и дают отстояться 15 мин, после чего вносят 10 мл 10%-ного раствора KI, приливают 50 мл дистиллированной воды и титруют выделившийся иод 0,1 н. раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до светло-желтой окраски. Затем прибавляют 1 мл свежеприготовленного 1%-ного раствора крахмала, 2—3 мл хлороформа и титруют до полного обесцвечивания раствора. Прибавление хлороформа необходимо для освобождения иода, адсорбированного жиром. Параллельно проводят контрольный опыт. Иодное число вычисляют по формуле, приведенной для метода Гюбля.

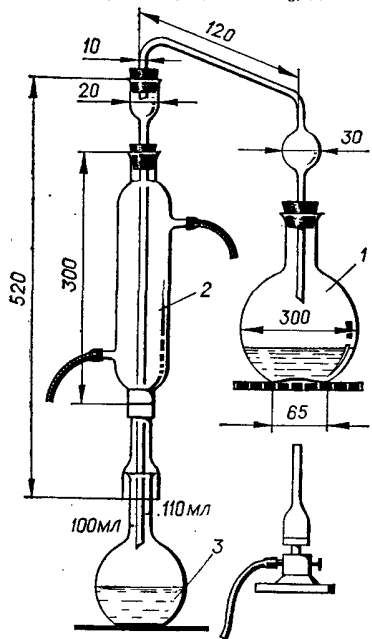


Рис. 47. Прибор для определения чисел Рейхерта — Мейссля и Поленске.

Определение количества летучих жирных кислот, растворимых в воде (число Рейхерта — Мейссля). Числом Рейхерта — Мейссля называют количество миллилитров 0,1 н. раствора KOH, необходимое для нейтрализации летучих, растворимых в воде кислот, отогнанных из 5 г жира. При определении числа Рейхерта — Мейссля требуется точно придерживаться разработанной методики.

Методика опыта. В круглую плоскодонную колбу 1 (рис. 47) помещают 5 г жира, добавляют 5 г глицерина и 2 мл водного раствора KOH (1 : 1). Смесь нагревают на сетке до кипения при постоянном и

осторожном взбалтывании. Омыление ведут 5—10 мин (до тех пор, пока смесь не станет прозрачной). Нагревание продолжают еще несколько минут, поворачивая колбу так, чтобы собрать со стенок приставшие частички мыла. Смесь охлаждают до 80—90° С и прибавляют 90 мл свежепрокипяченной дистиллированной воды, имеющей ту же температуру. Получают прозрачный раствор мыла. Если же остаются нерастворимые кусочки мыла, то смесь нагревают на водяной бане до полного их растворения. Затем мыльный раствор разлагают, добавляя 50 мл разбавленной H_2SO_4 (25 мл концентрированной H_2SO_4 и 1 л воды) и немного пемзы. Колбу соединяют с вертикальным холодильником 2 и ведут отгонку в течение 18—21 мин. За это время необходимо отогнать 110 мл дистиллята (приемную колбу 3 заранее градуируют), который должен иметь температуру не выше 25° С. После отгонки колбу на 5—10 мин помещают в воду, температура которой 15° С. Колбу слегка встряхивают так, чтобы капельки жирных кислот, приставшие к стенкам, всплыли на поверхность. Колбу оставляют на 10 мин, закрывают пробкой и переворачивают 4—5 раз (не встряхивая). Смесь фильтруют через сухой фильтр диаметром 8 см в мерную колбу емкостью 100 мл. Фильтрат количественно переносят в стакан, добавляют 3—4 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором щелочи до не исчезающего в течение 2 мин розового окрашивания.

К объему щелочи, пошедшей на титрование, добавляют $\frac{1}{10}$ часть этого объема, так как отогнано было 110 мл. Полученный объем щелочи умножают на поправочный коэффициент к 1 н. раствору. Вычисленная величина и будет числом Рейхерта — Мейссля.

Определение количества летучих жирных кислот, нерастворимых в воде (число Поленске). Кислоты отгоняют так же, как и при определении числа Рейхерта — Мейссля. По получении 110 мл отгонную колбу заменяют стаканом или цилиндром. Жидкость, собранную в стакан, выливают тут же на фильтр, через который фильтровали кислоты, собранные для определения числа Рейхерта — Мейссля. Холодильник, приемник и стакан последовательно промывают 3 раза по 15 мл дистиллированной водой, которую выливают на фильтр. По окончании промывания воронку с фильтром переносят на колбу Эрленмейера и промывают последовательно холодильник, приемник, стакан и фильтр три раза по 15 мл нейтральным 96%-ным этиловым спиртом. Собранный спиртовый фильтрат титруют в присутствии фенолфталеина 0,1 н. раствором щелочи. Объем (в мл) 0,1 н. раствора щелочи, израсходованный на нейтрализацию летучих нерастворимых в воде жирных кислот, которые выделены из 5 г жира, называют числом Поленске.

Физические показатели жиров. Температура плавления. Жиры не являются однородным химическим соединением. Они представляют собой смесь большого количества веществ и поэтому не имеют определенной точки плавления. Определяя температуру плавления методами, принятыми в органической химии, можно сделать вывод, что температура медленно повышается с изменением консистенции жира. Поэтому отмечают начальную и конечную точки плавления как переход жира из твердого в жидкое состояние. Конечной точкой плавления считают температуру, при которой жир превращается в совершенно прозрачную

жидкость. Для жидких жиров определяют еще точку застывания (обычно по способу Жукова или Финкенера).

Относительную плотность определяют различными методами в зависимости от состояния жира (жидкий он или твердый). Наиболее распространенным является метод определения относительной плотности пикнометрами различных систем. Кроме того, относительную плотность жиров определяют на гидростатических весах Мора — Вестфала.

Показатель преломления определяют универсальным рефрактометром, буттеррефрактометром и др.

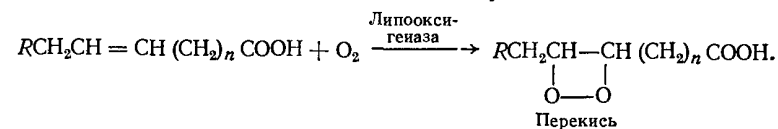
Вязкость определяют вискозиметрами различных систем. Наиболее распространен вискозиметр Энглера.

Принципы определения состава жирных кислот в жирах. Разработано много разнообразных методов выделения жирных кислот из жира и учета их количеств. Разделению жирных кислот предшествует омыление жира раствором щелочи, затем удаление неомыляемой части. Соли жирных кислот разлагают минеральными кислотами. Из полученной смеси отгоняют с паром летучие жирные кислоты, которые разделяют в виде солей серебра или дробной перегонкой. Летучие предельные и непредельные жирные кислоты разделяются обычно по методу Варрентрапа — Фарина, основанному на различной растворимости в эфире свинцовых солей этих жирных кислот. Свинцовые соли насыщенных жирных кислот нерастворимы в эфире и выпадают в осадок, а соли ненасыщенных жирных кислот в эфире растворяются. Осадок свинцовых солей насыщенных жирных кислот разлагают раствором HCl, выделившиеся свободные жирные кислоты разгоняют под вакуумом. Свинцовые соли непредельных жирных кислот обрабатывают аммиаком. При этом образуются растворимые аммонийные соли жирных кислот и Pb(OH)₂, который выпадает в осадок. Осадок отфильтровывают, а из фильтрата осаждают жирные кислоты BaCl₂. Бариевые соли ненасыщенных жирных кислот отфильтровывают с отсасыванием и затем сушат в токе инертного газа. Сухие соли обрабатывают этиловым спиртом. При этом олеиновая кислота выпадает в виде хлопьевидного осадка, а линолевая и линоленовая кислоты остаются в растворе. Очищенную олеиновую кислоту отгоняют в вакууме. Линолевую и линоленовую кислоты разделяют бромированием или окислением KMnO₄ (по Бертрану). Кроме того, кислоты можно разделить, используя различную растворимость их свинцовых солей в этиловом спирте (по Твитчелю).

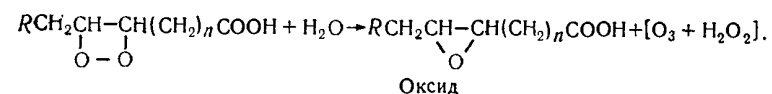
Определение степени окисления жиров. Окисление непредельных жирных кислот протекают при непосредственном воздействии кислорода, света, воды и под действием некоторых окислительных ферментов, в частности липооксигеназы.

Липооксигеназа широко распространена в растениях, она активно окисляет линолевую и линоленовую кислоты и медленнее олеиновую. Липооксигеназа катализирует окисление ненасыщенных жирных кислот, превращая их в перекиси, которые обладают весьма высокой окислительной способностью. Они окисляют новые молекулы ненасыщенных жирных кислот, распадаясь и образуя при этом окиси, озониды,

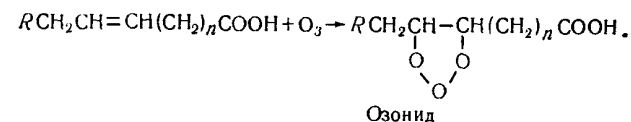
альдегиды и др. Соединения, образующиеся в результате окисления ненасыщенных жирных кислот, сообщают маслу, муке, крупе и другим пищевым продуктам прогорклый вкус и запах. Окисление ненасыщенных кислот можно представить в виде следующей схемы:



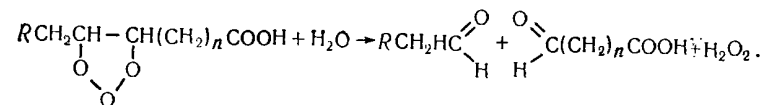
Перекись является промежуточным продуктом окисления ненасыщенных жирных кислот. При распаде ее образуются окиси и свободный атомарный кислород, который служит источником озона и пероксида водорода:



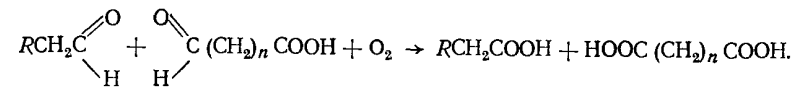
Образование озона может происходить и под влиянием фиолетовых и ультрафиолетовых лучей. Таким образом, при обычных условиях прогоркания жиров озон образуется двумя путями. Образовавшийся озон окисляет новые молекулы непредельных жирных кислот, превращая их в озониды:



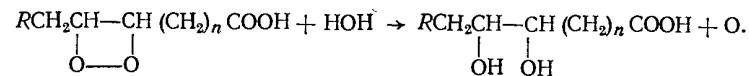
Озонид также нестойкое соединение и в присутствии воды распадается с разрывом цепи и образованием альдегидов:



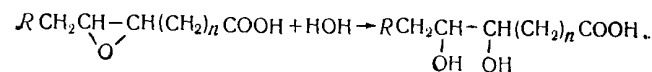
Образующиеся альдегиды так же, как и перекиси, являются промежуточными продуктами, которые в дальнейшем окисляются до монокарбоновой и дикарбоновой кислоты:



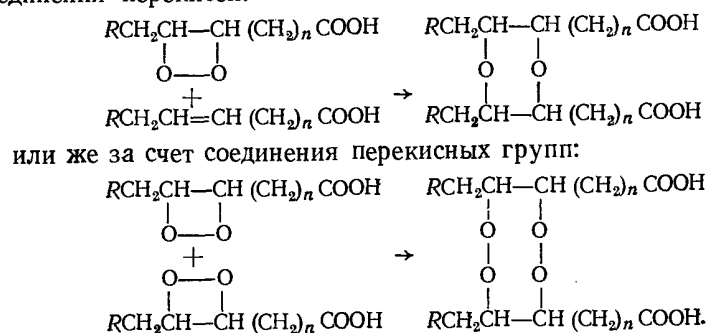
В процессе окисления (прогоркания) жира при его хранении из пероксидов образуются оксикислоты:



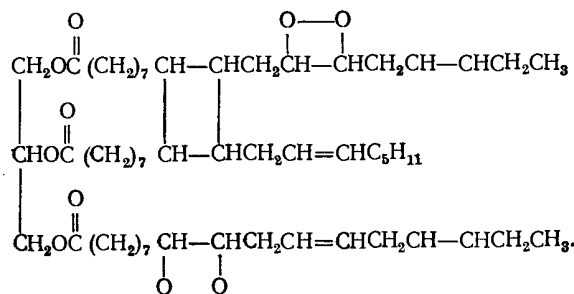
Оксикислоты образуются также и из окиси:



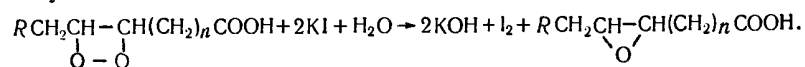
Одновременно с окислением происходит полимеризация жира. Процесс полимеризации идет за счет разрыва двойных связей и присоединения перекисей:



Полимеризация происходит также с образованием кольцевых соединений с четырьмя углеродными атомами, например в линолевой и линоленовой кислотах:



Таким образом, на воздухе жир прогоркает и в нем появляются плотные пленки полимеров. Качественная реакция на перекиси соответствует схеме



Реакцию проводят в кислой среде, так как в щелочной она не чувствительна, потому что иод реагирует с образовавшимся КОН:



В кислой же среде эта реакция очень чувствительна.

Методика опыта. К пробе жира (2—3 г) прибавляют столько же хлороформа или дихлорэтана и двойной объем 10%-ного раствора KI, подкисленного уксусной кислотой. Смесь встряхивают и добавляют 2—3 капли раствора крахмала. Появление синего окрашивания указывает на наличие в масле перекисей. Параллельно делают контрольный опыт на чистоту реактивов, в котором вместо масла добавляют дистиллированную воду.

Количественное определение перекисей (перекисное число). В основу количественного определения положен тот же принцип, что и в ка-

чественной реакции, т. е. выделение иода из KI и дальнейшее титрование его раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Приготовление 0,002 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Готовят его перед каждым определением, разбавляя 0,1 н. раствор прокипяченной (не содержащей CO_2) дистиллированной водой.

Методика опыта. Навеску жира около 2 г (взвешенную на аналитических весах) растворяют в небольшой колбе Эрленмейера в 20 мл смеси, состоящей из двух частей ледяной уксусной кислоты и одной части хлороформа. Затем прибавляют 5 мл насыщенного раствора KI и оставляют на 10 мин. По окончании реакции добавляют 30 мл воды. Выделившийся иод оттитровывают 0,002 н. раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, добавив 0,5 мл 1%-ного раствора крахмала. Параллельно проводят контрольное определение, в котором вместо жира берут дистиллированную воду. Перекисное число выражают в граммах иода, выделенного из KI перекисями, образовавшимися в 100 г жира. Это число вычисляют по формуле

$$\text{ПЧ} = \frac{(a - b) 0,0002538 \cdot 100}{g},$$

где $(a - b)$ — разность между объемами 0,002 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, израсходованными на титрование в контрольном и рабочем опытах, мл; 0,0002538 — коэффициент пересчета $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ в иод, г; g — навеска масла, г.

Качественная реакция на альдегиды с фуксинсернистой кислотой.

Приготовление фуксинсернистой кислоты (по Шиффу). В мерную колбу емкостью 250 мл наливают 30 мл 0,1%-ного раствора фуксина в этиловом спирте, 15 мл водного раствора, насыщенного Na_2SO_3 , и 30 мл воды. Смесь размешивают и через 1—2 ч приливают к ней 16 мл разбавленной (1 : 3) H_2SO_4 , затем доводят до метки 50%-ным этиловым спиртом. Реактив хранят в темном месте или в склянке, покрытой черным лаком.

Методика опыта. В пробирку наливают 5 мл жира, прибавляют 2 мл фуксинсернистой кислоты и встряхивают. Появление синего или фиолетового окрашивания указывает на наличие альдегидов в испытуемом жире. Если в течение 20 мин окрашивание не появляется, то считают, что жир не содержит альдегидов.

Колориметрический метод определения альдегидов в жирах (альдегидное число по К. П. Петрову). Альдегидным числом называют количество иода в граммах, необходимое для окисления альдегидов, содержащихся в 100 г жира.

В основу метода положена реакция альдегидов с фуксинсернистой кислотой. Испытуемый раствор альдегидов сравнивают со стандартным раствором формальдегида, титр которого определяют иодометрически.

Приготовление некоторых реактивов. Фуксинсернистая кислота (по Фелленбергу). В мерной колбе емкостью 1 л растворяют 5 г фуксина в 800 мл воды. Отдельно растворяют 12 г кристаллического Na_2SO_3 в небольшом количестве воды, добавляют к раствору 100 мл 1 н. раствора HCl. Эту смесь количественно переносят в мерную колбу (к раствору фуксина) и доводят дистиллированной водой до метки. Фуксинсернистую кислоту хранят в темном месте или в склянке, покрытой темным лаком и плотно закрытой. Если раствор окрашен, он не пригоден для опыта.

Стандартный раствор формальдегида. В небольшой химический стакан помещают 2,075 г химически чистого формалина, который количественно переводят в мерную колбу емкостью 500 мл, прибавляют около 400 мл воды, хорошо перемешивают и доводят водой до метки. Раствор еще раз перемешивают и определяют содержание в нем формальдегида иодометрическим методом. Для этого в склянку емкостью 150 мл с хорошо притертой стеклянной пробкой отмеряют 25 мл 0,1 н. раствора иода в растворе KI. К иоду приливают пипеткой Мора 10 мл формалина и по каплям добавляют концентрированный раствор NaOH до тех пор, пока окраска смеси не станет светло-желтой. Склянку хорошо закрывают и дают отстояться 10 мин. Затем раствор подкисляют HCl до сильно-коричневого окрашивания, а выделившийся

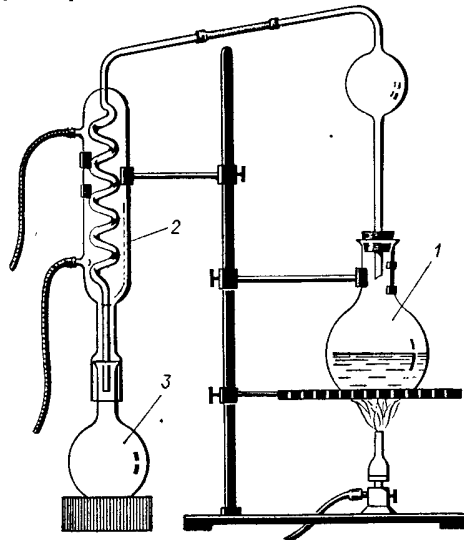


Рис. 48. Аппарат для определения альдегидного числа по К. П. Петрову.

иод оттитровывают 0,1 н. раствором $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Параллельно проводят контрольный опыт, в котором вместо формалина добавляют такое же количество дистиллированной воды. Количество формальдегида в растворе рассчитывают по формуле

$$x = \frac{(a - b) K \cdot 0,001412 \cdot 100}{10}$$

где x — содержание формальдегида в 100 мл раствора, г; $(a - b)$ — разность между объемами 0,1 н. растворов $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, израсходованных на титрование в контрольном и рабочем опытах, мл; K — поправочный коэффициент к эмпирическому раствору $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 0,001412 — коэффициент пересчета в формальдегид, г (1 мл 0,1 н. раствора иода соответствует 0,001412 г формальдегида).

Полученный раствор (с определенным количеством формальдегида) служит в качестве исходного для приготовления стандартного раствора при колориметрическом определении альдегидов в жирах. Если

этот раствор хорошо закрыт, то в темном месте он хранится в течение 6 месяцев без заметного изменения титра. Стандартный раствор. Для его приготовления отбирают пипеткой Мора 25 мл исходного раствора формальдегида и вносят в мерную колбу емкостью 250 мл, доводят объем до метки свежеприготовленной прокипяченной и охлажденной дистиллированной водой. Стандартный раствор формальдегида, если он хорошо закрыт, в темном месте сохраняется 5—7 дней.

Методика опыта. В плоскодонную отгонную колбу 1 (рис. 48) помещают навеску жира от 1 до 10 г (в зависимости от его прогорклости) и несколько кусочков свежeproкаленной пемзы, приливают 150 мл дистиллированной холодной воды. Отгонную колбу тотчас же соединяют с вертикальным холодильником 2 и нагревают на асбестовой сетке. Дистиллят собирают в мерную колбу 3 емкостью 50 мл, после наполнения которой до метки отгонку прекращают. Отогнанный дистиллят можно оставить до следующего дня в колбе, хорошо закрыв ее резиновой пробкой (суточное хранение его практически не влияет на результаты анализа). Далее отмеряют по 5 мл стандартного раствора и испытуемого дистиллята в мерные колбочки емкостью 50 мл каждая, вносят по 5 мл бесцветного реактива Фелленберга и доводят его свежeproкипяченной дистиллированной водой до метки.

Спустя 15—20 мин колориметрируют в фотоэлектроколориметре. Расчет ведут по калибровочной кривой или же сравнивают оптические плотности опытного и стандартного растворов. Если расхождение в окраске растворов большое, то изменяют концентрацию стандартного раствора так, чтобы получить результаты, близкие между собой. Если окраска испытуемого раствора недостаточно интенсивная по сравнению со стандартом (что может быть у свежего или малоокисленного жира), то количество жира, вносимое в отгонную колбу, увеличивают в 2, 3 и 5 раз.

Альдегидное число для доброкачественных жиров и масел колеблется от 0,01 до 0,1; жиры и масла с резко выраженными прогорклыми свойствами имеют альдегидное число выше 0,3.

Определение количества оксикислот (по Фарину). В неизмененных натуральных жирах оксикислот обычно нет. Они в основном являются продуктами окисления жиров в процессе хранения. Количество образовавшихся оксикислот — один из показателей степени порчи масла. Определение оксикислот основано на нерастворимости их в петролейном эфире. Жирные кислоты, выделенные щелочным омылением, растворяют петролевым эфиром, оставшиеся нерастворимые оксикислоты учитывают весовым способом.

Методика опыта. Взвешенную на аналитических весах навеску жира (2—3 г) переносят в колбу емкостью 150 мл и приливают 15 мл 2 н. спиртового раствора KOH. Колбу соединяют с обратным холодильником, охлаждаемым водой, и омыляют жир на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически взбалтывая. Затем содержимое колбы количественно с небольшим объемом воды переносят в фарфоровую чашку и упаривают для удаления спирта почти досуха на кипящей водяной бане, помешивая стеклянной палочкой. Конец упаривания определяют по исчезновению запаха спирта. Следует избегать полного высушивания остатка, ибо пересушенное мыло плохо растворяется. Остаток после упаривания растворяют в горячей воде и количественно с водой переносят в цилиндрическую делительную воронку емкостью 500 мл. Общий объем раствора должен быть около 60 мл. К неостывшему раствору мыла добавляют около 200 мл раствора HCl (1 : 1) и несильно перемешивают. Выделившиеся жирные кислоты еще в теплом виде экстрагируют 50 мл петролейного эфира, который приливают медленно и небольшими порциями, помешивая смесь. При размешивании необходимо следить, чтобы оксикислоты не собирались в комочки, не осаждались на стенках воронки. Смесь оставляют на 12 ч, а отстоявшийся слой эфира отделяют, выпуская водный слой. Раствор жирных кислот в эфире фильтруют через бумажный фильтр.

Если оксикислоты образовали комочки, которые могут задерживать жирные кислоты, эти комочки еще раз обрабатывают раствором щелочи, подкисляют раствором HCl и экстрагируют петролевым эфиром. Оксикислоты тщательно промывают небольшими порциями петролейного эфира и растворяют в смеси спирта с хлороформом (1 : 1), фильтруют через тот же фильтр в заранее взвешенную сухую колбу. Растворитель вначале отгоняют на кипящей водяной бане, а затем остаток оксикислот сушат в сушильном шкафу при 100—105° С до постоянной

массы. Количество оксикислот (в %) вычисляют по формуле

$$x = \frac{(a - b) 100}{g},$$

где $(a - b)$ — разность между массами колбы с оксикислотами и пустой колбы, г; g — навеска жира, г.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

Спирты (алкоголи)

В зависимости от числа гидроксильных групп, входящих в молекулу, спирты делятся на одноатомные, двухатомные, трехатомные и т. д. Одноатомные спирты называются алкоголями. Алкоголи образуются в процессе обмена веществ и широко распространены в природе. Конечным продуктом спиртового брожения является этиловый спирт. При гидролизе пектиновых веществ и других метиловых эфиров отщепляется метиловый спирт. При дезаминировании аминокислот и последующем их декарбоксилировании образуются амиловый, изоамиловый, изобутиловый и другие спирты.

Смесь амилового, изоамилового, бутилового и других спиртов называют сивушными маслами. Сивушные масла накапливаются при спиртовом брожении как побочные продукты, образующиеся при распаде белков и дальнейшем окислительном дезаминировании аминокислот.

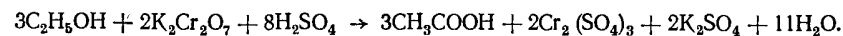
ЭТИЛОВЫЙ СПИРТ

Образуется при анаэробном типе дыхания (брожения) в различных растениях. Так, например, анаэробное дыхание наблюдается в плодах, где оно является следствием недостатка кислорода во внутренних тканях. При созревании плодов и ягод усиливается анаэробное дыхание, которое сопровождается образованием этилового спирта и продуктов неполного окисления углеводов (ацетальдегида, уксусной и молочной кислот). Особенно много этилового спирта образуется при неполном распаде сахара в процессе анаэробного дыхания дрожжей без доступа воздуха. Анаэробное превращение глюкозы, фруктозы и других сахаров дрожжами называется спиртовым брожением, которое используют в бродильных, хлебопекарных и других производствах.

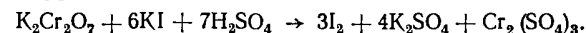
Качественная реакция на содержание этилового спирта. К двум каплям 0,1 н. раствора иода в растворе KI добавляют 1—2 капли исследуемой жидкости и затем по каплям 10%-ный раствор NaOH до тех пор, пока бурый цвет раствора не перейдет в бледно-желтый. Раствор слегка подогревают (не выше 60° C). В присутствии этилового спирта образуется желтоватый осадок иодоформа (C₂H₅I₃). Смесь имеет характерный запах иодоформа, который указывает на наличие этилового спирта.

Иодометрическое определение этилового спирта. В основе метода — принцип окисления этилового спирта K₂Cr₂O₇ до уксусной кислоты

по уравнению



Избыток K₂Cr₂O₇ определяют иодометрически, реакция при этом протекает по уравнению



Свободный иод титруют 0,1 н. раствором Na₂S₂O₃. Метод простой и дает весьма точные результаты. Применяют его для определения небольших количеств спирта, содержащегося в плодах, фруктах, плодово-ягодных соках, вине и др.

Методика опыта. В круглодонную колбу 1 (рис. 49) емкостью 300 мл количественно (со 100 мл воды) переносят 10 г исследуемого продукта или 10—20 мл вытяжки. Для нейтрализации кислот прибавляют 10—15 мл 0,1 н. раствора NaOH до нейтральной реакции по лакмусу. Общий объем жидкости в отгонной колбе должен быть около 130—140 мл. В колбу опускают несколько стеклянных капилляров, соединяют ее с холодильником 2, охлаждаемым холодной водой, и проверяют на герметичность все соединения перегонного аппарата. Над перегонной колбой устанавливают каплеуловитель 3. Приемник 4 служит мерная колба емкостью 100 мл. Отгонку вначале ведут на слабом огне; после наполнения приемника примерно до половины пламя усиливают. Приемную колбу наполняют до метки. При вспенивании добавляют небольшое количество (на кончике ножа) танина. В колбу емкостью 100 мл наливают 10 мл 0,2 н. раствора K₂Cr₂O₇ и осторожно по стенке колбы приливают 5 мл концентрированной H₂SO₄ ($d = 1,84$).

После остывания смеси в колбе пипеткой Мора по каплям добавляют 3—10 мл дистиллята (в зависимости от содержания в нем алкоголя) при взбалтывании¹. После этого колбу оставляют на 15 мин при комнатной температуре, затем накрывают часовым стеклом и 10 мин нагревают на горелке или спиртовке, избегая бурного кипения. Смесь количественно с 250 мл переносят в колбу Эрленмейера емкостью 500 мл, прибавляют 2—2,5 г KI, предварительно растворенного в небольшом количестве воды. Колбу закрывают часовым стеклом и оставляют на 2—3 мин. Выделившийся иод титруют 0,1 н. раствором Na₂S₂O₃ при добавлении 1 мл 1%-ного раствора крахмала. Оттитрованный раствор часто бывает окрашен в голубовато-зеленый цвет вследствие присутствия солей хрома. Если на титрование затрачивается менее 6—

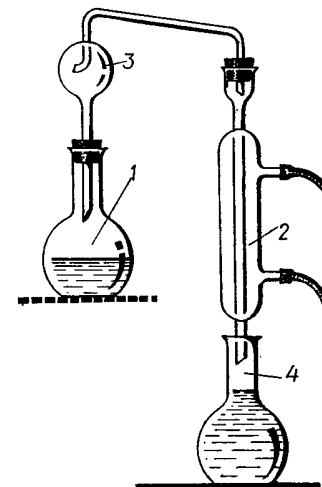


Рис. 49. Установка для отгона этилового спирта.

¹ Для полного окисления спирта избыток дихромата должен составлять не менее 2—3 мл. Если алкоголя больше, дистиллят следует дополнительно разбавлять водой.

8 мл раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, то дистиллят дополнительно разбавляют водой или берут его меньше. Параллельно проводят контрольный опыт. Количество спирта (в %) в исследуемом продукте рассчитывают по формуле

$$x = \frac{(a - b) 0,0015 \cdot 100}{g},$$

где $(a - b)$ — разность между объемами 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, затраченными на титрование в контрольном и рабочем опытах, мл; 0,0015 — коэффициент пересчета результатов титрования в этиловый спирт, г (1 мл 0,1 н. раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ соответствует 0,0015 г спирта); g — количество продукта, соответствующее взятой для отгонки жидкости, г.

Таблица 9. Пересчет относительной плотности в проценты

Относительная плотность при 15,5° С	Проценты		Относительная плотность при 15,5° С	Проценты		Относительная плотность при 15,5° С	Проценты	
	весовые	объемные		весовые	объемные		весовые	объемные
1,0000	0,00	0,00	0,9821	11,54	14,27	0,9638	26,00	31,57
0,9990	0,53	0,66	0,9815	12,00	14,84	0,9623	27,00	32,73
0,9981	1,00	1,26	0,9808	12,54	15,49	0,9609	28,00	33,89
0,9973	1,50	1,88	0,9802	13,00	16,05	0,9593	29,00	35,05
0,9965	2,00	2,51	0,9795	13,54	16,70	0,9578	30,00	36,20
0,9956	2,50	3,14	0,9789	14,00	17,26	0,9560	31,00	37,34
0,9947	3,00	3,76	0,9783	14,55	17,92	0,9544	32,00	38,47
0,9938	3,53	4,42	0,9778	15,00	18,48	0,9528	33,00	39,61
0,9930	4,00	5,00	0,9772	15,50	19,08	0,9511	34,00	40,74
0,9922	4,50	5,63	0,9766	16,00	19,68	0,9490	35,00	41,84
0,9914	5,00	6,24	0,9759	16,54	20,33	0,9470	36,00	42,95
0,9906	5,50	6,86	0,9753	17,00	20,89	0,9452	37,00	44,06
0,9898	6,00	7,48	0,9747	17,50	21,49	0,9434	38,00	45,16
0,9891	6,50	8,10	0,9741	18,00	22,09	0,9416	39,00	46,26
0,9884	7,00	8,72	0,9734	18,54	22,73	0,9396	40,00	47,36
0,9876	7,53	9,37	0,9728	19,00	23,28	0,9180	50,09	57,92
0,9869	8,00	9,95	0,9722	19,50	23,88	0,8950	60,26	67,93
0,9862	8,50	10,56	0,9716	20,00	24,48	0,8720	70,04	76,94
0,9855	9,00	11,17	0,9704	21,00	25,67	0,8180	80,13	85,59
0,9848	9,50	11,79	0,9691	22,00	26,86	0,8220	90,29	93,49
0,9841	10,00	12,40	0,9678	23,00	28,04	Абсолютный спирт		
0,9834	10,54	13,05	0,9665	24,00	29,22	0,7937	100,00	100,00
0,9828	11,00	13,62	0,9652	25,00	30,40			

В лабораториях определяют количество этилового спирта также по относительной плотности его растворов.

Определение содержания этилового спирта по относительной плотности отгона.

Методика опыта. Пикнометр сначала обрабатывают хромовой смесью, затем споласкивают 10—12 раз водопроводной водой и 3 раза дистиллированной. Пикнометр сушат, последовательно ополаскивая его 2—3 раза этиловым спиртом, 1—2 раза сухим серным эфиром и продувая через него воздух при помощи узкой стеклянной трубки с резиновой грушей. Хранят пикнометр в эксикаторе. Сухой пикнометр взвешивают на аналитических весах.

Пикнометр наполняют приблизительно до метки дистиллированной водой, недостающее количество воды добавляют капилляром, избыток удаляют фильтровальной бумагой и осторожно вытирают горлышко пикнометра выше черты. Наполненный пикнометр выдерживают в универсальном термостате при 15,5°С 30 мин. Далее пикнометр вытирают фильтровальной бумагой, ставят на 20—30 мин около аналитических весов, а затем взвешивают. Точно так же пикнометр наполняют дистиллятом, предварительно сполоснув им несколько раз этот пикнометр. Относительную плотность вычисляют по формуле

$$\frac{a - m}{b - m},$$

где a — масса дистиллята с пикнометром; b — масса воды с пикнометром; m — масса пикнометра.

Содержание спирта в объемных и весовых процентах вычисляют по относительной плотности дистиллята при 15,5°С (табл. 9).

Этиловый спирт можно определять также колориметрическим, рефрактометрическим, ареометрическим и другими методами.

МЕТИЛОВЫЙ СПИРТ

Метиловый спирт CH_3OH широко распространен в растительном мире, главным образом в виде сложных эфиров (входит в состав пектиновых веществ, хлорофилла и др.), иногда в небольших количествах встречается и в свободном виде. Образуется при спиртовом брожении как побочный продукт, частично входит в состав спирта-сырца. При брожении виноградных и других плодовых вин CH_3OH отщепляется от эфиров (главным образом от пектиновых веществ) и в ничтожно малых количествах переходит в напиток. Поэтому вина и спирты, получаемые из выжимок винограда, которые наиболее богаты пектиновыми веществами, имеют повышенное содержание CH_3OH . Метиловый спирт образуется также при ферментативном разложении пектина, вызываемом некоторыми плесневыми грибами. В процессе ректификации метиловый спирт полностью отделяют от этилового.

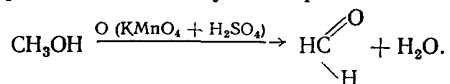
CH_3OH в чистом виде представляет собой бесцветную подвижную жидкость, смешивающуюся с водой в любых соотношениях; обладает слабым запахом, похожим на запах этилового спирта. Метиловый спирт чрезвычайно ядовит. Он вызывает тяжелое отравление, которое сопровождается расстройством зрения, иногда переходящим в полную слепоту, или кончается смертельным исходом.

Качественная реакция на метиловый спирт. Принцип реакции заключается в окислении спирта до формальдегида и дальнейшем определении его фуксинсернистой кислотой.

Приготовление фуксинсернистой кислоты: 0,1 г фуксина растворяют в 100 мл воды, прибавляют 5 мл насыщенного раствора NaHSO_3 и подкисляют 2 мл концентрированной H_2SO_4 . Приготовленную таким способом фуксинсернистую кислоту употребляют спустя сутки после приготовления. Хранят в хорошо закупоренной склянке в темном месте. Нагревание фуксинсернистой кислоты может вызвать появление окраски, а поэтому опыт нужно проводить при охлаждении.

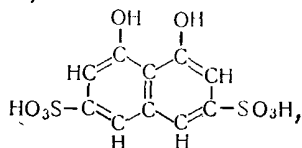
Методика опыта. К 1—2 мл дистиллята, полученного описанным выше способом (см. стр. 199), добавляют равный объем 10%-ного раствора H_2SO_4 , охлаждают льдом и прибавляют небольшими порциями $KMnO_4$ (0,2—0,5 г). Через 15 мин прибавляют дистиллят до обесцвечивания раствора и фильтруют его.

В фильтрате определяют формальдегид. Окисление метилового спирта $KMnO_4$ протекает по следующей реакции:



К окисленному раствору прибавляют концентрированную H_2SO_4 (на 10 мл испытуемого раствора 1—2 мл кислоты) и 1 мл бесцветного раствора фуксинсернистой кислоты. Появление синего или сине-фиолетового окрашивания указывает на наличие формальдегида, а значит и метилового спирта.

Колориметрическое определение метилового спирта. Метод основан на окислении метилового спирта $KMnO_4$ до формальдегида и определении его с помощью хромотроповой кислоты (1,8-дигидронафталин-3,6-дисульфокислота)



Хромотроповая кислота

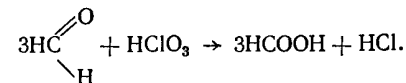
которая с формальдегидом в присутствии H_2SO_4 образует соединение красно-фиолетового цвета.

Эта реакция специфична, так как другие альдегиды не образуют соединений такого цвета. Например, глицериновый альдегид с хромотроповой кислотой образует соединение темного цвета.

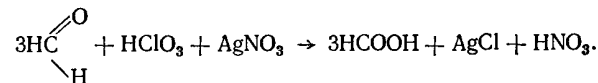
Методика опыта. Навеску исследуемого материала (масса зависит от содержания метилового спирта) перегоняют с водяным паром. Отгон собирают в мерную колбу на 100 мл до метки. Отмеряют 1 мл дистиллята в мерную колбу емкостью 10 мл, добавляют 3 капли разбавленного раствора H_3PO_4 и 5 капель раствора $KMnO_4$. Полученную смесь в течении 10 мин периодически осторожно взбалтывают. После этого избыток $KMnO_4$ связывают, добавляя по каплям раствор гидросульфита до обесцвечивания. Раствор охлаждают в смеси льда и воды и прибавляют небольшими порциями при помешивании 4 мл концентрированной H_2SO_4 . Затем прибавляют 4 капли 2%-ного раствора хромотроповой кислоты и нагревают колбочку 15 мин на водяной бане при $60^\circ C$, периодически взбалтывая смесь. После нагревания колбочку снова погружают в смесь льда и воды. Прибавляют дистиллированную воду почти до метки, перемешивают и ждут, пока содержимое примет комнатную температуру. Далее смесь доливают водой до метки и колориметрируют в фотоэлектроколориметре. Дополнительно проводят еще одно определение окраски продукта без окисления дистиллята и вносят поправку в результат опыта. Для составления калибровочных кри-

вых готовят стандартные растворы с содержанием от 20 до 100 мкг метилового спирта, которые обрабатывают, соблюдая описанные выше условия. Одновременно проводят контрольный опыт с дистиллированной водой, результаты которого вычитают из результатов рабочего опыта. Этиловый спирт не мешает определению метилового спирта.

Объемный метод определения метилового спирта. В основу метода положен принцип окисления метилового спирта до формальдегида и дальнейшего окисления его до муравьиной кислоты. Формальдегид окисляют хлорноватой кислотой по уравнению



В реакционную смесь добавляют $AgNO_3$ (для связывания аниона хлора), в присутствии которого реакция образования муравьиной кислоты протекает следующим образом:



Методика опыта. К точно отмеренному количеству дистиллята, содержащего не более 10 мг% метилового спирта, добавляют 5 мл 10%-ного раствора H_2SO_4 и 1 мл 5%-ного раствора $KMnO_4$. Смесь взбалтывают и оставляют на 3 мин при комнатной температуре. Затем прибавляют 1 мл 8%-ного раствора щавелевой кислоты и 1 мл концентрированной H_2SO_4 . Взбалтывают и добавляют небольшое количество дистиллированной воды. К прозрачной смеси приливают 20 мл свежеприготовленного 2,5%-ного раствора $KClO_3$, пипеткой Мора добавляют 5 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$ и 3 мл концентрированной HNO_3 . Смесь хорошо взбалтывают и нагревают 30 мин в водяной бане при температуре $60—70^\circ C$. По окончании нагревания колбу быстро охлаждают, прибавляют немного дистиллированной воды и избыток ионов Ag^+ оттитровывают 0,05 н. раствором NH_4NCS в присутствии 1—2 мл насыщенного раствора железосаммиачных квасцов до розовато-желтого окрашивания.

Параллельно ставят контрольный опыт на содержание в исследуемом растворе формальдегида без окисления перманганата. 1 мл 0,1 н. раствора $AgNO_3$ соответствует 9,0 мг формальдегида и 9,6 мг метилового спирта. Количество метилового спирта рассчитывают (в мг%) по формуле

$$\frac{(a - b) 9,6v \cdot 100}{v_1 g \cdot 2},$$

где $(a - b)$ — разность объемов 0,05 н. раствора NH_4NCS , израсходованных для титрования в контрольном и рабочем опытах, мл; 9,6 — коэффициент пересчета; v — объем полученного дистиллята, мл; v_1 — объем дистиллята, взятого для определения, мл; g — навеска исследуемого продукта, взятого для дистилляции, г; 2 — поправка на титр.

Полифенольные полимерные соединения

К этим соединениям относятся дубильные вещества, лигнин и меланины.

Дубильные вещества. Широко распространены в растительном мире. Как и эфирные масла, они относятся к растительным веществам вторичного происхождения, играющим весьма важную роль промежуточных продуктов обмена веществ. Источником образования дубильных веществ являются углеводы. Дубильные вещества обладают физиологической активностью, в процессе роста и развития растений они подвергаются глубоким изменениям. Такой важный представитель дубильных веществ, как хлорогеновая кислота, является дыхательным хромогеном и играет большую роль в дыхании растений. Рядом исследователей (В. Н. Букин, Н. Н. Ерофеева, А. Л. Курсанов и др.) установлено, что дубильные вещества чайных листьев и других растений обладают Р-витаминной активностью.

При каталитическом воздействии окислительных ферментов дубильные вещества окисляются и превращаются в окрашенные соединения, которые изменяют цвет пищевых продуктов.

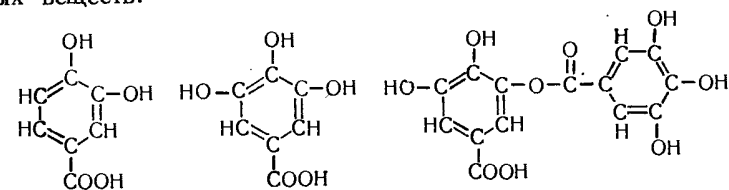
Дубильные вещества обладают вяжущим вкусом. Они содержатся во многих пищевых продуктах растительного происхождения и оказывают влияние на их вкусовую ценность. Значительное количество дубильных веществ содержится в различных плодах, в хмеле, в оболочках зерна и др. При переработке растительного сырья они переходят в готовые продукты (вино, пиво и др.), сообщая им определенные вкусовые свойства. Некоторые дубильные (полифенольные) вещества растворимы в воде, с солями железа (III) образуют соединения черного или зеленого цвета. Дубильные вещества осаждаются солями свинца, образуя нерастворимые осадки и вызывая коагуляцию белков.

Дубильные вещества делят на две группы. К первой относят вещества эфирного характера. Под действием кислот или ферментов они гидролизуются. Дубильные вещества второй группы гидролитически не расщепляются. Это обычно конденсированные соединения, связанные между собой через углеродные атомы.

В первую группу дубильных веществ входят в основном производные ароматических оксикарбоновых кислот (галловой, пирокатеховой, кофейной и др.) и глюкозиды. Оксикарбоновые кислоты обладают спиртовыми и кислотными группами, которые реагируют одна с другой и образуют соединения типа сложных эфиров, называемые депсидами. К группе гидролизуемых дубильных веществ принадлежит таннин — глюкозид дигалловой кислоты.

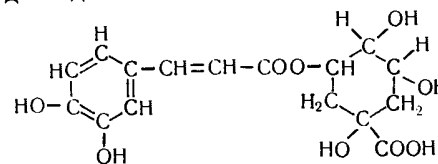
Дигалловая кислота состоит из двух остатков галловой кислоты, связанных сложноэфирной связью, и называется дидепсидом. Если депсид состоит из трех остатков оксикарбоновых кислот, то он называется тридепсидом и т. д. Галловая кислота, у которой вступает в реакцию гидроксил, находящийся в мета-положении по отношению к ее карбоксилу, образует с другой галловой кислотой дидепсид, который называется метадигалловой кислотой.

Метадигалловая кислота играет большую роль при образовании дубильных веществ:



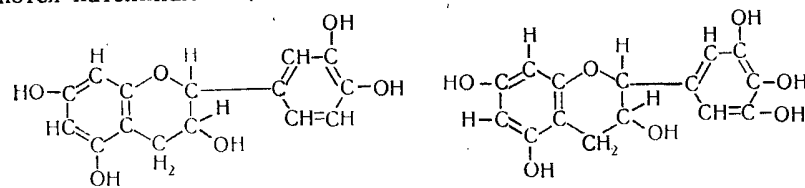
Протокатеховая кислота Галловая кислота Метадигалловая кислота

Типичным дидепсидом является также хлорогеновая кислота:



Хлорогеновая кислота

Основной структурной единицей второй группы дубильных веществ являются производные антоцианов и флавонолов, которые называются катехинами. К ним относятся катехин и галлокатехин.



d,l - Эпикатехин

Галлокатехин

Катехины содержатся в растениях как в свободном, так и в связанном виде (сложные эфиры галловой кислоты).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

Качественные реакции на дубильные вещества. Методика опыта.
 I. Пять капель 1%-ного раствора FeCl_2 (или железо-аммонийных квасцов) добавляют к нейтрализованному (по лакмусу) испытуемому раствору. Появление синего или зеленого окрашивания указывает на наличие дубильных веществ. Эту реакцию нельзя считать вполне специфичной. Она характерна для других веществ, поэтому наличие дубильных веществ устанавливают и другими реакциями. II. Осаждение дубильных веществ желатином. К испытуемому раствору прибавляют 1%-ный раствор желатина в 10%-ном растворе NaCl . Если в испытуемом растворе есть дубильные вещества, то от одной капли раствора желатина появляется муть. III. Осаждение дубильных веществ солями тяжелых металлов. К испытуемому раствору прибавляют несколько капель 10%-ного раствора $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, образование осадка указывает на наличие дубильных веществ. То же наблюдается и при добавлении растворов солей меди, висмута и ртути. IV. Дубильные вещества

осаждаются также растворами солей алкалоидов (цинхонина, хинина и др.).

Количественное определение дубильных веществ объемным методом. В основу этого метода положен принцип окисления дубильных веществ KMnO_4 в присутствии индигокармина. Метод широко применяют в лабораторной практике как наиболее простой и не требующий большой затраты времени.

Приготовление раствора индигокармина. 1 г препарата индигокармина переносят в мерную колбу емкостью 1 л и растворяют в 50 мл концентрированной H_2SO_4 ($d = 1,84$). Доводят водой до метки и фильтруют.

Методика опыта. Навеску 2—10 г (в зависимости от содержания дубильных веществ) хорошо измельченного растительного материала переносят в стакан, прибавляют 75 мл дистиллированной воды и нагревают до 80°C . Охлажденную смесь количественно переносят в мерную колбу емкостью 250 мл, стакан ополаскивают 2—3 раза дистиллированной водой и содержимое колбы доводят водой до метки. Полученную смесь оставляют настаиваться 30 мин, в течение этого времени несколько раз хорошо встряхивают, затем фильтруют через складчатый фильтр. В большую фарфоровую чашку емкостью 1 л отмеривают 10 мл фильтрата, добавляют 750 мл дистиллированной воды и 25 мл раствора индигокармина и 10 мл разбавленной H_2SO_4 (1 : 4). Смесь титруют 0,05 н. раствором KMnO_4 , энергично перемешивая стеклянной палочкой. Титрование ведут со скоростью одной капли в секунду до появления слабо-розовой окраски, хорошо заметной по краям чашки. Цвет смеси в фарфоровой чашке постепенно изменяется: из синего он становится темно-зеленым, светло-зеленым, зеленовато-желтым, а затем и золотисто-желтым. Титрование следует вести при хорошем освещении и повторить его два раза. Чтобы получить достаточно точные, хорошо сходящиеся результаты, титруют при строго одинаковых условиях опыта. Для внесения поправки на остальные окисляющие составные части исследуемой вытяжки проводят контрольный опыт, в котором удаляют дубильные вещества, адсорбируя их из вытяжки активированным углем. Для контроля берут также 10 мл исследуемого фильтрата и прибавляют к нему 3 г активированного угля в порошке, нагревают, помешивая 40 мин на водяной бане, и фильтруют в ту же большую фарфоровую чашку. Уголь промывают теплой дистиллированной водой. Промывные воды присоединяют к основному фильтрату и в чашку приливают дистиллированную воду до общего объема 750 мл. Добавляют 25 мл индигокармина, 10 мл разбавленной H_2SO_4 (1 : 4) и титруют 0,05 н. раствором KMnO_4 . При этом титровании KMnO_4 окисляет все вещества, которые могут окисляться, кроме дубильных и красящих, предварительно поглощенных углем. Содержание дубильных веществ (в %) вычисляют по формуле

$$x = \frac{(a - b) 0,004157v \cdot 100}{g^2v_1},$$

где $(a - b)$ — разность между объемами 0,05 н. раствора KMnO_4 , израсходованными на титрование в первом и втором опытах, мл;

0,004157 — коэффициент пересчета результата титрования в дубильные вещества (1 мл 0,1 н. раствора KMnO_4 соответствует 0,004157 г дубильных веществ, например танина); v — общий объем вытяжки, мл; v_1 — объем фильтрата, взятого для анализа, мл; g — навеска исследуемого продукта, г.

Пример расчета. Навеску 2,35 г (g) дубильных веществ экстрагировали в мерной колбе емкостью 250 мл (v). Объем содержимого колбы доведен водой до метки. Для анализа взяли фильтрата (v_1) 10 мл. На титрование в первом опыте (a) затрачено 23,86 мл 0,05 н. раствора KMnO_4 , а во втором (b) — 2,65 мл. Чтобы определить содержание дубильных веществ в продукте, подставляем полученные результаты в формулу:

$$\frac{(23,86 - 2,65) 0,004157 \cdot 250 \cdot 100}{2,35 \cdot 10 \cdot 2} = 4,26\%.$$

Весовой метод определения дубильных веществ. В основу этого метода положено осаждение дубильных веществ солью алкалоида — цинхонинсульфатом — и взвешивание промытого и доведенного до постоянной массы осадка. Этот метод прост и достаточно точен.

Методика опыта. Около 10 г хорошо измельченного растительного материала (например, хмель) помещают в коническую колбу на 750 мл, наливают в нее 400 мл кипящей воды и экстрагируют 2 ч на кипящей водяной бане, часто перемешивая. Смесь охлаждают до комнатной температуры и количественно переносят в мерную колбу емкостью 500 мл, доводят водой до метки, сильно встряхивают и фильтруют через сухой складчатый фильтр.

В небольшой химический стакан отмеряют пипеткой Мора 50 мл фильтрата и упаривают (можно на сетке или на слабом огне) до 15 мл. Затем стакан помещают в смесь льда с водой. После охлаждения в стакан наливают 50 мл тоже охлажденного, свежеприготовленного 1%-ного раствора цинхонинсульфата и оставляют в холодильнике на 2 ч.

Выпавший осадок количественно переносят на предварительно взвешенный сухой стеклянный фильтр № 3 и отфильтровывают (в начале фильтрования без отсасывания). Остатки содержимого стакана смыывают небольшими порциями свежеприготовленного 0,2%-ного раствора цинхонинсульфата (1%-ный раствор разбавляют водой в 5 раз) и переносят на фильтр. После промывания начинают просасывать воздух через осадок до образования в нем трещин. Затем осадок сушат сначала при $50\text{--}70^\circ\text{C}$, а потом при $100\text{--}105^\circ\text{C}$ до постоянной массы.

Содержание дубильных веществ (в %) вычисляют по формуле

$$x = \frac{(a - b) 0,6v \cdot 100}{gv_1},$$

где a — масса фильтра с осадком, г; b — масса фильтра, г; 0,6 — коэффициент пересчета сухого осадка в дубильные вещества; v — объем вытяжки, полученной из взятой навески, мл; g — навеска исследуемого растительного продукта, г; v_1 — объем фильтрата, взятого для осаждения дубильных веществ, мл.

Хроматографический анализ дубильных веществ. Дубильные вещества можно также разделять методом нисходящей одномерной и

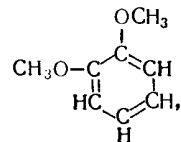
двухмерной распределительной хроматографии. При одномерной хроматографии системой растворителей служит смесь *n*-бутилового спирта, уксусной кислоты (ледяной) и воды в соотношении (4 : 1 : 3). При двухмерной нисходящей хроматографии в качестве первой системы растворителей применяют: смесь фенола, уксусной кислоты и воды в соотношении (50 : 4) и воду до насыщения. Эта система растворителей поступает по длине волокон бумаги. Второй системой является смесь *n*-бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении (4 : 12 : 29). Хроматограммы подсушивают при комнатной температуре и проявляют, опрыскивая их из пульверизатора раствором железо-аммонийных квасцов или ванилиновым реактивом (1%-ный раствор ванилина в концентрированной HCl).

Методика опыта. Для хроматографирования берут полоски бумаги длиной 45—55 см, шириной 12—18 см. Полученный экстракт дубильных веществ и раствор «свидетелей» наносят микропипеткой на бумагу в количестве 5—10 мкг на расстоянии 6 см от конца бумаги с соблюдением интервалов между пятнами 1,5—2 см. Длительность хроматографирования составляет 16—24 ч (в зависимости от сорта бумаги). В качестве хроматографической камеры применяют обыкновенный цилиндр высотой 60 см, диаметром 20 см.

Растворитель помещают в ванночку, закрепленную внутри цилиндра. Воздух в цилиндре насыщают водой и закрывают герметично стеклом. Хроматографирование проводят при 15° С. Параллельно получают хроматограмму с раствором эталонов, или «свидетелей», которые наносят на ту же полосу бумаги рядом с исследуемым образцом. В качестве эталонов берут отдельные катехины или стандартный препарат чайного танина с заранее известным составом катехина. Этим методом получены довольно четкие хроматограммы индивидуальных веществ. Метод используют для качественного анализа.

Органические кислоты

Быстрый колориметрический метод определения молочной кислоты. Метод основан на измерении интенсивности красной окраски соединения, образующегося в процессе реакции ацетальдегида с диметиловым эфиром пирокатехина (вератролом), который получают метилированием пирокатехина или гваякола.



Вератрол

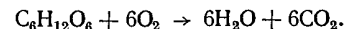
Получение раствора H₂SO₄. В мерной колбе на 100 мл 85 мл H₂SO₄ (*d* = 1,84) доводят дистиллированной водой до метки. Чтобы проверить пригодность раствора, к 3 мл его прибавляют 0,1 мл 0,125%-ного раствора вератрола в этиловом спирте. Если через несколько минут смесь окрашивается в желто-зеленый цвет, раствор кислоты не пригоден.

Методика опыта. Пипеткой Мора отмеряют 10 мл вытяжки и добавляют 2 мл 10%-ного раствора метафосфорной кислоты, перемешивают и спустя 10 мин центрифугируют или фильтруют.

В центрифужную пробирку отмеряют 5 мл прозрачного центрифугата или фильтрата и добавляют 1,25 г порошка Са (ОН)₂ для осаждения углеводов. Содержимое пробирки тщательно размешивают несколько раз стеклянной палочкой. Дают постоять около получаса и центрифугируют. 0,5 мл прозрачного бесцветного не содержащего сахара (проба с α-нафтолом) центрифугата помещают в хорошо вымытую хромовой смесью чистую и сухую пробирку. Охлаждают смесь льдом при постоянном взбалтывании и добавляют постепенно 3 мл раствора H₂SO₄ для перевода молочной кислоты в ацетальдегид. Пробирку ставят на 4 мин в кипящую водяную баню и тотчас же после этого ставят вновь в воду со льдом. Через 2 мин прибавляют точно 0,1 мл 0,125%-ного раствора вератрола и взбалтывают. Спустя 20 мин колориметрируют через синий светофильтр в фотоэлектроколориметре. Количество молочной кислоты определяют по калибровочной кривой, для построения которой берут растворы, содержащие от 0,01 мг до 0,1 мг или даже до 2 мг кислоты в 1 мл. К 0,5 мл этих растворов добавляют 3 мл раствора H₂SO₄, ставят на 4 мин в кипящую водяную баню и тотчас после этого — в лед. Через 2 мин прибавляют 0,1 мл раствора вератрола и взбалтывают. Через 20 мин колориметрируют и составляют калибровочную кривую.

Исследование дыхания растений

Процесс аэробного (кислородного) и анаэробного дыхания является не только источником энергии, необходимой для осуществления разнообразных реакций, для роста и движения, но и источником образования большого количества промежуточных продуктов, которые служат материалом для синтеза. Химические превращения при аэробном дыхании схематично можно выразить в виде следующего уравнения:



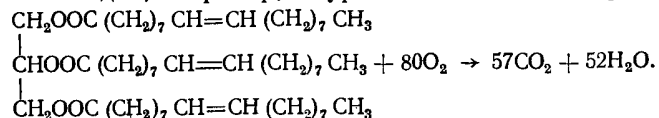
При полном окислении грамм-молекулы гексозы выделяется 2821,88 кДж тепла.

Приведенное схематичное уравнение аэробного дыхания не дает представления о многочисленных ферментативных реакциях, протекающих при дыхании.

Конечными продуктами брожения (в зависимости от его типа) являются этиловый спирт и CO₂, молочная или масляная кислоты, а также другие продукты, которые бывают у того или иного вида растительного организма.

Процесс дыхания и его тип у растений характеризуется дыхательным коэффициентом. Он представляет собой отношение объема выделенного за определенное время углекислого газа к объему поглощенного за этот же промежуток времени кислорода $\left(\frac{CO_2}{O_2}\right)$ и обозначается ДК.

Если процесс аэробного дыхания идет в строгом соответствии с уравнением окисления гексозы, то дыхательный коэффициент будет равен единице. При окислении жирных кислот — соединений, бедных кислородом и богатых водородом, — дыхательный коэффициент будет значительно меньше единицы, он примерно равен 0,7. При окислении жиров в процессе дыхания объем выделенного CO_2 будет меньше объема поглощенного кислорода, так как часть его расходуется на окисление водорода. Это видно, например, из уравнения окисления триолеина:



В этом случае $\text{ДК} = \frac{57}{80}$, т. е. $\text{ДК} = 0,71$. При окислении белков в процессе дыхания $\text{ДК} \approx 0,80$. Белки по количеству кислорода занимают промежуточное положение между углеводами и жирами. Высокий дыхательный коэффициент у растительных организмов (например, у дрожжей), у которых наряду с аэробным дыханием протекает анаэробное дыхание (спиртовое брожение). В этом случае выделяется значительное количество CO_2 , а кислорода поглощается мало. Анаэробное дыхание (спиртовое брожение) наблюдается на разных этапах прорастания зерна, когда плотная оболочка малодоступна для кислорода воздуха. Но как только зародыш нарушил (пробил) оболочку, процесс анаэробного дыхания прекращается. Дыхательный коэффициент повышается тогда, когда окисляются соединения, богатые кислородом, например щавелевая, винная и другие подобные им органические кислоты. Процесс дыхания сопровождается уменьшением массы растительного организма (зерна, клубня, корнеплода и др.). Изменяется состав окружающего воздуха: количество CO_2 в нем увеличивается, а количество кислорода уменьшается. Увеличивается количество влаги и выделяется тепло (повышается температура).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЫХАТЕЛЬНОГО КОЭФФИЦИЕНТА

Эвдиометрический метод определения дыхательного коэффициента.

Методика опыта. Проросшее зерно 3 (рис. 50) или 1—2 ростка помещают в замкнутый ртутью 1 эвдиометр емкостью 50 мл, который представляет собой градуированную толстостенную запаянную стеклянную трубку 2. Зерна закрепляют снизу неплотным тампончиком ваты 4 (лучше стеклянной). Эвдиометр устанавливают в небольшой кристаллизатор и замыкают ртутью. Во внутреннюю часть эвдиометра вкладывают тонкую каучуковую трубку так, чтобы оба ее конца сообщались с воздухом: один конец в трубке эвдиометра, другой — снаружи. При этом высота ртути в эвдиометре должна быть равна 2 см. Затем трубку вынимают и через загнутую стеклянную трубку вводят в эвдиометр немного воды 5. Прибор укрепляют в штативе так, чтобы уровень ртути в нем и в кристаллизаторе был одинаковым. После того как температура эвдиометра станет одинаковой с воздухом, делают первый отсчет по нижнему краю воздушно-водяного мениска. Парал-

лельно ставят в тех же самых условиях, но без зерна контрольный опыт. Емкость эвдиометра в контрольном опыте должна быть в 2—3 раза больше, чем в рабочем, т. е. 100—150 мл. Контрольный эвдиометр служит показателем изменений объема газа в связи с изменением давления воздуха за весь период проведения опыта. Изменения, наблюдаемые в контрольном эвдиометре, выражают в процентах, которые являются поправкой к результатам, полученным в опыте. Опыт длится 12—24 ч в темноте. В конце опыта второй отсчет, после которого в эвдиометр пинцетом вводят кусочек КОН и осторожно в течение 5 мин перемешивают. КОН поглощает CO_2 , и уровень ртути в эвдиометре повышается. Прибор оставляют еще на 15 мин для полного поглощения CO_2 и выравнивания температуры его с температурой окружающего воздуха. Затем делают третий отсчет. Дыхательный коэффициент вычисляют по формуле

$$\text{ДК} = \frac{v_2 - v_3}{v_1 K - v_3},$$

где v_2 — второй отсчет по окончании опыта, мл; v_3 — третий отсчет после введения КОН, мл; v_1 — первый отсчет в начале опыта; K — поправка контрольного опыта на изменение давления.

Пример расчета. Первый отсчет (v_1) по эвдиометру был 48,2 мл. В конце опыта, до введения КОН, второй отсчет (v_2) был равен 46,3 мл, третий (v_3) — 42,6 мл. Объем газа в контроле в связи с изменением барометрического давления уменьшился на 2,32%, таким образом, $K = 0,9768$. Коэффициент вычисляют следующим образом. Вместо 100 мл начального объема газа при изменившемся давлении в конце опыта имеем 97,68 мл, а 1 мл при этих условиях соответствует 0,9768 мл. Последняя цифра и является поправочным множителем (K) к первому отсчету объема газа в эвдиометре. Подставляем полученные величины в формулу и определяем дыхательный коэффициент:

$$\text{ДК} = \frac{46,3 - 42,6}{48,2 \cdot 0,9768 - 42,6}.$$

Кроме этого простого, но не очень точного метода, дыхательный коэффициент определяют еще с помощью газового анализа. Растение помещают в герметично замыкаемый сосуд с газоотводными трубками, из которых в определенные промежутки времени отбирают порции газа и анализируют в газоанализаторах.

Весовой метод определения выделяемого CO_2 при дыхании (по К. П. Петрову). Обычно при учете интенсивности дыхания растений определяют только количество выделяемого CO_2 , что значительно проще проведения полного анализа газов.

Количество выделяемой углекислоты при дыхании растений можно определить весовым методом в аппарате, представленном на рис. 51. Аппарат состоит из следующих частей: U-образной трубки 1, наполненной гранулированной натронной известью для поглощения CO_2 из просасываемого воздуха; склянки Тищенко 2 с 60%-ным раствором КОН, удерживающей возможный проскок CO_2 ; U-образной трубки 3, закрываемой черной бумагой, вмещающей 600 штук проросшего зерна

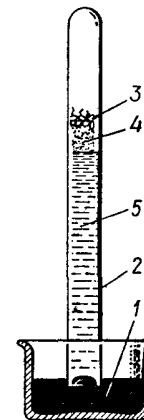
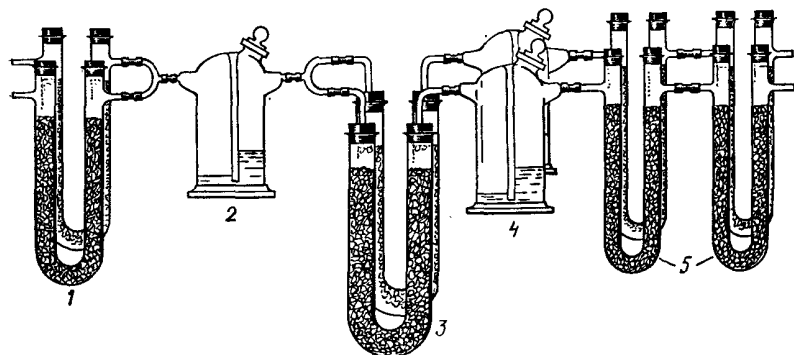


Рис. 50. Эвдиометр.



или другой растительный материал; склянки Тищенко 4 с концентрированной H_2SO_4 ($d = 1,84$), поглощающей влагу растения при прохождении воздуха; двух U-образных трубок 5 с гранулированным $CaCl_2$ для поглощения возможного проскока влаги; кали-аппарата 6, наполняемого на 2/3 его объема через левую трубочку 60%-ным раствором KOH (после наполнения трубочку обтирают снаружи и изнутри фильтровальной бумагой, этот аппарат служит поглотителем выдыхаемой углекислоты¹); двух U-образных трубок 7 с гранулированной натронной известью, удерживающей возможный проскок углекислоты, выдыхаемой растением; хлоркальциевой трубки 8, заполненной наполовину гранулированным $CaCl_2$, а наполовину натронной известью, для изолирования аппарата от возможного попадания CO_2 и паров воды из воздуха; крана 9 для регулирования скорости прохождения воздуха через аппарат; клапана Бунзена 10, предохраняющего от возможного заброса воды при случайной остановке водоструйного насоса или при ослаблении его работы. Просасывать воздух через аппарат можно и другими способами, однако при этом необходимо следить, чтобы количество воздуха, проходящего через параллельные аппараты, было по возможности одинаковым, что контролируется по скорости прохождения пузырьков через кали-аппараты. Скорость просасываемого воздуха в кали-аппарате 6 должна быть 1—2 пузырька в секунду.

Кали-аппарат до и после опыта взвешивают на аналитических весах и по разности масс определяют количество CO_2 , выделившегося в единицу времени. За единицу измерения активности дыхания принимают количество CO_2 (в мг), выделяемое 100 г растения в течение одного часа.

При сравнительных исследованиях ставят два параллельных аппарата.

¹ Кали-аппарат перед каждым взвешиванием закрывают резиновыми трубочками, закрытыми с одной стороны обрезками стеклянной палочки. Следует помнить, что кали-аппарат очень хрупок, при надевании и снятии резиновых трубок, а также при соединении его с другими частями дыхательного аппарата надо держать аппарат за боковую трубочку, возможно ближе к надеваемой части. Так же следует относиться и к U-образным трубкам.

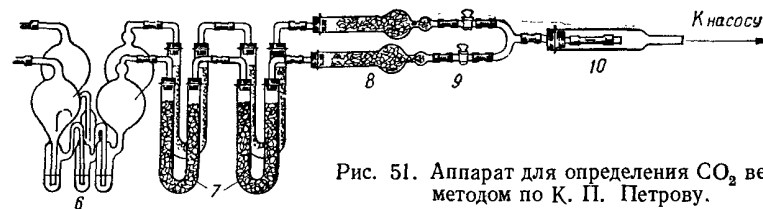


Рис. 51. Аппарат для определения CO_2 весовым методом по К. П. Петрову.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОТЕРИ МАССЫ ПРИ ДЫХАНИИ РАСТЕНИЙ

В процессе дыхания в растении органические вещества окисляются до CO_2 и воды, а поэтому масса исследуемого продукта уменьшается. Это служит одним из существенных показателей интенсивности жизненных процессов в растительном организме. При исследовании настоящего явления исключают влияние света на растение, с которым связано образование органических веществ при фотосинтезе.

Методика опыта. Две пробы, по 100 зерен в каждой, помещают в большие бюксы. Одну пробу сушат в сушильном шкафу при 100—105° С до постоянной массы и определяют ее влажность. Вторую, параллельную, пробу зерна высевают на влажные опилки. Опилки предварительно тщательно кипятят с водой и воду отжимают для удаления растворимых веществ, которые могут быть использованы ростками. Опилки помещают в плоские сосуды (в кристаллизаторы или большие чашки Петри). Сосуды с зерном помещают в темное теплое место и ежедневно увлажняют дистиллированной водой. Опыт ведут в течение 2—3 недель. Полученные этиолированные ростки тщательно отделяют от опилок, сохраняя мелкие корешки. Высушивают вначале при комнатной температуре на большом часовом стекле. Затем еще раз тщательно освобождают от опилок и доводят до постоянной массы при 100—105° С. Непроросшие зерна не учитывают. По разности массы сухого вещества зерна (доведенного до постоянной массы) до прорастания и после судят о количестве потерянной сухой массы при дыхании в процессе прорастания.

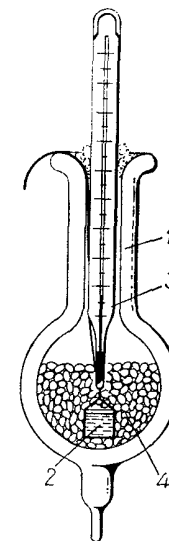


Рис. 52. Прибор для определения температуры при дыхании растений.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОВЫШЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ПРИ ДЫХАНИИ РАСТЕНИЙ

Процесс окисления органических веществ при дыхании растений сопровождается выделением тепла и повышением их температуры. Повышение температуры в процессе дыхания наблюдают в специальном приборе (рис. 52), состоящем из сосуда Дьюара 1, в который помещают стаканчик 2 с раствором едкого кали для поглощения CO и термометр 3. В сосуд помещают прорастающее зерно 4 или части растений и наблюдают за изменением температуры. Температура повышается до 30—40° С и даже выше.

Приготовление водной вытяжки. Навеску сухого материала (5—10 г) тщательно растирают в фарфоровой ступке с толченым стеклом, количественно переносят в колбу Эрленмейера емкостью 250 мл, заливают 200 мл дистиллированной воды и нагревают на кипящей водяной бане 1 ч. Смесь охлаждают, количественно переносят в мерную колбу (250 мл) и доводят водой до метки. Содержимое колбы хорошо перемешивают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Для определения кислот берут точный объем прозрачного фильтрата.

Качественные реакции на молочную кислоту. 1. Около 1—2 мл вытяжки вносят в сухую пробирку и прибавляют 2 мл H_2SO_4 ($d=1,84$). Смесь нагревают на кипящей водяной бане и после охлаждения прибавляют к ней 2—3 капли 5%-ного спиртового раствора гваякола, раствор окрашивается в розово-красный цвет.

2. Молочная кислота с $FeCl_3$ дает желтое окрашивание.

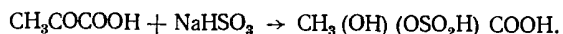
3. В сухую пробирку вносят 5 мл 0,1%-ного раствора $KMnO_4$ и добавляют 2—3 капли вытяжки, появляется запах уксусного альдегида.

Качественные реакции на пировиноградную кислоту. 1. Реакция на кетогруппу (образование иодоформа). В сухую пробирку вносят 2 мл 0,1 н. раствора I_2 в KI и прибавляют 1—2 капли испытуемого раствора, а затем по каплям при взбалтывании прибавляют 10%-ный раствор $NaOH$ до образования иодоформа с характерным запахом.

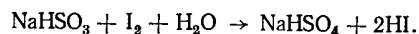
2. К исследуемому раствору добавляют раствор β -нафтола в концентрированной H_2SO_4 ($d = 1,84$), появляется красная окраска, при нагревании переходящая в синюю.

3. Раствор исследуемого продукта в аммиаке с раствором нитропруссиды натрия дает характерное фиолетово-синее окрашивание, переходящее от прибавления уксусной кислоты в синее, а от прибавления KOH — в темно-красное.

Иодометрическое определение пировиноградной кислоты производят объемным методом, построенным на принципе взаимодействия ее с гидросульфитом калия или натрия:



Избыток прибавленного гидросульфита определяют титрованием раствором I_2 в растворе KI



Образовавшиеся пировиноградно-сульфитные соединения разлагают и гидросульфит титруют иодом.

Методика определения. В колбу Эрленмейера емкостью 100 мл отмеряют пипеткой 25 мл фильтрата и прибавляют (для осаждения белков) несколько капель 5—10%-ного раствора фосфорновольфрамовой кислоты. Осадок отфильтровывают и отбирают пипеткой Мора 5—10 мл фильтрата в небольшую коническую колбу. Затем прибавляют 3 мл 1%-ного раствора гидросульфита, хорошо перемешивают и оставляют на 30 мин. Избыток гидросульфита связывают вначале 0,1 н., а затем 0,01 н. раствором I_2 в растворе KI . Комплексное соединение пировиноградной кислоты с гидросульфитом разрушают, добавляя 1 г сухого $NaHCO_3$, и выделившийся $NaHSO_4$ оттитровывают 0,01 н. раствором I_2 в растворе KI , 1 мл этого раствора соответствует 0,14 мг пировиноградной кислоты. Этот метод в присутствии больших количеств аминокислот сопровождается значительными погрешностями.

Кроме описанного метода, известны колориметрический и хроматографический методы определения пировиноградной кислоты. Колориметрический метод построен на принципе образования гидразона в результате реакции пировиноградной кислоты с фенилгидразином. Гидразон с $NaOH$ дает цветную реакцию.

Приготовление некоторых реактивов. Гидразоновый реактив в ступке растирают 100 мг 2,4-динитрофенилгидразина с возрастающими небольшими порциями 2 н. раствора HCl до тех пор, пока не будет добавлено ее 100 мл (хранить в холодильнике).

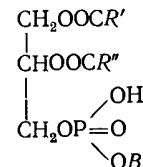
Методика определения. Готовят стандартный раствор пировиноградной кислоты, которую перегоняют в вакууме ($1,33 \text{ кн/м}^2$, или 10 мм рт. ст.); используют фракцию, собранную при $55\text{--}60^\circ \text{C}$. 25 мг пировиноградной кислоты разбавляют дистиллированной водой до 25 мл и проверяют содержание ее вышеописанным способом. Далее раствор разбавляют с таким расчетом, чтобы 1 мл содержал 0,01 г (10 мкг) пировиноградной кислоты. Из этого раствора берут пробы по 0,125; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75 и 2,00 мл. Каждую пробу разбавляют до 3 мл 10%-ным раствором трихлоруксусной кислоты, прибавляют 1 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, обрабатывают 8 мл толуола и извлекают 6 мл 10%-ного раствора Na_2CO_3 . Из этого экстракта берут 5 мл, прибавляют к ним 6 мл 1,5 н. раствора $NaOH$ и колориметрируют в фотоэлектроколориметре, учитывая, что взято для колориметрирования $5/6$ исходного количества пировиноградной кислоты.

По показателям колориметра строят калибровочную кривую, по которой можно вычислить содержание пировиноградной кислоты в исследуемом фильтрате, полученном из вытяжки растительного материала вышеописанным способом.

Кетокислоты в растительных продуктах можно определить методом распределительной хроматографии на бумаге, разработанным И. А. Егоровым и М. Б. Борисовой для анализа кетокислот в вине. В основу этого метода положена реакция образования гидразонов кислот при взаимодействии их с фенилгидразином. Гидразоны разделяют с помощью бумажной двухмерной хроматографии. Количество гидразона на каждой отдельно выделенной кетокислоте, в том числе и пировиноградной, определяется после элюирования пятен в фотоэлектроколориметре по цветной реакции гидразона с $NaOH$. Р. Я. Школьник (1954) разработал метод количественного разделения органических кислот с помощью распределительной хроматографии на силикагеле. Этот метод применяют для разделения кислот, находящихся в растительных тканях. Разделение кислот ведут на хроматографической колонке. Элюируемые кислоты титруют 0,01 н. спиртовым раствором $NaOH$.

Жироподобные вещества

К этой группе соединений относят фосфатиды, которые, подобно жирам, являются сложными эфирами глицерина и жирных кислот. Кроме того, они содержат в своей молекуле фосфорную кислоту и связанные с ней азотистые основания. Представителями фосфатидов являются лецитины и кефалины. Эти соединения отличаются одно от другого тем, что в состав лецитинов в качестве азотистого основания входит холин, в состав кефалинов — коламин (аминоэтиловый спирт). Общая формула фосфатидов следующая:



где R' и R'' являются остатками жирных кислот; B — азотистое основание (холин или коламин).

В растениях, у животных и микробов обнаружены фосфатиды, содержащие в своем составе инозит (инозитфосфатиды). В головном мозге найдены серинфосфатиды, которые содержат связанный с фосфором серин. Известны фосфатиды, содержащие и другие соединения. Состав фосфатидов также изменяется в зависимости от характера

жирных кислот, связанных сложной эфирной связью с глицерином. Таким образом, в растительном и животном мире есть множество самых разнообразных по своему химическому составу фосфатов. Количество азотистых групп, соединенных с фосфорной кислотой, в них может быть также различным, а поэтому среди них могут быть моноаминомонофосфатиды, диаминомонофосфатиды и моноаминодифосфатиды. Фосфатиды, особенно лецитины, часто применяют в пищевой промышленности при изготовлении шоколада и маргарина. В хлебопекарном производстве их применяют как замедлители черствения хлеба, ускорители процесса созревания теста и как вещества, улучшающие качество хлеба и повышающие его пищевую ценность. Фосфатиды играют роль антиоксидантов, предотвращая окисление и прогоркание жиров.

Кроме фосфатидов в состав липоидов входят стериды — сложные эфиры жирных кислот и высокомолекулярных спиртов (стеролов). К числу этих веществ принадлежат витамины группы D.

Весьма важными жироподобными соединениями, широко распространенными в природе, являются воски, которые также подобны жирам. Это сложные эфиры жирных кислот и одноатомных спиртов жирного ряда (реже циклических) с высокой молекулярной массой. В состав природных восков, кроме сложных эфиров, входят в небольшом количестве свободные кислоты, спирты и углеводы парафинового ряда. В растениях и у животных найдено довольно большое количество разнообразных восков. Воски покрывают тонким слоем листья, стебли, стволы и плоды растений, предохраняя их от неблагоприятного воздействия внешней среды (поражения микроорганизмами, высыхания, смачивания и др.). Среди животных восков наибольшее практическое значение имеет пчелиный воск и воск овечьей шерсти (ланолин); последний широко используют в парфюмерии. Воски, так же как фосфатиды и стериды, встречаются в жирах.

В маслах и жирах встречаются также жирорастворимые пигменты — хлорофилл и липохромы (каротиноиды, каротины и ксантофилл). В природных маслах и жирах, кроме перечисленных веществ, содержатся витамины А, D, Е и К. Жироподобные вещества входят в состав природных масел и жиров и придают им соответствующий вкус, запах и цвет. В ряде случаев они повышают пищевую ценность масел (жиров). Такие вещества, как углеводороды, высокомолекулярные спирты, пигменты, стериды, витамины и другие, относятся к неомыляемым составным частям масла (жира).

Определение неомыляемых веществ. Качественная реакция. К 3—4 каплям масла (или жира), добавляют кусочек КОН (величиной с горошину) и 5 мл абсолютно-этилового спирта. Смесь кипятят 1 мин, после чего прибавляют 3—4 мл дистиллированной воды. При содержании неомыляемых веществ более 1% раствор мутнеет.

Количественное определение основано на обработке мыла серным эфиром. Из полученной вытяжки отгоняют эфир, остаток взвешивают.

Методика определения. На аналитических весах в фарфоровую чашку взвешивают 2—3 г фильтрованного масла (или жира), добавляют 10 мл 2 н. спиртового раствора КОН и нагревают, непрерывно помешивая, на небольшом пламени до полного испарения спирта. Остаток растворяют в небольшом количестве спирта и снова нагревают до полного испарения его. Затем остаток растворяют в 50 мл дистиллированной воды и добавляют 10 мл этилового спирта, необходимого для предотвращения возможной диссоциации мыла. Спирта должно быть не более 20%, иначе он растворит много эфира. Полученный раствор мыла взбалтывают три раза с серным эфиром, обмывая последний фарфоровую чашку. Первый раз берут 50 мл эфира, второй и третий раз — по 25 мл. Собранные эфирные вытяжки в делительной воронке взбалтывают с несколькими миллилитрами 1 н. раствора HCl и 10 мл дистиллированной воды. После осветления отделяют эфирный слой и взбалтывают его со смесью 7 мл воды, 2 мл этилового спирта и 1 мл 1 н. раствора КОН (последний готовят из 2 н. спиртового раствора, разбавляя его в два раза спиртом) в присутствии 2—3 капель фенолфталеина. Смесью оставляют на ночь для отстаивания, после чего сливают эфирный слой в фарфоровую чашку и упаривают эфир на водяной бане. Остаток после упаривания растворяют в 10 мл горячего спирта и количественно переносят с помощью возможно меньшего объема спирта в предварительно взвешенную небольшую фарфоровую или стеклянную чашку и упаривают на кипящей водяной бане. Остаток сушат в сушильном шкафу (при 100° С) до постоянной массы.

Количество неомыляемых веществ (x) в процентах находят по формуле:

$$x = \frac{(a - b) 100}{g},$$

где (a — b) — разность масс чашечки с неомыляемыми веществами и пустой, г; g — навеска масла, г.

Лецитины. Лецитины очень широко распространены в живой природе, ими особенно богаты клетки и органы, способные к размножению. Значительное количество лецитинов содержится в зерне пшеницы, ржи, ячменя, в грибах, дрожжах и бактериях. Лецитин — это желтоватое воскообразное вещество, растворимое в эфире и теплом этиловом спирте; в воде набухает. При хранении на воздухе лецитины темнеют и приобретают темно-коричневый цвет, что связано с окислением ненасыщенных жирных кислот, входящих в их состав.

Характерной качественной реакцией на лецитины является обнаружение фосфора молибдатом аммония, который образует с фосфором осадок желтого цвета. В лабораторной практике часто для препарирования лецитинов пользуются сухим яичным желтком, содержащим значительные их количества. Лецитины можно также извлечь из семян злаковых и семян богатых жиром.

Препаративное получение лецитинов. Способ препарирования лецитинов основан на растворении их эфиром или горячим алкоголем и осаждении ацетоном. Семена (особенно богатые жиром) вначале грубо измельчают на обыкновенной мельнице и обезжиривают эфиром методом настаивания. Обезжиренный материал сушат на воздухе и тщательно тонко измельчают. Муку экстрагируют этиловым спиртом (96%), для чего берут четырехкратное количество алкоголя от массы муки и выдерживают в течение часа при температуре 50—60° С, периодически встряхивая содержимое колбы. Затем экстракт отфильтровывают и упаривают в фарфоровой чашке на водяной бане (при температуре не выше 50—60° С). Лучше упаривать в вакууме в токе углекислого газа. Полученный сухой остаток обрабатывают на холоду эфиром. Для удаления из эфирной вытяжки посторонних веществ, растворимых в воде, ее переводят в делительную воронку и промывают водой. При образовании эмульсии добавляют небольшое количество сухого NaCl. Эфирный раствор лецитина промывают несколько раз водой, затем отделяют и сушат обезвоженным Na₂SO₄, который добавляют в виде тонкого порошка. Всю эту смесь оставляют до следующего дня. Количество Na₂SO₄ считают достаточным, если после стояния он легко взмучивается при наклонении колбы или склянки. Если осадок не взмучивается, то надо еще добавить Na₂SO₄. После высушивания эфир фильтруют и Na₂SO₄ промывают на фильтре сухим эфиром. Растворитель отгоняют в доволно чистом виде. Остаток промывают ацетоном. Лецитины получают в доволно чистом виде. Для дальнейшей и лучшей очистки рекомендуют еще раз растворить осадок в эфире и осадить ацетоном. При препарировании лецитинов по возможности все операции проводят в токе инертного газа, лучше в токе СО₂, получаемого из аппарата Киппа. Так как углекислый газ тяжелее воздуха, то им можно наполнять пустое пространство в делительной воронке, в склянках и т. д. Углекислый газ предварительно промывают раствором соды и сушат последующим пропусканием его через концентрированную серную кислоту. Лецитины неустойчивы не только на воздухе, но и на свету, поэтому их сушат и хранят в темном месте. Если для сушки и хранения используют эксикатор, то его ставят в темное место или накрывают темной тканью.

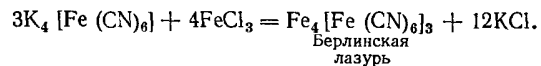
Получение лецитина из желтка куриного яйца. В небольшой химический стакан помещают 1/3 часть желтка и добавляют 15 мл горячего спирта. Смесь охлаждают и фильтруют в другой сухой стаканчик. Если фильтрат мутный, то фильтрование повторяют. В отдельной пробе проводят качественное испытание на содержание лецитина. Для этого в сухую пробирку наливают 3 мл ацетона и в него по каплям прибавляют немного фильтрата; появление мути указывает на выпадение осадка лецитина. Прозрачный спиртовой экстракт лецитина осторожно выпаривают в токе СО₂ на водяной бане до 1/3 объема и по каплям добавляют ацетон. Выпавший осадок отфильтровывают и два раза промывают небольшим количеством ацетона.

Для получения больших количеств препарата лецитина берут сухой яичный желток или мозг животного. Яичный желток сушат на стекле сухим воздухом при температуре не выше 30—35° С, постоянно переворачивая тонкий слой шпателем.

Препарат хранят с углекислым газом в темном месте и используют для качественных реакций. При дальнейшей очистке получают насыщенный спиртовой раствор приготовленного препарата и осаждают из него лецитины, добавляя ацетон.

Качественные реакции на лецитины. 1. Полученный препарат лецитина помещают в пробирку, добавляют 10%-ный раствор NaOH и кипятят 20 мин. При этом происходит гидролиз фосфатидов. Отщепляющийся холлин подвергается дальнейшему расщеплению с появлением характерного для него селедочного запаха (триметиламин). Гидролизат разбавляют небольшим количеством воды, подкисляют 10%-ным раствором HCl до слабо кислой реакции (на лакмус) и отфильтровывают на водяной бане. Сухой остаток сплавляют в тигле со смесью, состоящей из двух частей Na_2CO_3 и одной части KNO_3 . Сплав осторожно прокаливают до полного окисления. Зольный остаток растворяют в 10%-ном растворе HNO_3 и добавляют молибденовый реактив. После непродолжительного нагревания наблюдают выпадение желтого осадка фосфомолибдата аммония, который указывает на присутствие фосфатидов.

2. Кроме фосфора, в исследуемом препарате может быть определен азот. Эта реакция построена на том принципе, что при прокаливании испытуемого препарата с металлическим калием образуется цианид калия, который с гидроксидом железа дает желтую кровяную соль — $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Последняя с солями железа (III) образует синий осадок берлинской лазури по уравнению:



Методика определения. Небольшое количество фосфолипидного препарата помещают в пробирку с зернышком металлического калия и прокаливают. Раскаленную пробирку тотчас опускают (осторожно, под тягой!) в стаканчик с 5 мл дистиллированной воды. Пробирка ломается, и полученный раствор отфильтровывают. К фильтрату добавляют немного раствора железного купороса и кипятят 1—2 мин. Смесью охлаждают, добавляют 2—3 капли раствора FeCl_3 и подкисляют разбавленной HCl. Выпадает синий осадок берлинской лазури. Если азота было мало, то жидкость приобретает зелено-синюю окраску и осадок выделяется после стояния. Состав фосфолипидов анализируют на основании определения в них фосфора и азота. Так, например известно, что в лецитинах и кефалинах содержится 1,70—1,80% азота, 3,75—4,04% фосфора. Отношение между фосфором и азотом (P : N) в различных фосфолипидах следующее: моноаммонофосфатиды — 1 : 1; моноамнодифосфатиды — 2 : 1; диаминомонофосфатиды — 1 : 2.

Бессонов С. М. Исследование пищевых продуктов. М., Госторгиздат, 1949.

Биохимические методы анализа растений. Под ред. М. Н. Запрометова. М., Изд-во иностр. лит., 1960.

Вайвазов Б. В. Практическое руководство по хроматографии. М., «Высшая школа», 1968.

Коловер Э. Молекулярная биохимия. М., «Мир», 1964.

Методическое руководство по определению витаминов. Под ред. Б. А. Лаврова. М., Медгиз, 1960.

Остапеч М. Г., Романська Н. М. Практикум з біохімії. Київ, «Вища школа», 1974.

Петров К. П. Практикум по биохимии пищевого растительного сырья. М., «Пищевая промышленность», 1965.

Петров К. П. Рефрактометрический метод определения ферментативной активности зерна, муки и продуктов их переработки. — В сб.: Биохимия зерна и хлебопечения. М., Изд-во АН СССР, 1960, с. 283.

Петров К. П. Аппарат «Знмограф» для определения бродильной активности дрожжей и исследование им активизирующего действия янтарной кислоты. — «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1962, № 4, с. 157.

Петров К. П. Метод комплексного определения водорастворимых легкоокисляющихся сульфгидрильных соединений. — «Известия вузов СССР. Пищевая технология», 1976, № 2, с. 142.

Хроматография на бумаге. Под ред. М. Н. Запрометова. М., Изд-во иностр. лит., 1962.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Авитаминозы 114
 Аденозин 58
 — дифосфат (АДФ) 36
 — монофосфат (АМФ) 36, 58
 — трифосфат (АТФ) 36, 58
 Азот 5—12, 47—54
 — определение 5—12
 — амидного 10—13
 — аминного формальным титрованием со смешанными индикаторами (фенолфталеина и бромтимолола синего) см. *Аминокислоты* 16—19
 — по реакции с медными солями (по Попе и Стивенсу) см. *Аминокислоты* 18—19
 — летучих оснований 5—10
 — определение 5—12
 — колориметрическое аммиака 9—10
 — по Балаховскому и Брунсу 8—9
 — по Конвей и Байрну 7—8
 — по Лонги 5—7
 — общий 47—54
 — определены 47—54
 — гипобромитным методом 53—54
 — по Кьельдалю 47—53
 — макрометодом 48—51
 — микрометодом 51—53
 Активаторы и парализаторы см. *Ферменты* 63
 Альбумины и глобулины, выделение из семян см. *Белки* 35
 Альдегиды, определение 149—150, 151, 173—174, 195—197
 — качественное 149—150, 202
 — количественное 151, 173—174, 195—197
 — колориметрическое в жирах и маслах (по К. П. Петрову) см. *Жиры* 195—197
 Альдозы см. *Углеводы* 149—151, 153
 Амид никотиновой кислоты см. *Витамины* 105, 135
 Амилазы см. *Ферменты* 92—103
 Аминокислоты, определение 13—34
 — качественное 13—16
 — аспарагиновой и глутаминовой кислот методом электрофореза на бумаге по модификации (по М. И. Барабанову и И. М. Литваку 32—34)
 — методом двумерной бумажной хроматографии 28—29
 — методом одномерной хроматографии на бумаге 26—29
 — количественное 16—34
 — методом разделения на бумаге 26—29
 — колориметрическое, тирозина 19
 — метионина по Салливану — Мак-Карти 20
 — хроматографическое аспарагиновой и глутаминовой по В. Л. Кретовичу и А. А. Бундель 22—26
 Аппарат
 — автоматический записывающий «зимометр» (по К. П. Петрову) 87
 — модифицированный «зимометр» 90
 — Балаховского и Брунса 8
 — для определения альдегидного числа (по К. П. Петрову) 196
 — для определения количества CO₂ весовым методом (по К. П. Петрову) 212—213

— для отгонки летучих оснований (по Лонги) 6
 — Зайченко 182
 — Кьельдалю 49—52
 — для макрометода 49—51
 — для микрометода 52
 — Сокслета 180
 — Цейзеля и Фанто 185
 — модифицированный 186
 Арабиан см. *Углеводы* 168, 170—171, 172
 Аскорбиновая кислота см. *Витамины* 115, 128—132
 Аспарагин 10—11
 Аспарагиновая кислота 17, 22—23, 25—27, 32—33

Белки 34—62
 — выделены альбуминов и глобулинов из семян 42—45
 — определение 36—62
 — быстрым колориметрическим методом 54—56
 — изоэлектрической точки 36—37
 — осаждение 38—41
 — алкалоидными реактивами 40—41
 — нагреванием, кислотами и высаливанием 38—40, 41
 — разделение и очистка 42—47
 — диализом 42—43
 — кристаллизацией и лиофилизацией 43—44
 — электрофорезом 45—47
 Боратный буфер 46
 Брожение 85—92
 — определение бродильной активности дрожжей 86—87
 — в автоматическом записывающем аппарате «зимометре» (по К. П. Петрову) 87—89
 — в модифицированном аппарате «зимометре» 89—90
 — непосредственно в производственных установках «зимометром» (по К. П. Петрову) 90—92
 Буизена клапан 6

Весовой метод определения CO₂ при дыхании растений (по К. П. Петрову) 211—212
 Витамины 114—147
 — группы А, определение 115—147
 — колориметрическим методом 118—120
 — спектрофотометрическое 121
 — В₁ 137—144
 — качественные реакции 137—138
 — количественное определение 138—141
 — методом флуоресценции (визуально) 138—140
 — упрощенным объемным методом 140—141
 — В₂ 141—144, 105—106
 — качественная реакция 141—142
 — количественное определение 142—144
 — колориметрическим методом (по Л. Н. Кравчиной) 144
 — флуориметрическим методом 142—144

— В₆ 144—145
 — качественная реакция 145
 — С, определение 128—135
 — в жидких продуктах 132
 — в твердых продуктах 132—133
 — в окрашенных вытяжках (по И. К. Мурин) 134
 — по восстановлению натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндифенола 129—132
 — упрощенным методом 134—135
 — группы D 122
 — качественная реакция 124
 — количественное определение колориметрическим методом 124—125
 — группы E 127—128
 — колориметрическое определение (по Б. Г. Савинову и Г. М. Луцевской) 127—128
 — «РР» 105, 135—137
 — качественные реакции 136
 — колориметрическое определение (по В. М. Иосифовой) 136—137
 — холин 145
 — колориметрическое определение 146—147
 ВОНВЛОСС (по К. П. Петрову) см. *Ферменты* (активаторы и парализаторы) 63—67

Гемидцеллюлозы см. *Углеводы* 167—168
 Гидролазы см. *Ферменты* 62, 67—103
 Гипервитаминоз 114
 Гиповитаминоз 114
 Глицерин 179, 184—187
 — количественное определение в жирах и маслах 184—187
 — выяснением 184
 — по Жукову и Шестакову 184
 — по Цейзелю и Фанто 185—186
 — в модифицированном аппарате Цейзеля и Фанто 186—187
 Глюкоза см. *Углеводы* 153—154, 158—160, 161
 Глютамин 10—12
 Глютаминная кислота 11, 16—17, 22—26, 32—33, 63
 Глютамин 63—67
 — определение количества (по К. П. Петрову) 63—67
 — восстановленного 63—66
 — окисленного 64—66

Дегидроаскорбиновая кислота см. *Витамины* 133—134
 Дегидрогеназы см. *Ферменты* 105—106
 Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) 57, 60
 Днастазы 100—103
 Диализ 42—43
 Дигитонин получение (по В. Н. Букину и И. Н. Горкиной) 126—127
 Дубильные вещества 204—208
 — качественные реакции 206—207
 — количественное определение 207—208
 — весовым методом 207
 — перманганатометрическое 206—207
 — хроматографическое 207—208
 Дыхание растений, определение 209—213
 — потери массы при дыхании 213
 — CO₂ см. *Весовой метод* (по К. П. Петрову) 211—213
 Дыхательный коэффициент 210—211
 — определение эвдиометрическим методом 210—211

Жиры 177—198
 — качественная реакция 178—179
 — на образование пятна 178
 — на омыление 178
 — проба с акроленом 179

— проба с бромом 199
 — количественное определение 179—182
 — в аппарате Зайченко 18
 — по обезжиренному остатку (по Рушковскому) 182
 — по Сокслету 179—181
 — определение физических показателей 191—192
 — относительной плотности 192
 — показатели преломления 192
 — температуры плавления 191
 — определение химических показателей 182—191
 — альдегидного числа (по К. П. Петрову) 195—197
 — иодного числа 187—190
 — быстрым методом 189—190
 — по Гюблю 187—189
 — с хлоридом мода (без применения сулемы) 190
 — кислотного числа 182—183
 — количества глицерина см. *Глицерин* 184—187
 — количества летучих жирных кислот растворимых
 — в воде (число Рейхерта — Мейслея) 190—191
 — в спирте (число Полenske) 191
 — оксикислот (по Фарноу) 197—198
 — перекисей (перекисного числа) 194—195
 — состава жирных кислот (принцип) 192
 — степени окисления 192—194
 — числа омыления 183—184
 — эфирного числа 184

Зимометр (по К. П. Петрову) см. *Аппарат* 87
 Зимометр (по К. П. Петрову) см. *Прибор* 91

Изоэлектрическая точка белков см. *Белки* 36—37
 Инверсия см. *Ферменты* 77—85
 Инулин см. *Углеводы* 166—167

Карбогидразы см. *Ферменты* 77—86, 92—103
 Каротины определение хроматографическим методом 116—118
 Каталаза см. *Ферменты* 109—111
 Кислотное число жиров и масел см. *Жиры* 182—183
 Кислота молочная 208—209
 — количественное определение ускоренным методом 208—209
 Клетчатка (целлюлоза) 174—176
 — определение количества (по А. И. Ермакову) 175—176
 Крахмал см. *Углеводы* 162—166
 Ксилоза см. *Углеводы* 168, 171

Летучие кислоты см. *Жиры* 190—191
 Лецитин 217
 Лигнин 176
 — количественное определение (по Вильштеттеру и Цейхмстеру) 176—177
 Липазы см. *Ферменты* 73—76
 Липиды см. *Жиры* 177
 Липооксигеназа 106—107, 192

Мальтаза см. *Ферменты* 78, 85—86
 Масло см. *Жиры* 178
 Метионин 20

Никотиновая кислота см. *Витамины* (вит. «РР») 135—136
 Нингидрин 141

Нуклеопротениды 57—60
— качественные реакции 58—59
— дезоксирибонуклеотид 60
— количественное определение РНК и ДНК 60

Оксидазы см. *Ферменты* 111—114
Оксидоредуктазы см. *Ферменты* 105—111
Окисление масел и жиров 192—194
Окисленные формы ВОНВЛОСС и глутатиона см. *Ферменты* (активаторы и парализаторы) 66—67

Пектиновые вещества 171—174
— определение количества объемным броматным методом 173—174
Пентозаны см. *Углеводы* (гемицеллюлозы) 168—170
Пентозы см. *Углеводы* 170—171
Пероксидазы см. *Ферменты* 107—109
Пиридоксин см. *Витамины* (В₆) 144—145
Цитровиноградная кислота
Полиаминтаминозы 114
Полифенолоксидазы см. *Ферменты* 113—114
Полифенольные полимерные соединения 204
Приборы
— гомогенизатор 75
— для восходящей хроматографии 26
— для изменения температуры при дыхании растений 213
— для насыщения соляной кислоты 176
— для определения
— аспарагиновой и глутаминовой кислот электрофорезом на бумаге (по М. И. Барбанову и И. М. Литваку) 32
— — — — — аэробных дегидрогеназ 106
— — — — — мальтазной активности 86
— — — — — пентозанов 109
— для отгонки абсолютного метилового спирта 146
— для проведения ферментативного гидролиза рефрактометрическим методом (по К. П. Петрову) 71
— для электрофореза 31, 32, 45
— клапан Бузена см. *Бузена клапан* 6
— Рейхерта — Мейсля и Поленске 190
— чашка Конвей — Байрна 8
— эвнометр 211
Протеазы см. *Ферменты* 67—73

Редущие сахара см. *Углеводы* (альдозы, кетогексозы и мальтоза) 148—150, 151—153
Регинол см. *Витамины группы А* 115—116, 118—121
Рибоза 57, 159
Рибонуклеиновые кислоты см. *Нуклеопротениды* 57, 60
Рибофлавин см. *Витамины* (В₂) 141—144, 105—106

Сахара см. *Углеводы* 149—161
Сахароза см. *Ферменты* 77—85
Сахароза см. *Углеводы* 154—155
Спирты (алкоголи) 198—203
— метиловый 201
— — — — — качественная реакция 201—202
— — — — — определение количественное 202—203
— — — — — колориметрическим методом 202—203
— — — — — объемным методом 203
— этиловый 198—201
— — — — — качественная реакция 198
— — — — — количественное определение 198—201
— — — — — нодометрическое 198—200
— — — — — по относительной плотности отгона 200—201

Стагагмометр 76
Стагагмометрическое определение липолитической активности см. *Ферменты* 76

Тиамин см. *Витамины* (В₁) 137—141
Тиаминхлорид, определение упущенным методом 140—141
Тирозин определение колориметрическим методом 19
Тирозиназа см. *Ферменты* 112—113
Токоферол см. *Витамин Е* 127—128

Углеводы 147—176
— качественная реакция 149—150
— — — — — альдозы
— — — — — количественное определение нодометрически по Вильштеттеру и Шудлю 151
— — — — — по Офнеру 152
— — — — — L-арабиноза, получение и определение ее констант 170—171
— — — — — гемицеллюлозы 167—170
— — — — — определение суммарного количества 168
— — — — — инулин 166—167
— — — — — определение количества 167
— — — — — качественные реакции с α -нафтолом и тимолом 149
— — — — — кетогексозы, качественная реакция, 149, 152—154, 156—157, 159—161
— — — — — с дифениламино 149
— — — — — с резорцином 149
— — — — — кетосахара, количественное определение 153—154, 156—157, 159—161
— — — — — колориметрическим методом по Кульку 160—161
— — — — — фенольным методом (хроматографически и электрофоретически) 161
— — — — — крахмал, определение 162—166
— — — — — количества 164—166
— — — — — нодометрическим методом (по Н. И. Проскуракову и А. Н. Кожвинковой) 164—165
— — — — — поляриметрическим методом (по Н. А. Архиповичу) 165—166
— — — — — происхождения растительного крахмала 164
— — — — — ксилоза, получение и определение констант 171
— — — — — моно- и олигосахариды 149—161
— — — — — пентозаны, количественное определение объемным методом 168—170
— — — — — пентозы 150—151, 168—171
— — — — — качественные реакции 150
— — — — — на образовании фурфурола с уксуснокислым анилином 150
— — — — — с орцином 166
— — — — — с флороглюцином 150—151
— — — — — полисахариды второго порядка 162—170
— — — — — редуцирующие сахара, качественная реакция с оксидом меди 150
— — — — — сахароза 154—155
— — — — — количественное определение 154—155
— — — — — поляриметрическим методом 165—166
— — — — — химическим методом (по Сокслету) 154—155
— — — — — получение вытяжки из растительного материала 154
— — — — — фруктоза, определение 153, 159, 160—161
— — — — — колориметрическим методом (по Церевитнову и Радзевичу) 153
— — — — — в смеси с глюкозой, дифференцировано (по Кольтофу) 153—154
— — — — — хроматографический анализ 156—161
— — — — — на бумаге 156—161
— — — — — количественный, специфическими методами 159—161
— — — — — методами нисходящей хроматографии (по Г. П. Зайцевой и Т. П. Афанасьевой) 157—158

Ферменты 62—114
— активаторы и парализаторы 63
— — — — — метод комплексного, дифференцированного определения ВОНВЛОССа и восстановленного глутатиона (по К. П. Петрову) 63—66
— — — — — определение окисленных ВОНВЛОСС и глутатиона 66—67
— — — — — гидролазы 67—86, 92—103
— — — — — карбогидразы 77—88, 92—103
— — — — — олягазы 77—86
— — — — — сахараза (инвертаза, β -фруктофуранооксидаза) 78—86
— — — — — определение качественное 78—79
— — — — — определение количественное 79—86
— — — — — инвертазной активности дрожжей 79—85
— — — — — мальтазы в дрожжах (по И. М. Ройтеру) 85—86
— — — — — полилазы 92—103
— — — — — амиллазы 92—103
— — — — — влияние рН на активность 94—95
— — — — — определение суммарной активности по подной пробе 95—96
— — — — — по Д. Н. Климовскому и В. И. Радзевичу 96—97
— — — — — по разжижению крахмального клейстера (вискозиметрически) 99
— — — — — определение α - и β -амилаз дифференцировано 99—100
— — — — — осаживающей активности 97—99
— — — — — определение династической активности рефрактометрическим методом (по К. П. Петрову) 100—103
— — — — — протеазы 67—73
— — — — — определение активности 69—73
— — — — — в муке 69
— — — — — рефрактометрическим методом (по К. П. Петрову) 70—73
— — — — — пептидазы 68
— — — — — эстеразы 73—76
— — — — — липазы, определение активности в маслосодержащем сырье 75—76
— — — — — объемным методом 75—76
— — — — — стагагмометрическим методом 76
— — — — — фосфатазы 76—77
— — — — — определение активности по количеству отщепляемого фосфора 77
— — — — — каталаза 109—111
— — — — — определение активности (по А. Н. Баху и А. И. Опарину) 109—111
— — — — — оксидоредуктазы 105—111
— — — — — дегидрогеназы 106
— — — — — оксидазы 106—109, 111—114

— — — — — липооксигеназа (липооксидаза) 106—107
— — — — — пероксидазы, определение активности по окислению пирогаллола 107—109
— — — — — полифенолоксидаза, определение активности по окислению аскорбиновой кислоты 113—114
— — — — — определение активности по окислению тирозина 112—113
— — — — — цитохромы и цитохромоксидаза 111—112
— — — — — определение с реактивом «надн» 111—112
Фосфор, определение количества колориметрическим методом 105
Фруктоза см. *Углеводы* 153, 159, 160—161

Хлорофилл, определение количества (по Т. Н. Годневу) 61—62
Холин см. *Витамины* 145—147
Хроматография 20—30, 116—118, 156—161, 207—208
— адсорбционная 21, 22—26, 116—118
— — — — — вытеснительная 21
— — — — — фронтальная 21
— — — — — элюатная 21, 22—26, 116—118
— — — — — бумажная 21—22, 156—161, 207—208
— — — — — восходящая 26—27, 156—158, 207—208
— — — — — двумерная 28—29
— — — — — качественная 21—22, 156—157, 207—208
— — — — — количественная 157—161
— — — — — круговая 22
— — — — — нисходящая 24, 156—158, 207—208
— — — — — одномерная 26—29, 156—158, 207—208
— — — — — определение углеводов, см. *Углеводы* 156—161
— — — — — разделение сахаров специфическими методами см. *Углеводы* 159—161

Цитохромы и цитохромоксидаза см. *Ферменты* 111—112

Чашка Конвей — Байрна см. *Азот летучих оснований* 8

Эвнометр см. *Прибор* 211
Электрофорез см. *Приборы* 31, 32, 45
Эргостерин 122—124
— определение количества 122—124
— — — — — колориметрическое в дрожжах 123—124
— — — — — весовым методом 123
Эфирное число см. *Жиры* 184

