

КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ
И БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
АНАЛИЗА РАСТЕНИЙ**

Практикум

Калининград

2000

УДК 581.1:581.19
ББК 28.57
Ч92

Печатается по решению редакционно-издательского Совета Калининградского государственного университета.

Ч92 Физиологические и биохимические методы анализа растений: Практикум / Калинингр. ун-т; Авт.-сост. Г.Н. Чупахина. – Калининград, 2000. – 59 с.

В практикуме приведены авторские и адаптированные для анализа растительного материала методы определения аскорбиновой, дегидроаскорбиновой, дикетогулоновой кислот, рибофлавина, триоз, а также уже известные методы определения нуклеиновых кислот, неорганических полифосфатов, ферментов системы аскорбиновой кислоты и др.

Кроме этого включены некоторые табличные данные, часто используемые студентами при выполнении курсовых и дипломных работ.

Практикум предназначен для студентов, выполняющих курсовые и дипломные работы; может быть использован также аспирантами, преподавателями вузов.

УДК 581.1:581.19
ББК 28.57

© Калининградский государственный университет, 2000

Учебное издание

**ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
АНАЛИЗА РАСТЕНИЙ**

Практикум

Автор-составитель Чупахина Галина Николаевна

Редактор Л.Г. Ванцева
Оригинал-макет Т.А. Гайдюковой

Изд. лиц. №020345 от 14.01.1997 г.
Подписано в печать 17.04.2000 г. Формат 60×90¹/₁₆.
Бумага для множительных аппаратов. Ризограф.
Гарнитура “Таймс”. Усл. печ. л. 3,7. Уч.-изд. л. 2,4.
Тираж 120 экз. Заказ

Калининградский государственный университет
236041, г. Калининград, ул. А.Невского, 14

СОДЕРЖАНИЕ

Количественное определение аскорбиновой, дегидроаскорбиновой и дикетогуоновой кислот в растительных тканях	4
Колориметрическое определение аскорбиновой кислоты (по Г.Н. Чупахиной)	7
Спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты . . .	9
Количественное определение аскорбиновой кислоты	10
Определение аскорбиновой кислоты	12
Определение аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот (по Дж. Божикю)	16
Определение витамина С в окрашенных объектах (по Бекеру)	18
Методика определения активности аскорбатоксидазы, полифенолоксидазы и пероксидазы (по Д.К. Асамову, С.Т. Рахимовой)	19
Определение активности аскорбинатоксидазы	21
Спектрофотометрическое определение активности аскорбинатоксидазы	23
Методы определения активности пероксидазы	24
Спектрофотометрический метод определения активности цитохромоксидазы	27
Определение активности полифенолоксидазы	28
Определение глутатиона	30
Фотокolorиметрический метод определения триоз в растительном материале (по Г.Н. Чупахиной, М.В. Куркиной)	32
Спектрофотометрическое определение восстановленного и окисленного рибофлавина (по Г.Н. Чупахиной, А.С. Гребенникову, Н.С. Лейба)	34
Спектрофотометрическое определение нуклеиновых кислот	36
Определение содержания неорганических полифосфатов (по Р. Лангену, Е. Лиссу; модификация И.С. Кулаева и др.)	38
Быстрое колориметрическое определение нитратов (по Д. Кательдо и др.)	41
..	
Определение числа хлоропластов, количества клеток и их объема в фотосинтезирующих тканях	42
Получение альбиносных проростков ячменя (по Г.Н. Чупахиной)	47
Определение влагоёмкости почвы	48
Статистическая обработка данных физиолого-биохимических исследований методом попарных сравнений	50

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ, ДЕГИДРОАСКОРБИНОВОЙ И ДИГЕТОГУЛОНОВОЙ КИСЛОТ В РАСТИТЕЛЬНЫХ ТКАНЯХ

Аскорбиновая кислота (АК) - легкоокисляемое соединение, окисление ее идет до дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК), лактоновое кольцо которой легко гидролизуется с образованием кислоты с открытой цепью - дигетогулоновой кислоты (ДКГК).

Метод количественного определения данных кислот основан на взаимодействии 2,4-динитрофенилгидразина с ДАК и ДКГК с образованием в серной кислоте соответствующих азазонов. Азазоны ДАК и ДКГК дают красное окрашивание, используемое для фотометрического определения.

Для нахождения суммы всех кислот АК окисляют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до ДАК и содержание восстановленной формы АК определяют по разности.

При раздельном определении ДАК и ДКГК смесь подвергают действию восстановителей, при этом восстанавливаться в АК может только ДАК. В.В. Соколовский, Л.В. Лебедева, Т.Б. Лиэлуп [1] в качестве восстановителя предложили использовать унитиол (димеркаптопропансульфонат натрия), что значительно упростило процедуру восстановления. При рН 7 унитиол в течение 10 минут восстанавливает ДАК в АК. Данные авторы описали методику определения АК, ДАК и ДКГК в животных объектах, описанный метод был несколько видоизменен для анализа растительного материала (Г. Н. Чупахина).

Реактивы

1. 2%-ный раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 9 н. серной кислоте, содержащей 0,25% тиомочевины. Для приготовления 100 мл реактива рассчитать, какое количество концентрированной серной кислоты необходимо взять с учетом ее концентрации и плотности, чтобы конечный раствор был 9 н. Например, исходный раствор концентрированной серной кислоты 95,6% и плотность его 1,830. В этом случае необходимо взять 25,2 мл кислоты. В кислоте при нагревании или встряхивании растворить 2 г 2,4-динитрофенилгидразина, а затем 0,25 г тиомочевины. Полученный раствор смешать с нужным объемом воды, наливая кислотный раствор в воду так, чтобы конечный объем равнялся 100 мл. Раствор хранить в холодильнике не более одного месяца.

2. 5%-ная метафосфорная кислота (хранить в холодильнике не более двух недель).

3. 85%-ный раствор серной кислоты (в 100 мл дистиллята влить 900 мл концентрированной серной кислоты).

4. $2 \cdot 10^{-3}$ М унитиол (0,84 мл 5%-ного раствора ампулированного препарата в 100 мл фосфатного буфера 0,2 М, рН=7). Раствор хранить не более суток.

5. 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (краска Тильманса). Хранить в темноте не более одной недели.

Ход анализа

Навеску листьев (около 0,5 г) залить в фарфоровой ступке 10 мл 5%-ной метафосфорной кислоты, растереть. Гомогенат количественно перенести в мерную колбу на 25 мл, объем довести до метки метафосфорной кислотой; после встряхивания центрифугированием отделить осадок (20 минут при 3000 об/мин).

В две градуированные пробирки с притертыми пробками налить по 1,5 мл полученной вытяжки и в одну из них прибавить по каплям 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления слабо-розового окрашивания, устойчивого в течение 30 секунд.

В третью пробирку налить 1,5 мл вытяжки, приготовленной на $2 \cdot 10^{-3}$ М растворе унитола. Данная вытяжка готовится следующим образом: навеска листьев (около 0,5 г) растирается с раствором унитола, переносится в мерную колбу на 25 мл, объем доводится до метки раствором унитола, приготовленным на фосфатном буфере. Содержимое колбы встряхнуть, колбу поместить в холодильник на 10 минут - это время необходимо для восстановления ДАК в АК. Центрифугированием отделить осадок. Белки, находящиеся в вытяжке, осаждаются метафосфорной кислотой: к 16 мл центрифугата прибавить 4 мл 5%-ной метафосфорной кислоты, выпавшие в осадок белки удалить центрифугированием (15 минут, 3000 об/мин).

Во все три пробирки прибавить по 0,5 мл 2,4-динитрофенилгидразина и довести объем до 2,5 мл дистиллированной водой. Пробирки поместить в термостат на 20 минут при температуре 100°C. По истечении указанного времени пробирки перенести в ледяную баню и в каждую из них добавить по 2,5 мл (три порциями) серной кислоты.

Через час окрашенные растворы фотометрируют при длине волны 520 нм в кювете на 10 мм по сравнению с контрольным раствором, который готовится и обрабатывается как опытные, только вместо вытяжки используется раствор 5%-ной метафосфорной кислоты. По калибровочной

кривой определяют, какой концентрации кислоты соответствует данная оптическая плотность.

Содержание кислоты X на 1 г навески определяется по формуле:

$$X = \frac{25 \cdot C}{1,5 \cdot n},$$

где C - концентрация раствора кислоты, соответствующая данной оптической плотности, мкг/мл;

n - навеска растительного материала, г;

25 - общий объем исследуемого раствора, мл;

1,5 - объем раствора, взятый для анализа, мл.

Количественное содержание кислот далее рассчитывается следующим образом. В пробирке с экстрактом, полученным с унитиолом, определяется только ДКГК, так как унитиол восстанавливает ДАК в АК, которая с 2,4-динитрофенилгидразином не определяется. В данную величину необходимо ввести поправку на разбавление за счет использования метафосфорной кислоты для осаждения белков: полученный результат нужно увеличить на 20%.

В пробирке с кислотным экстрактом определяется ДАК и ДКГК, поэтому, вычтя из данной суммы количество ДКГК, найдём величину ДАК.

В пробирке с кислотным экстрактом, где АК была окислена 2,6-дихлорфенолиндофенолом до ДАК, определяется сумма трех кислот (АК, ДАК и ДКГК). Зная значение ДАК и ДКГК, находим по разности величину АК.

Построение калибровочной кривой

Для построения калибровочной кривой готовят три раствора аскорбиновой кислоты в 5%-ной метафосфорной кислоте:

1-й раствор - 100 мг АК в 250 мл метафосфорной кислоты;

2-й раствор - 0,5 мл 1-го раствора + 9,5 мл метафосфорной кислоты;

3-й раствор - 0,5 мл 2-го раствора + 4,5 мл метафосфорной кислоты.

Определенные объемы 1-го и 2-го растворов (1 мл, 0,75 мл, 0,5 мл, 0,25 мл - 2-го раствора и 1 мл, 0,5 мл - 3-го раствора), содержащие от 20 до 2 мкг АК, доводятся метафосфорной кислотой до 1,5 мл. В качестве контроля берется 1,5 мл кислоты.

Во все пробирки по каплям добавляется 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления слабо-розового окрашивания, устойчивого в течение 30 секунд (АК перейдет в ДАК). Затем вносится по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина и объем доводится до 2,5 мл дистиллированной водой. Дальше пробы обрабатываются по прописи, данной в разделе "ход анализа".

С использованием показаний оптической плотности для растворов ДАК разной концентрации, полученных с помощью фотоэлектроколориметра, строится калибровочная кривая.

Литература

1. Соколовский В.В., Лебедева Л.В., Лиэлун Т.Б. О методе отдельного определения АК, ДАК, и дикетогулоновой кислот (ДКГК) в биологических тканях. // Лабораторное дело. №3. 1974.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ (по Г.Н. Чупахиной)

При количественном определении аскорбиновой кислоты в растениях широко распространенным методом титрования растительных вытяжек 2,6-дихлорфенолиндофенолом имеются некоторые трудности, связанные с определением конца титрования. Синяя краска 2,6-дихлорфенолиндофенол восстанавливается в бесцветное соединение присутствующей в растительной вытяжке аскорбиновой кислотой (реакция Тильманса) таким образом, что на одну молекулу аскорбиновой кислоты приходится две молекулы краски. Избыток краски в кислой среде обуславливает розовое окрашивание вытяжки, однако полученное окрашивание раствора нестабильно, интенсивность его все время уменьшается до полного исчезновения, поэтому результат титрования во многом зависит от времени титрования.

Предлагаемый нами метод основан на фотометрическом определении избытка 2,6-дихлорфенолиндофенола после восстановления определенной части его аскорбиновой кислотой. Оптическая плотность окрашенного раствора измеряется с помощью фотоколориметра строго через 35 секунд после добавления в растительную вытяжку краски, что дает возможность полностью исключить ошибки, возможные при титрационном определении аскорбата.

Ход определения

Для количественного определения восстановленной аскорбиновой кислоты берется навеска свежего растительного материала – около 2 граммов. Навеска измельчается ножницами из нержавеющей стали, так как следы тяжелых металлов способствуют окислению аскорбиновой кислоты. Измельченный материал заливается 10 мл 2%-ной метафосфорной кислоты и быстро растирается. Гомогенат количественно переносится в мерную колбу на 100 мл, объем доводится до метки раствором 2%-ной метафосфорной кислоты, которая является одним из лучших стабилизаторов аскорбиновой кислоты в растворе, к тому же она осаждает белки. Содержание колбы встряхивается, фильтруется или центрифугируется. Из фильтрата

та берется три пробы по 10 мл. К каждой пробе добавляется по 1 мл свеже-приготовленного 0,025%-ного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Для приготовления раствора краски берётся 0,0625 г 2,6-дихлорфенолиндофенола, навеска переносится в мерную колбу на 250 мл, куда приливается 150-200 мл теплой дистиллированной воды и 6 капель 0,01 н. щелочи. Колба встряхивается в течение 10-15 минут до полного растворения краски; после того как содержимое колбы примет комнатную температуру, раствор доводится до метки водой и взбалтывается.

Как только к пробе прилита краска, включается секундомер. Растительная вытяжка с краской хорошо перемешивается, раствор заливается в кювету толщиной 10 мм. Кювета вставляется в держатель кювет колориметра, нулевая точка которого предварительно устанавливается по 2%-ной метафосфорной кислоте. При колориметрировании вытяжки с краской необходимо стрелку гальванометра постоянно подводить к нулю, пока не пройдет 35 секунд, так как интенсивность окраски раствора все время уменьшается. Этого времени достаточно, чтобы выполнить вышеописанные операции. Фотометрирование ведется при 530 нм (зеленый светофильтр). Параллельно колориметрируется 10 мл 2%-ной метафосфорной кислоты с 1 мл краски (контроль). Изменение в интенсивности окрашивания контрольного и опытного образца пропорционально количеству аскорбиновой кислоты, находящемуся в растительной вытяжке. Расчет производится по калибровочной кривой.

Для построения калибровочной кривой 100 мг аскорбиновой кислоты растворяется в 1 л 2%-ной метафосфорной кислоты. Из данного раствора готовятся разведения, содержащие 1, 2, 3 мкг и т. д. аскорбиновой кислоты в 1 мл. По разнице в колориметрировании раствора 2%-ной метафосфорной кислоты и стандартных растворов строится калибровочная кривая.

В том случае, когда вытяжка растений содержит значительное количество аскорбиновой кислоты (около 700 мкг на 1 г), при добавлении 1 мл краски к 10 мл вытяжки краска полностью обесцвечивается аскорбиновой кислотой. В этом случае вытяжку необходимо разбавить вдвое 2%-ной метафосфорной кислотой и учесть это при расчете содержания аскорбиновой кислоты.

Вычисление результатов

Содержание аскорбиновой кислоты на 1 г исследуемого материала вычисляется по формуле:

$$X = \frac{a \cdot V}{g} \text{ мкг,}$$

где a - содержание аскорбиновой кислоты в 1 мл вытяжки, найденное по калибровочной кривой в мкг;

V - объем экстракта, полученного из данной навески;

g - навеска исследуемого материала в граммах.

Определение содержания аскорбиновой кислоты в растениях данным методом так же, как и титрационным, для некоторых объектов дает завышенные результаты по сравнению с хроматографическим определением, так как краской оттитровывается не только аскорбиновая кислота, но и некоторые близкородственные соединения, находящиеся в экстракте. Однако благодаря своей простоте, хорошей повторяемости результатов этот метод [1] может быть использован для массовых определений витаминной ценности растений, для сравнительного определения содержания аскорбиновой кислоты, а также для количественного определения аскорбиновой кислоты, выделенной хроматографическим методом.

Аскорбиновая кислота является легкоокисляющимся соединением. При количественном ее определении необходимо иметь в виду, что свет ускоряет окисление аскорбиновой кислоты даже в присутствии стабилизирующих веществ, поэтому все операции по растиранию, фильтрованию и колориметрированию лучше вести на неярком свете и по возможности быстро.

Литература

1. Чупахина Г.Н. Колориметрическое определение аскорбиновой кислоты // Специальный практикум по биохимии и физиологии растений /Под ред. М.М. Окунцева. Калининград, 1981. С. 14-16.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

За основу взят метод Hewitt E.J. и Dickes G.J. спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты (АК) [1]. Навеска растительного материала (1 грамм для проростков ячменя) гомогенизируется с 10 мл 2%-ной метафосфорной кислоты. Гомогенат переносится в мерную колбу на 50 мл. Объем доводится до метки 2%-ной HPO_3 и 0,21 М Na_3PO_4 , взятыми в соотношении 3 : 2 (V/V, pH 7,3 - 7,4). Экстракт центрифугируется 15 мин при 3000 об/ мин, экстинция раствора измеряется на спектрофотометре при 265 нм против стандарта - вышеуказанных растворов HPO_3 и Na_3PO_4 , взятых в том же соотношении. Результаты вычисляются по формуле :

$$\text{мкМ} = \frac{\text{экстинция при } 265 \text{ нм} \cdot \text{кол - во мл}}{\text{коэффициент молярной экстинции для АК при } 265 \text{ нм}}$$

Коэффициент молярной экстинции для аскорбиновой кислоты при 265 нм и pH = 6,8 и выше равен $1,65 - 1,655 \cdot 10^4$ [1].

Микромоли переводятся в граммы по формуле: $g = \text{мкМ} \cdot \text{Мм АК} (176)$.

Содержание аскорбиновой кислоты выражается в мкг на грамм сырого веса.

Литература

1. *Hewitt E.J., Dickes G.J.* Spectrophotometric measurements on ascorbic acid and their use for the estimation of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plant tissues // *The biochemical Journal*. 1961. V. 78. № 2. P. 384 - 391.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Принцип метода количественного определения витамина С [1] основан на его способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в щелочной среде имеет синюю окраску, а в восстановленном состоянии бесцветный.

Количественное определение витамина С проводят, титруя исследуемый раствор, подкисленный соляной кислотой, щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. Пока в титруемом растворе содержится витамин С, приливаемый щелочной раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола будет обесцвечиваться за счет образования восстановленной формы аскорбиновой кислоты. Как только все количество витамина С, имеющееся в исследуемом растворе, окислится, 2,6-дихлорфенолиндофенол не будет восстанавливаться и титруемый раствор приобретет розовую окраску за счет перехода щелочного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола синего цвета в 2,6-дихлорфенолиндофенол красного цвета в кислой среде.

Зная количество 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованное на титрование, и его титр, установленный по аскорбиновой кислоте, вычисляют содержание аскорбиновой кислоты в исследуемом растворе.

Ход работы

Точную навеску исследуемого материала (сухих ягод шиповника - 1 г, хвои - 1 г, капусты - 5 г, картофеля - 5 г) тщательно растирают в фарфоровой ступке с 4 мл 2%-ной соляной кислоты, добавив немного измельченного стекла. Затем без потерь переносят содержимое ступки в мерную колбу на 25 мл, несколько раз смывая ступку водой и сливая ее по стеклянной палочке в ту же колбу, и доводят объем раствора дистиллированной водой до метки. Полученную смесь оставляют на 5 - 10 мин. Содержимое колбы тщательно перемешивают, фильтруют через бумажный фильтр и фильтрат используют для определения витамина С. Экстракт, полученный из картофеля, не фильтруют.

Для титрования отмеривают в коническую колбочку определенный объем фильтрата (шиповника - 1 мл, хвои - 5 мл, капусты - 5 мл, картофеля

- всю полученную смесь без фильтрации), добавляют 4 мл 2%-ного раствора соляной кислоты и титруют из бюретки 0,001н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего около 30 с. В контрольной пробе вместо вытяжки берется соответствующий объем смеси: 4 мл 2%-ной соляной кислоты и 21 мл воды.

Определение титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола

В мерной колбе на 50 мл растворяют несколько кристалликов (1-1,5 мг) аскорбиновой кислоты в 2%-ной серной кислоте и доводят этой же кислотой до метки, тщательно перемешивают. В две конические колбочки берут по 5 мл приготовленного раствора аскорбиновой кислоты и после добавления кристалликов КJ (около 5 - 10 мг) и 5 капель 1%-ного раствора крахмала титруют одну колбочку 2,6-дихлорфенолиндофенолом, другую - точно 0,001 н. раствором КJО₃ (0,03568 г КJО₃ растворяют в воде и доводят до 1 л). Расчет титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте ведут по формуле:

$$T = \frac{0,088 \cdot a}{b},$$

где T - количество миллиграммов аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола; 0,088 - количество мг аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора йодата калия; a - количество мл 0,001 н. раствора йодата калия, израсходованного на титрование раствора аскорбиновой кислоты; b - количество мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованное на титрование.

Расчет количества аскорбиновой кислоты в пробе производят по формуле:

$$X = \frac{T \cdot A \cdot B \cdot 100}{B \cdot G},$$

где X - содержание аскорбиновой кислоты в миллиграмм-процентах;

T - титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте, т.е. это количество аскорбиновой кислоты (мг), соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола;

A - количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (мл), израсходованное на титрование, за вычетом контроля;

B - количество мл вытяжки, взятое для титрования; B - общее количество вытяжки (мл);

G - количество вещества в граммах, взятое для анализа; 100 - количество граммов исследуемого материала, взятое для вычисления процентного содержания.

Реактивы

1. Соляная кислота, 2%-ный раствор.

2. Аскорбиновая кислота, кристаллическая.
3. Серная кислота, 2%-ный раствор.
4. КJ, кристаллический;
5. Крахмал, 1%-ный раствор.
6. КJО₃, точно 0,001 н. раствор (0,03568 г КJО₃ растворяют в воде и доводят до 1 л).
7. 2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,001 н. раствор. Для приготовления этого раствора применяют буферную фосфатную смесь (1/15 М) по Серенсену, так как индикатор в водном растворе довольно быстро разрушается. Для этого берут водяные растворы КН₂ РО₄ - 9,078 г в 1 л и Na₂НРО₄·2Н₂О - 11,867 г в 1 л. Растворы хранят отдельно. Затем их смешивают в соотношении 2:3, тогда рН = 6,9 - 7,0. Отвешивают 0,25 г красителя, приливают 700 мл дистиллированной воды, взбалтывают и добавляют 300 мл буферной смеси. На следующий день раствор отфильтровывают и тщательно перемешивают. Определяют титр приготовленного раствора.

Литература

1. Сиянова Н.С., Хисамутдинова В.И., Неуструева С.Н. Методическое руководство для практикума по биохимии. Казань: Изд-во Казанского ун-та, 1988. С.90 - 94.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Витамин С - аскорбиновая кислота (антицинготный фактор) – растворим в воде. В особенно больших количествах он содержится в свежих ягодах, плодах (актинидии, черной смородины, апельсина, лимона) и овощах (стручковых перцах, цветной капусте, брокколи, брюссельской капусте, кресс-салате, укропе, листьях петрушки и др.). В растворах витамин С очень чувствителен к кислороду воздуха и нагреванию.

Аскорбиновая кислота обладает сильными восстановительными свойствами. Продуктом ее первого окисления является дегидроаскорбиновая кислота. В молекуле аскорбиновой кислоты 2 энольные группы, которыми обусловлены ее кислотные свойства.



L - аскорбиновая кислота



дегидроаскорбиновая кислота

Метод определения аскорбиновой кислоты основан на ее редуцирующих свойствах. Раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола синей окраски вос-

становливается в бесцветное соединение экстрактами растений, содержащими аскорбиновую кислоту (реакция Тильманса).

Реактивы и аппаратура

1. 1%-ная соляная кислота.
2. 1%-ный водный раствор щавелевой кислоты, которым заменяют метафосфорную кислоту.
3. 2%-ная серная кислота.
4. Аскорбиновая кислота кристаллическая.
5. КJ.
6. 1%-ный раствор крахмала.
7. 10%-ный раствор сернокислой меди.
8. 0,001 н. раствор KJ_3 (навеску 0,3568 г йодата после двух часов высушивания при $102^{\circ}C$ растворяют в воде в мерной колбе на 1 дм^3 ; из этого 0,1 н. раствора берут 100 см^3 и доводят водой до 1 дм^3 ; раствор удобно хранить в склянке с установленной микробюреткой, наполняющейся раствором снизу при помощи «груши»).
9. 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола - краска (растворяют 60 мг сухой краски в мерной колбе на 200 см^3 , прибавляют $100-150\text{ см}^3$ теплой дистиллированной воды и 4-5 капель 0,01 н. щелочи; после сильного 10-минутного взбалтывания доливают колбу водой до метки и, перемешав, фильтруют через плотный фильтр в сухую колбу).
10. Две микробюретки с градуировкой на $0,01\text{ см}^3$, емкостью 1 и 5 см^3 .
11. Бюретка с делениями на $0,05\text{ см}^3$.
12. Ступка диаметром 15 см.
13. Нож из нержавеющей или хромированной стали.
14. Кюветы эмалированные, лучше винипластовые, размером $20 \times 40\text{ см}$.

Установка титра краски по аскорбиновой кислоте (по С. М. Прокошеву)

Несколько кристаллов (около 1-1,5 мг) аскорбиновой кислоты растворяют в 50 см^3 2%-ной серной кислоты. Затем 5 см^3 этого раствора титруют раствором краски из микробюретки. Сразу после этого другую пробу с 5 см^3 раствора аскорбиновой кислоты титруют из другой микробюретки точно 0,001 н. раствором йодата, причем в колбочку перед титрованием прибавляют несколько кристалликов (около 5-10 мг) йодистого калия и 5 капель 1%-ного раствора крахмала (более высокие количества йодистого калия сильно тормозят окисление аскорбиновой кислоты йодом). Расчет титра краски производится по следующей формуле:

$$X = \frac{0,088 \cdot a}{b} = \text{мг аскорбиновой кислоты,}$$

где: a - число кубических сантиметров точно 0,001 н. раствора йодата;

b - число кубических сантиметров раствора краски;

0,088 мг аскорбиновой кислоты соответствуют 1 см³ 0,001 н. раствора йодата.

Пример вычисления титра 2,6-дихлорфенолиндофенола

На титрование пошло 1,32 см³ краски и 1,68 см³ йодата. Следовательно, 1 см³ раствора краски эквивалентен $(0,088 \cdot 1,68) : 1,32 = 0,112$ мг аскорбиновой кислоты.

Среднюю пробу (плодов, кочанов, корнеплодов, клубней, листовых овощей) предварительно грубо измельчают ножом из нержавеющей или хромированной стали на плексигласовой пластинке или в ростильне (следы железа, и особенно меди, катализируют разрушение аскорбиновой кислоты). Весь процесс измельчения необходимо выполнить как можно быстрее. Средняя проба составляется из не менее чем 10-20 экземпляров, поэтому пробу для анализа берут так, чтобы в соответствующей пропорции в нее входили все ткани каждого экземпляра.

Обычно отрезают сегмент толщиной 0,5-1 см после того, как объект разрезан на две половины по главной оси. Полученные таким образом сегменты ткани быстро измельчают ножом в винипластовой или эмалированной кювете на мелкие кусочки и перемешивают.

Крупные сочные плоды (томатов и т. п.) режут по вертикальной оси на 4 части, берут одну часть от каждого плода, измельчают в винипластовой плоской чашке ножом или грубо растирают в большой фарфоровой ступке и перемешивают. Среднюю пробу мелких плодов и ягод (сливы, смородины) измельчают в ступке целиком. Из плодов косточковых предварительно вынимают косточки. Среднюю пробу листовых овощей (укропа, сельдерея, петрушки, пера лука и пр.) измельчают целиком или же берут 1/2 листовой пластинки (по оси) каждого листа, входящего в среднюю пробу (шпината, салата, листовой капусты, шавеля и пр.).

Из измельченного и хорошо перемешанного материала берут в химические стаканчики на 50 см³ или на часовые стекла две параллельные навески на теххимических весах для определения аскорбиновой кислоты. При одновременном анализе нескольких образцов следует стремиться все навески для определения аскорбиновой кислоты сразу залить раствором соляной кислоты и потом уже растирать в ступке до образования гомогенной массы.

При анализе навеску исследуемого материала в 5-20 г или больше (в зависимости от содержания аскорбиновой кислоты) заливают в ступке 20 см³ 1%-ной соляной кислоты и растирают до образования гомогенной массы. Процесс растирания не должен длиться больше 10 минут. При анализе грубых тканей их растирают в присутствии 2-3 г (в зависимости от навески) хорошо промытого стеклянного песка, который берут по объему. Полученную массу сливают из ступки (через стеклянную палочку и воронку) в мерную колбу на 100 см³. Ступку споласкивают несколько раз 10%-ной щавелевой кислотой, которую выливают в ту же мерную колбу. Содержимое колбы доводят до метки 1%-ной щавелевой кислотой и закрывают ее пробкой, сильно встряхивают и оставляют стоять около 5 минут. Затем содержимое колбы выливают на сухой фильтр и отфильтровывают часть экстракта (около 50 см³) в сухой стакан или колбу.

Соляная кислота извлекает из растительной ткани как свободную, так и связанную аскорбиновую кислоту. Щавелевая же кислота улучшает стойкость аскорбиновой кислоты в экстрактах.

Для титрования вытяжек из полученного фильтрата пипеткой берут две параллельные порции по 10-20 см³, наливают в стаканчик объемом 50 см³ и титруют из микробюретки 0,001 н. раствором краски (2,6-дихлорфенолиндофенола) до появления явно-розового окрашивания, не исчезающего в течение 0,5-1 минуты.

Вытяжки из богатых аскорбиновой кислотой объектов можно с успехом титровать из бюретки с делениями на 0,05 см³, и объемы вытяжек, употребляемых для титрования, могут быть увеличены до 20 см³.

Ввиду стойкости аскорбиновой кислоты в присутствии щавелевой кислоты титрование готовых вытяжек при необходимости можно отложить до следующего дня. При вычислении результатов вводят поправку и на реактивы.

При необходимости произвести особо точные анализы следует принять в расчет и другие вещества, которые могут реагировать с 2,6-дихлорфенолиндофенолом. Для этого к другим двум порциям по 10 см³ исследуемой вытяжки прибавляют 0,1 см³ 10%-ного раствора сернокислой меди и нагревают 10 минут при 110° С (на бане или в термостате) и после охлаждения титруют краской. В присутствии меди и при нагревании аскорбиновая кислота полностью разрушается. Полученную поправку вычитают из данных титрования опытных растворов.

Определение аскорбиновой кислоты в окрашенных вытяжках

Многие плоды и ягоды и некоторые овощи дают окрашенные экстракты, что затрудняет определение аскорбиновой кислоты вышеописанным способом. Аскорбиновую кислоту окрашенных вытяжек титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола (краски) в присутствии хлороформа, дихлорэтана или толуола.

Навеску (10 г) экстрагируют как обычно и доводят объем экстракта до 100-200 см³ раствором щавелевой кислоты. После фильтрования берут пипеткой 5 см³ окрашенного экстракта в пробирки (диаметр 20-25 мм, длина 150 мм) и туда же прибавляют мерным цилиндром по 5 см³ химически чистого хлороформа. Затем вытяжку титруют раствором краски при осторожном перемешивании, наклоняя пробирку, прикрытую пробкой.

При появлении первого розового окрашивания в слое хлороформа титрование считается законченным. Одновременно проводят такое же титрование контрольных проб с той разницей, что вместо экстракта в пробирки прибавляют смесь растворов соляной и щавелевой кислот в соотношении объемов 1:5.

Количество аскорбиновой кислоты (X) в образце вычисляют по формуле:

$$X = \frac{100 \cdot a \cdot T \cdot об}{об_1 \cdot n},$$

где: a - число куб. см краски (с вычетом поправки на титрование чистого растворителя), которая пошла на титрование экстракта;

T - титр краски по аскорбиновой кислоте;

$об$ - общий объем вытяжки;

$об_1$ - число куб. см экстракта, взятого для титрования;

n - навеска материала.

Литература

1. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. Л.: Колос, 1972. С. 88-92.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ И ДЕГИДРОАСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТ (по Дж. Божичу)

Определение общего содержания аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот

Отбирают пипеткой 5 или 10 см³ вытяжки, в которой определена аскорбиновая кислота (по вышеописанному способу), в коническую колбу на

50 см³, туда же добавляют 3,5 см³ 1 н. раствора серной кислоты и после перемешивания - 1,75 см³ 1 М раствора Na₂SO₄.

После нового перемешивания закрывают колбочку резиновой пробкой и оставляют на 10 минут. Через 10 минут добавляют в ту же колбу 2,5 см³ 1 М раствора хлорной ртути и 5,75 см³ воды (11,5 см³ в случае, если взято 5 см³ вытяжки). После перемешивания образовавшийся осадок отфильтровывают. Фильтрат бесцветный, а если вытяжка была окрашена, она частично обесцвечивается. Затем к 5 или 10 см³ фильтрата прибавляют соответственно 10 или 20 см³ воды и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. Вычисляют содержание аскорбиновой кислоты, как указано ниже. Полученные результаты представляют общее содержание аскорбиновой и дегидроаскорбиновой кислот. По разности между этим количеством и содержанием аскорбиновой кислоты узнают содержание дегидроаскорбиновой кислоты в пробе.

Для определения аскорбиновой кислоты в колбы на 50 см³ берут по 5-10 см³ вытяжки, приготовленной для определения аскорбиновой кислоты, и последовательно прибавляют следующие реактивы: 3,5 см³ 1 н. раствора серной кислоты, 2,5 см³ раствора уксуснокислого свинца и 5 см³ воды (или 10 см³, если взято 5 см³ вытяжки). После добавления каждого раствора содержимое колбы перемешивают вращением. Под конец выпадает осадок (он сероватый, тянущийся, что обусловлено присутствием высокомолекулярных веществ). Содержимое колбы интенсивно перемешивают вращением в течение 10 секунд, а затем добавляют 2,5 см³ 95%-ного этилового спирта. Реакционную смесь опять перемешивают, фильтруют через бумажный фильтр, отбирают 5 или 10 см³ фильтрата и титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом.

Для вычисления аскорбиновой кислоты с учетом разведений применяется следующая формула:

$$X = \frac{a \cdot T \cdot об_1 \cdot об_3 \cdot 100}{n \cdot об_2 \cdot об_4} = \text{мг на 100 г,}$$

где: *a* - количество куб. см краски, которое пошло на титрование пробы (об₄);

T - титр краски;

*об*₁ - первоначальный объем вытяжки, полученной из навески;

*об*₂ - часть вытяжки, взятой для дальнейшего определения;

*об*₃ - объем, полученный в результате обработки части первоначальной вытяжки;

*об*₄ - объем вытяжки, взятой на титрование краской;

n - навеска.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В ОКРАШЕННЫХ ОБЪЕКТАХ (по Бекеру)

Принцип метода: 2,5-динитрофенилгидразин с дегидроаскорбиновой кислотой дает соединение, образующее с серной кислотой осадок красного цвета, интенсивность которого измеряют фотометрически.

Реактивы и аппаратура

1. 2%-ная щавелевая кислота ($C_2O_4H_2$).
2. Ацетатный буферный раствор, рН 5,4, который смешивают с 2%-ной щавелевой кислотой в отношении 2:1 и разбавляют водой 1:1.
3. 2,6-дихлорфенолиндофенол - ДИФ (0,2 г растворяют в 1000 cm^3 воды, сосуд хорошо закрывают и хранят в холодильном шкафу).
4. Уксусноамиловый эфир или хлороформ.
5. 10%-ный раствор тиомочевины в водном спирте 1:1 (раствор неустойчив).
6. 2,4-динитрофенилгидразин - ДФГ (3 г растворяют в 100 cm^3 9 н. серной кислоты и фильтруют; устойчив около 4 недель).
7. 85%-ная серная кислота.
8. L-аскорбиновая кислота - АК (приготавливают стандартный раствор для построения кривой растворением 0,60 г аскорбиновой кислоты в 200 cm^3 2%-ного раствора щавелевой кислоты).
9. Центрифуга, объем пробирок 50 и 100 cm^3 .
10. Баня со льдом.
11. Гомогенизатор.

Ход анализа

Растительный материал измельчают под углекислым газом. Затем берут определенную навеску, в которой должно содержаться около 5 мг аскорбиновой кислоты, смешивают со 120 cm^3 2%-ной щавелевой кислоты, гомогенизируют (2 минуты при 4 тыс. об/мин) и после тщательной промывки стакана и ножа 2%-ной щавелевой кислотой доводят до определенного объема. Экстракт взбалтывают и после центрифугирования берут пипеткой 5 cm^3 прозрачного раствора в другую центрифужную пробирку, в которую уже заранее налито 12 cm^3 ДИФ; спустя полминуты - 10 cm^3 хлороформа и взбалтывают до тех пор, пока лишняя краска не перейдет в органический растворитель, который после центрифугирования удаляют. Из водной фазы пипеткой берут в два стаканчика по 4 cm^3 жидкости, туда же добавляют 1 cm^3 ДФГ и каплю раствора тиомочевины; пробу ставят для реакции в термостат на 75 минут при 50⁰. Второй химический стакан обрабатывают точно так же, но без добавления ДФГ. После охлаждения в ледяной бане добавляют еще 5 cm^3 85%-ной серной кислоты и спустя час измеряют экс-

тинкцию при 540 нм. Незадолго до того во второй стакан добавляют 1 см³ ДФГ.

Для построения калибровочной кривой из стандартного раствора, содержащего 30 мкг АК в 1 см³, берут 5 проб. В первую добавляют 1 см³ раствора аскорбиновой кислоты + 4 см³ 2%-ной щавелевой кислоты, что составляет 30 мкг на 5 см³, затем в последующие приливают по 2 см³, 3 см³, 4 см³, 5 см³ аскорбиновой кислоты и щавелевой кислоты так, чтобы общий объем раствора в каждой пробирке составлял 5 см³. Затем пробы просматривают на фотоэлектроколориметре и строят калибровочный график.

МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ АСКОРБАТОКСИДАЗЫ, ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ И ПЕРОКСИДАЗЫ

(по Д.К. Асамову, С.Т. Рахимовой)

В биохимических исследованиях чаще используются методы совместного определения активности аскорбатоксидазы и полифенолоксидазы, основанные на определении количества окисленной аскорбиновой кислоты. Для определения аскорбиновой кислоты пользуются широко распространенным методом титрования с 2,6-дихлорфенолиндофенолом. Однако метод титрования имеет существенные недостатки: во-первых, окрашивание раствора нестабильно, и поэтому трудно определить конец титрования; во-вторых, результат титрования зависит от времени титрования, а также от освещенности и т.д.

Разработанный колориметрический метод определения аскорбиновой кислоты позволил полностью избавиться от недостатков титрометрического метода и благодаря своей простоте и хорошей воспроизводимости широко применяется в биохимической практике. В этой связи данный метод [1] использовался нами для определения активности аскорбатоксидазы, полифенолоксидазы и пероксидазы [2].

Для приготовления раствора краски - 2,6-дихлорфенолиндофенола - в колбе объемом 100 мл растворяли 25 мг навески в теплой дистиллированной воде и добавляли 3-4 капли 0,01 н. раствора едкого натрия. Колбу встряхивали до полного растворения краски, и объем раствора доводили до метки водой.

Взвешивали 50 мг чистой аскорбиновой кислоты и растворяли в 0,5 л 2%-ной метафосфорной кислоте. Из этого раствора брали по 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 мл и доводили до 50 мл 2%-ной метафосфорной кислотой. Как известно, метафосфорная кислота является одним из лучших стабилизаторов аскорбиновой кислоты в растворе; кроме того, она легко осаждает белки. Полученные растворы содержали соответственно 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7

мкг аскорбиновой кислоты в 1 мл раствора. Нулевую точку на спектрофотометре устанавливали по 2%-ной метафосфорной кислоте. Из приготовленных растворов брали по 10 мл и добавляли по 1 мл свежеприготовленной краски. После добавления краски сразу включали секундомер и хорошо перемешивали, затем раствор заливали в кювету толщиной 10 мм. Через 35 секунд после добавления краски сразу измеряли оптическую плотность окрашенного раствора в области 530 нм. Параллельно спектрофотометрировали 10 мл 2%-ной метафосфорной кислоты с 1 мл краски в качестве контроля. По разнице в колориметрировании раствора 2%-ной метафосфорной кислоты и стандартных растворов строили калибровочную кривую.

Для опыта брали свежие растительные материалы по 1 г и растирали в ступке с фосфатным буфером рН 5 и рН 7,5. Время экстракции материала - 30 минут при комнатной температуре. Затем экстракт количественно перенесли в мерную колбу объемом 50 мл и довели буфером до метки. Полученную ферментную вытяжку отфильтровали.

Брали три колбы на 50 мл: в две из них вносили по 4 мл ферментной вытяжки, приготовленной на буфере рН 5, добавляли 2,5 мл буферного раствора и 2,5 мл 0,2%-го раствора аскорбиновой кислоты. В третьей колбе проводили контрольные определения: в нее вносили 1 мл 20%-ной метафосфорной кислоты, 4 мл ферментной вытяжки, 2,5 мл буфера рН 5 и 2,5 мл 0,2%-ного раствора аскорбиновой кислоты. Опытные пробы встряхивали на качалке 30 минут, по истечении этого времени в колбы наливали по 1 мл 20%-ной метафосфорной кислоты. Контрольные колбы не встряхивали, в них определяли содержание аскорбиновой кислоты. Для этого из реакционных смесей контрольных и опытных проб брали по 0,5 мл и довели объем до 50 мл 2%-ной метафосфорной кислотой. Из этого раствора брали 10 мл и добавляли 1 мл краски, затем через 35 секунд определяли оптическую плотность на спектрофотометре. Об активности аскорбатоксидазы судили по количеству окисленной аскорбиновой кислоты, которое находили по разнице между контролем и опытом.

Чтобы определить активность полифенолоксидазы, брали шесть колб. В две колбы наливали по 2 мл ферментной вытяжки, приготовленной на буфере рН 5, добавляли 2 мл того же буфера и вносили по 2,5 мл 2%-ного раствора аскорбиновой кислоты и 2,5 мл 0,5%-ного раствора пирокатехина. В две другие колбы вносили по 2 мл ферментной вытяжки, приготовленной на буфере с рН 7,5, добавляли по 2 мл той же буферной смеси и те же количества растворов аскорбиновой кислоты и пирокатехина. В две контрольные колбы вносили по 1 мл 20%-ной метафосфорной кислоты, 2 мл ферментной вытяжки, 2 мл буферного раствора и те же количества аскорбиновой кислоты и пирокатехина. В контрольных пробах без

корбиновой кислоты и пирокатехина. В контрольных пробах без встряхивания определяли содержание аскорбиновой кислоты, как описано выше.

После 30-минутного встряхивания в опытные пробы добавляли по 1 мл 20%-ной метафосфорной кислоты и определяли аскорбиновую кислоту. В данном случае определяли суммарное действие аскорбатоксидазы и полифенолоксидазы, а об активности полифенолоксидазы судили по разности между двумя определениями (активность полифенолоксидазы + аскорбатоксидазы за вычетом активности аскорбатоксидазы).

Для этого брали три колбы, в две из них вносили по 1 мл ферментной вытяжки, приготовленной на буфере рН 7,5, добавляли 2 мл буферного раствора рН 7,5, 2,5 мл 0,2%-ного раствора аскорбиновой кислоты, 2,5 мл пирокатехина и 1 мл 0,09 М H_2O_2 . В третьей колбе проводили контрольные определения. В нее вносили 1 мл 20%-ной метафосфорной кислоты, 1 мл ферментной вытяжки, 2 мл буфера рН 7,5 и те же количества аскорбиновой кислоты, пирокатехина и перекиси. Об активности пероксидазы судили по разнице между двумя определениями (полифенолоксидаза + пероксидаза за вычетом активности полифенолоксидазы).

Литература

1. Чупахина Г.Н. Количественное определение аскорбиновой кислоты колориметрическим методом // Специальный практикум по биохимии и физиологии растений. Томск: Изд-во ТГУ, 1974. С.27-31.
2. Асамов Д.К., Рахимова С.Т. К методике определения активности аскорбатоксидазы, полифенолоксидазы и пероксидазы // Актуальные вопросы физиологии, биохимии и биотехнологии. Ташкент: Изд-во ТГУ, 1991. С. 122-126.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АСКОРБИНАТОКСИДАЗЫ

Аскорбинатоксидаза - фермент, катализирующий окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую. В состав этого фермента входит медь (0,24%).

Наиболее активная аскорбинатоксидаза обнаружена в капусте, огурцах, тыкве, кабачках. Ее активность можно определять по интенсивности поглощения кислорода (в аппарате Варбурга), по измерению путём титрования остатка неокисленной аскорбиновой кислоты в среде и спектрофотометрически. Ниже приводится описание двух последних методов.

Определение активности аскорбинатоксидазы ведут по измерению остатка неокисленной аскорбиновой кислоты. Этот метод модифицирован Л.К. Островской [1].

Реактивы и аппаратура

1. Буферная смесь Мак-Ильвейна, рН 6.
2. Раствор аскорбиновой кислоты (1 мг в 1 см³).

3. 5%-ный раствор метафосфорной кислоты.

4. 0,001 н. раствор иодата калия - KIO_3 (навеску 0,3568 г иодата, высушенного в течение двух часов при $102^\circ C$ растворяют в воде в мерной колбе объемом 1 дм^3 ; в другую колбу на 1 дм^3 берут 100 см^3 и доводят водой до мерной черты).

5. 0,001 н. раствор 2, 6-дихлорфенолиндофенола - краска Тильманса (отвешивают на небольшом часовом стекле 60 мг сухой краски, переносят в мерную колбу на 200 см^3 , прибавляют 100 см^3 дистиллированной воды и 4-5 капель 0,01 н. щелочи; взбалтывают в течение 10 минут, доводят дистиллированной водой до метки и фильтруют в сухую колбу).

6. 1%-ный раствор крахмала.

7. Микробюретка с градуировкой $0,01 \text{ см}^3$, емкостью 5 см^3 .

8. Центрифуга.

Ход анализа

Навеску листьев 1-2 г (в зависимости от активности фермента) помещают в фарфоровую ступку и тщательно измельчают в присутствии буферной смеси Мак-Ильвейна, рН 6. Растертую массу переносят в мерную колбу на 25 или 50 см^3 , доводят буфером до метки и перемешивают. В коническую колбочку на 50 см^3 вносят 2 см^3 полученной вытяжки (гомогената, центрифугата или фильтрата), содержащей фермент, и приливают 2 см^3 раствора аскорбиновой кислоты. Колбы с содержимым выдерживают при температуре 25 или $30^\circ C$ в течение часа. По окончании времени экспозиции реакцию прекращают, добавляя 2 см^3 5%-ного раствора метафосфорной кислоты. Одновременно готовят контрольные пробы. Для этого в конические колбы вносят 2 см^3 суспензии, 2 см^3 5%-ной метафосфорной кислоты и в последнюю очередь - 2 см^3 аскорбиновой кислоты. Остаток неокисленной аскорбиновой кислоты титруют 0,001 н. раствором иодата (1 см^3 0,001 н. KIO_3 равен 0,088 мг аскорбиновой кислоты). В последнем случае титрование ведут до появления синей окраски в присутствии кристаллика (5-10 мг) КJ и нескольких капелек крахмала. Активность фермента (X), выраженную в миллиграммах окисленной аскорбиновой кислоты на 1 г сырой ткани, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(a - v) \cdot T \cdot v_1}{v_2 \cdot n},$$

где a - количество см^3 0,001 н. раствора 2, 6-дихлорфенолиндофенола (или иодата), израсходованного на титрование контрольной пробы;

v - число см^3 0,001 н. раствора 2, 6-дихлор- фенолиндофенола (или иодата), израсходованного на титрование опытной пробы;

T - титр краски (или иодата);

- v_1 - общий объем вытяжки;
 v_2 - объем вытяжки, взятой для титрования;
 n - навеска вещества (в г).

Для пересчета на 100 мг белка производят определение белкового азота в листьях.

Литература

1. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. Л.: Изд-во Колос, 1972. С. 49-50.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АСКОРБИНАТОКСИДАЗЫ

В методе спектрофотометрического определения активности аскорбинатоксидазы использовано свойство аскорбиновой кислоты поглощать свет с максимумом при длине волны 265 нм. Об активности фермента судят по уменьшению величины оптической плотности, учитывая, что степень окисления аскорбиновой кислоты пропорциональна количеству фермента [1].

Реактивы

1. Фосфатный буфер с pH 7,3-7,4.
2. $5 \cdot 10^{-3}$ М раствор .
3. $5 \cdot 10^{-3}$ М раствор $MgSO_4$.
4. $5 \cdot 10^{-5}$ М раствор аскорбиновой кислоты.

Ход анализа

Навеску листьев $1г \pm 0,001г$ тщательно растирают в фарфоровой ступке и переносят в мерную колбу на 50 см^3 с помощью охлаждённого фосфатного буфера. Экстракт центрифугируют при 4000 об/мин или фильтруют на холоде в течение короткого времени. В опытную кювету вносят $0,1 \text{ см}^3$ раствора $MgSO_4$, 2 см^3 фосфатного буфера, $0,1 \text{ см}^3$ ферментной вытяжки (центрифугата или фильтрата) и $0,7 \text{ см}^3$ аскорбиновой кислоты. Устанавливают нулевое положение на приборе по кювете, в которую вносят те же компоненты, что и в опыте, только вместо аскорбиновой кислоты приливают $0,7 \text{ см}^3 \text{ H}_2\text{O}$. С началом измерения опытного образца включают секундомер. Первое измерение проводят через 30 с, а затем повторно каждую минуту в течение 5-6 минут или другого интервала времени в зависимости от активности фермента.

При длительной экспозиции делают контроль на самоокисление аскорбиновой кислоты. Для этого в кювету спектрофотометра вносят $2,3 \text{ см}^3$ фосфатного буфера и $0,7 \text{ см}^3$ аскорбиновой кислоты, определяют оптиче-

скую плотность контрольного раствора в те же промежутки времени, что и основного раствора.

Активность фермента A , выраженную в единицах оптической плотности, вычисляют по формуле :

$$A = \frac{\Delta D V V_2}{\Delta t n V_1} = \frac{(D_1 - D_2) V V_2}{(t_2 - t_1) V_1 n},$$

где D_1 - оптическая плотность раствора в начале определения;

D_2 - оптическая плотность раствора через определённый промежуток времени;

V - общий объём экстракта, см³;

V_1 - объём фильтрата в кювете, см³;

V_2 - общий объём жидкости в кювете, см³;

t - время, мин;

n - масса навески, г.

Литература

1. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. С. 44-45.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗЫ

Пероксидаза играет большую роль в процессе дыхания растений. Наиболее распространенными субстратами, на которые действует пероксидаза в тканях растений, являются полифенолы в свободном состоянии или в форме разнообразных соединений (гликозиды, дубильные вещества) и ароматические амины. Окисление тех или иных соединений пероксидаза осуществляет с помощью перекиси водорода или каких-либо органических перекисей, в том числе перекиси ненасыщенных жирных кислот и каротина.

Спектрофотометрический метод определения активности пероксидазы

Метод основан на измерении оптической плотности продуктов реакции, образовавшихся при окислении гваякола за определённый промежуток времени [1].

Реактивы

1. 0,15 М фосфатный буфер с рН 5,4.
2. 0,15%-й раствор перекиси водорода.
3. Раствор гваякола (183 мг на 25 см³ воды), готовится в день употребления.

Ход анализа

Навеску растительного материала 200-500 мг растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством фосфатного буфера и переносят в мерную колбу на 25 см³, доводят буфером до метки и через 10 минут настаивания экстракт центрифугируют при 4000-6000 об/мин в течение 10 минут.

В опытную кювету спектрофотометра с рабочей длиной 1 см вносят 0,5 см³ субстрата, 1,5 см³ буферного раствора, 0,5 см³ ферментной вытяжки (центрифугата) и 0,5 см³ раствора перекиси водорода. С внесением первой капли перекиси водорода включают секундомер. Первое измерение проводят через 20 с. Отсчеты снимают несколько раз через 20 с в течение 1-2 мин или другого интервала времени. Предварительно устанавливают в нулевом положении стрелку амперметра прибора по контрольной кювете, в которую вносят компоненты реакционной смеси, но вместо перекиси водорода - такое же количество воды (0,5 см³). Оптическую плотность растворов измеряют при 470 нм (максимум поглощения тетрагваякола). Активность *A* выражают в относительных единицах на 1 г сырой массы (или на единицу белка) по формуле:

$$A = (D_2 - D_1) V V_2 \times \frac{60}{(t_2 - t_1) V_{1H}}$$

где D_1 - оптическая плотность раствора в начале опыта (первое измерение);
 D_2 - оптическая плотность раствора в конце опыта;
 t_1 и t_2 - время начала и конца опыта, с; n - масса навески, г; V - общий исходный объём вытяжки, см³;
 V_1 - объём, взятый для проведения реакции, см³;
 V_2 - общий объём жидкости в кювете, см³;
60 - коэффициент перевода в минуты.

Колориметрический метод определения активности пероксидазы (по А.М. Бояркину)

Метод основан на определении скорости реакции окисления бензидина до образования синего продукта окисления определённой концентрации, заранее устанавливаемой на фотоэлектроколориметре [1].

Реактивы и аппаратура

1. Ацетатный буфер с рН 5,4.
2. Раствор бензидина на ацетатном буфере (в мерную колбу на 200 см³ наливают примерно 100 см³ дистиллированной воды, прибавляют 2,3 см³ ледяной уксусной кислоты и 184 мг бензидина; колбу нагревают на водяной бане при 60°С, постоянно взбалтывая; после полного растворения бен-

зидина в колбу добавляют 5,45 г уксуснокислого натрия, охлаждают и доводят водой до метки).

3. 0,3%-ная перекись водорода.

4. Фотоэлектроколориметр.

Ход анализа

Навеску растительного материала массой 200-500 мг тонко растирают в фарфоровой ступке с водой или ацетатным буфером с рН 5,4 и переносят в мерную колбу на 50 см³. После 10 минут настаивания вытяжку центрифугируют при 4000 об/мин. Для измерения активности лучше брать такое разведение вытяжки, чтобы изменение окраски происходило за 20-60 с. В две кварцевые кюветы с рабочей длиной 20 мм приливают по 2 см³ ферментной вытяжки или центрифугата, 2 см³ буферного раствора и 2 см³ бензидина. Кюветы в фотоэлектроколориметре располагают против светофильтров. Измерение проводят с использованием красного светофильтра при 590 нм в следующей последовательности. В начале с помощью левого барабана устанавливают стрелку гальванометра на нуль, затем правым барабаном переводят стрелку гальванометра в крайнее левое положение ($D = 0,125$ или $0,250$). После этого в контрольную правую кювету приливают 2 см³ воды, а в левую опытную (измерительную) - 2 см³ 0,3%-ной перекиси водорода из пипетки с широким отверстием. С внесением первой капли перекиси водорода включают секундомер. Стрелка гальванометра начинает отклоняться от края шкалы к нулевому делению. Секундомер останавливают, когда стрелка гальванометра достигает нулевого деления.

По найденной скорости реакции вычисляют активность A фермента :

$$A = \frac{Dabv}{ct},$$

где D - оптическая плотность, равная 0,125 или 0,250;

a - отношение количества жидкости, взятой для приготовления вытяжки, к массе сырой ткани, см³/г;

b - степень дополнительного разведения вытяжки после центрифугирования;

v - степень постоянного разведения вытяжки в реакционной смеси в кювете;

c - толщина слоя (2 см);

t - время, с.

Литература

1. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. С.41-43.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Цитохромоксидаза - основная терминальная оксидаза. Фермент локализован главным образом в митохондриях, в качестве простетической группы содержит гематин. В составе цитохромоксидазы кроме железа гема обнаружена и медь. Цитохромоксидаза осуществляет окисление восстановленных цитохромов. Активность этого фермента определяют спектрофотометрическим методом, который основан на измерении оптической плотности раствора восстановленного цитохрома *c*, имеющего максимум поглощения при 550 нм [1]. Показателем активности служит величина падения оптической плотности раствора за определённый промежуток времени.

Реактивы

1. 0,15 М фосфатный буфер с рН 7,4.
2. Восстановленный $2,5 \cdot 10^{-5}$ - $5 \cdot 10^{-5}$ М раствор цитохрома *c*; вначале готовят исходный раствор цитохрома *c* (например, 52 мг растворяют в 25 см³ бидистиллированной воды), затем берут 3 см³ приготовленного раствора и смешивают его с 17 см³ буфера с рН 7,4, восстанавливают смесь небольшим количеством (70 мг) гидросульфита (на кончике ланцета), при этом образуется розовая окраска; избыток гидросульфита удаляется окислением кислородом воздуха путём встряхивания в течение 5-10 мин; получение восстановленного раствора цитохрома является важным моментом; проверка степени восстановления может быть проведена на спектрофотометре по Смитсу [2].
3. Красная кровяная соль - $K_3[Fe(CN)_6]$ (ферроцианид калия).

Ход анализа

Навеску растительного материала массой 400-600 мг тщательно растирают в охлажденной ступке с холодным фосфатным буфером с рН 7,4. Растертую массу переносят в мерную колбу емкостью 50 см³ и доводят фосфатным буфером до метки. Вытяжку центрифугируют в течение 15 минут при 3000-4000 об/мин на центрифуге с охлаждением. Для определения используют охлажденный центрифугат. Все ферментные вытяжки (центрифугаты) до измерения должны находиться в сосуде со льдом. Измерение оптической плотности опытного раствора проводят при 550 нм. Вначале по контрольному образцу устанавливают стрелку амперметра прибора в нулевом положении. Контрольный образец содержит 1,5 см³ вытяжки и 1,5 см³ фосфатного буфера с рН 7,4. При работе с митохондриями берут их взвесь в фосфатном буфере и среду выделения в соотношении 1:2 или 2:1 (общий объём 1,5 см³) и добавляют 1,5 см³ буферного раствора.

В опытную кювету вносят 1,5 см³ ферментной вытяжки (центрифугата) или взвеси митохондрий и добавляют 1,5 см³ восстановленного цитохрома *c*. Первое измерение оптической плотности после приливания восстановленного цитохрома *c* производят через 30 с, а затем через 1-2 мин в течение 5-10 мин или другого интервала времени в зависимости от активности фермента. Между отсчетами проверяют настройку прибора по контрольной кювете. При окислении цитохрома *c* цитохромоксидазой оптическая плотность раствора падает. По истечении времени опыта для полного окисления оставшегося неокисленным цитохрома *c* в кювету добавляют 1-2 кристаллика феррицианида калия K₃[Fe(CN)₆], встряхивают и вновь измеряют плотность раствора при 550 нм. Расчет активности фермента производят по формуле:

$$A = \frac{\lg(D_1 - D_3) - \lg(D_2 - D_3)}{t_2 - t_1},$$

где *A* - активность цитохромоксидазы, выраженная в условных единицах;

*D*₁ - оптическая плотность исследуемого раствора в начале опыта (первое измерение);

*D*₂ - оптическая плотность раствора в конце опыта;

*D*₃ - оптическая плотность раствора после окисления цитохрома красной кровяной солью;

t - время (*t*₁ - от начала опыта, *t*₂ - конечное), мин.

Результаты выражают на единицу сырой массы или на единицу белка.

Литература

1. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений.-Л.: Агропромиздат, 1987. С.45-47.

2. Smith L.// Meth. Biochem. 1955. Vol.2. P. 427-435.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПОЛИФЕНОЛОКСИДАЗЫ

Полифенолоксидаза, или о-дифенолоксидаза, или тирозиназа, играет важнейшую роль в дыхании растений, катализируя реакцию окисления полифенолов. Система «полифенол ↔ хинон» является промежуточным звеном при окислении органических соединений в процессе дыхания растений. Этот фермент катализирует окисление в присутствии молекулярного кислорода не только разнообразных полифенолов, но и монофенолов (в частности, тирозина), о-дифенолов с образованием соответствующих хинонов. Установлено, что в зависимости от того, из какого источника получена полифенолоксидаза, способность ее к окислению о-дифенолов, полифенолов и монофенолов различна.

При работе с фенолазами следует иметь в виду, что для создания условий, препятствующих реагированию эндогенных фенолов с белками и ферментами, необходимо добавлять на первых этапах гомогенизации ткани полиамид. Обычно соотношение между навеской сырой ткани и полиамидом 1: 0,5 или 1:1 (получение полиамида см. в приложении).

Активность полифенолоксидазы определяют спектрофотометрическим методом [1], который основан на измерении оптической плотности продуктов реакции, образовавшихся при окислении пирокатехина (или другого субстрата) за определённый промежуток времени.

Реактивы

1. 1/15 М фосфатный буфер с рН 7,4.
2. 0,05 М раствор пирокатехина.

Ход анализа

Навеску растительного материала массой 100-200 мг растирают в фарфоровой ступке в присутствии полиамида (50-100 мг) и буферного раствора, переносят в мерную колбу на 25 см³ и доводят буферным раствором до метки. Центрифугируют при 4000 об/мин в течение 10 мин. При работе с белковыми (ацетоновыми) препаратами фермента готовят растворы с концентрацией белка 20-30 мг/см³.

В опытную кювету спектрофотометра вносят 0,5 см³ ферментной вытяжки, 2,0 см³ фосфатного буфера с рН 7,4 и 0,5 см³ раствора пирокатехина. С первой каплей пирокатехина включают секундомер. Первое измерение проводят через 20 с. Отсчеты снимают несколько раз через 20 с в течение 2 мин (или другого времени).

Предварительно устанавливают нулевое положение стрелки амперметра прибора по контрольной кювете, в которую вносят те же компоненты реакционной смеси, но вместо пирокатехина приливают 0,5 см³ Н₂О. Оптическую плотность измеряют при 420 нм. Активность выражают в относительных единицах на 1 г сырой ткани или на единицу белка за 1 мин. Расчет производят по формуле:

$$A = \frac{(D_2 - D_1)60VV_2}{(t_2 - t_1)V_1H},$$

где D_1 - оптическая плотность раствора в начале опыта (первое измерение);

D_2 - оптическая плотность раствора в конце опыта;

t_1 и t_2 - время в начале и в конце опыта, с;

H - масса навески, г;

V - общий объём ферментной вытяжки, см³;

V_1 - объём, взятый для проведения реакции, см³;

V_2 - общий объём жидкости в кювете, см³;
60 - коэффициент перевода секунд в минуты.

Литература

1. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П., Перуанский Ю.В., Луковникова Г.А., Иконникова М.И. Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, 1987. С.43-44.

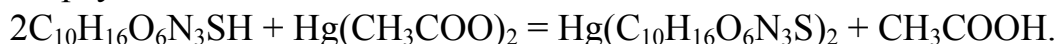
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАТИОНА

Глутатион является трипептидом, состоящим из трех аминокислот: глутаминовой, цистеина и гликоколя.

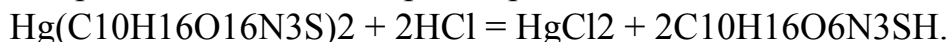
При кислотном гидролизе глутатион распадается на составляющие его аминокислоты. Глутатион играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах, что обусловлено свойством сульфгидрильных групп -SH- легко окисляться, превращаясь в дисульфидную форму -S-S-.

Сущность метода

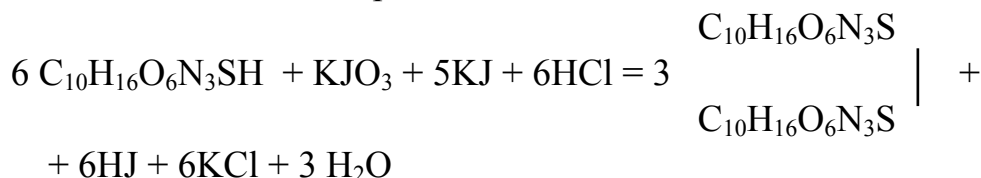
Глутатион в слабощелочной среде с ацетатом ртути дает осадок глутатионата ртути:



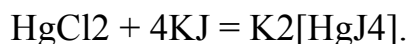
Осадок промывается водой и растворяется в соляной кислоте:



Раствор отделяется от не растворимых в воде веществ, и глутатион, перешедший в раствор, титруется 0,001 н. раствором йодата калия в присутствии йодистого калия и крахмала:



Йодистый калий прибавляется в избытке для связывания ионов ртути в растворимое бесцветное комплексное соединение:



Грамм-эквивалент глутатиона $\frac{6C_{10}H_{16}O_6N_3SH}{6}$ равен 307,3 [1].

Ход анализа

Отвешивают 4 г сырого растительного материала и тщательно растирают в ступке с 2 мл 0,3 н. раствора уксуснокислой ртути и 2 мл 30 %-ного раствора уксуснокислого натрия. Гомогенат из ступки переносят в центрифужную пробирку, смывая остаток 10 мл дистиллированной воды, перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 мин для полноты

осаждения. После этого центрифугируют, раствор отбрасывают, а осадок два раза промывают водой порциями по 10 мл при перемешивании.

В осадке вместе с другими веществами находится глутатион, который растворяют в соляной кислоте. Для этого к остатку в пробирке приливают 10 мл 1 н. раствора соляной кислоты и перемешивают стеклянной палочкой в течение 5 мин. Затем добавляют 1 мл 20%-ного раствора йодистого калия, перемешивают и центрифугируют. Центрифугат переносят в колбу для титрования емкостью 100 мл, а осадок промывают 10 мл воды при перемешивании. После центрифугирования раствор присоединяют к первому центрифугату.

К полученному раствору добавляют 0,5 мл раствора крахмала и титруют 0,001 н. раствором KJ_2 до появления не исчезающей синей окраски. Один мл 0,001 н. раствора KJ_2 соответствует 0,307 мг глутатиона. Содержание глутатиона вычисляют по формуле:

$$X = \frac{30700 \cdot a \cdot K}{n},$$

где X - содержание глутатиона (в мг на 100 г исследуемого вещества);

a - объем 0,001 н. раствора йодата калия, затраченный при титровании глутатиона (в мл);

K - нормальность раствора йодата калия;

n - навеска исследуемого вещества (в г); 30700 - нормальный титр глутатиона (в мг), умноженный на 100 для пересчета на 100 г вещества.

Реактивы

1. *Раствор уксуснокислой окисной ртути (0,3 н.)*. Отвешивают 16,25 г HgO и растворяют при нагревании в 100 мл 20%-ного раствора уксусной кислоты. Полученный раствор разбавляют дистиллированной водой до 500 мл.

2. *Раствор йодата калия (0,001 н.)*. Готовится из 0,1 н. раствора разбавлением дистиллированной водой. Для этого отбирают пипеткой 5 мл 0,1 н. раствора KJ_2 , помещают в мерную колбу на 500 мл, разбавляют водой до метки и перемешивают.

3. *Раствор йодистого калия (20%-ный)*. Отвешивают 20 г KJ ч.д.а., растворяют в воде, прибавляют 1 мл 2 н. раствора едкого натра, доводят водой до 100 мл и сохраняют в темной склянке.

4. *Раствор крахмала (0,5%-ный)*. Отвешивают 2,5 г растворимого крахмала и 10 мг HgI_2 (для консервирования), растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством воды и вливают в 500 мл кипящей воды, кипятят 1 мин и, если нужно, фильтруют.

5. *Раствор уксуснокислого натрия* (30%-ный). Отвешивают 30 г уксуснокислого натрия $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ч.д.а., растирают в ступке с 10 мг HgJ_2 , растворяют в дистиллированной воде, доводят объем до 100 мл и фильтруют.

6. *Раствор соляной кислоты* (~ 1 н.). Набирают 84 мл соляной кислоты пл. 1,19, разбавляют дистиллированной водой до 1 л и перемешивают.

Литература

1. *Починок Х.Н.* Методы биохимического анализа растений. Киев: Наукова думка, 1976. С. 98 - 100.

ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИОЗ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ (по Г.Н. Чупахиной, М.В. Куркиной)

Эндогенный пул триоз растений формируется за счет диоксиацетонфосфата и фосфоглицеринового альдегида фотосинтетического, дыхательного метаболизма и глюконеогенеза, что определяет участие данных моносахаридов в важнейших энергетических процессах. Однако, как показал анализ литературы, методы для определения триоз в растительном материале практически отсутствуют. Известные нам методы [1,2] предложены для анализа данных соединений в культурах микроорганизмов. При разработке метода количественного определения триоз в растениях нами за основу был взят метод В.Г. Плакуновой и М. Кривенко [2], основанный на способности триоз количественно восстанавливать в щелочной среде трифенилтетразолий хлористый (ТТХ) до формазана, имеющего красное окрашивание. Растворив его в ацетоне, можно колориметрически определить количество триоз в растворе, учитывая максимум поглощения формазана при длине волны 490 нм [3]. Модификация метода также коснулась экстракции триоз из растительного материала.

Ход определения

Навеску анализируемого материала (0,5-1,0 г листьев) измельчают ножницами и тщательно растирают в ступке до гомогенного состояния с небольшим количеством (1-2 мл) дистиллированной воды. Полученный гомогенат количественно переносят дистиллированной водой (15 мл) в коническую колбу на 50 мл. Колбу с содержимым хорошо взбалтывают и помещают на кипящую водяную баню, выдерживают в течение 30 минут, периодически помешивая. Затем колбу снимают с водяной бани, охлаждают до комнатной температуры и содержимое ее количественно переносят в мерную колбу на 25 мл, объем доводят до метки дистиллированной водой. Экстракт хорошо перемешивают и отфильтровывают.

К 0,5 мл фильтрата прибавляют 1 мл смеси 0,2%-ного раствора ТТХ и 2 н. раствора NaOH в соотношении 1:1, смешанных перед применением. Одновременно готовят контрольный раствор, для которого вместо фильтрата берут 0,5 мл дистиллированной воды. Реакцию можно проводить в пенициллиновых флаконах. Флаконы закрывают и ставят на 15 минут в темноту до появления розового осадка формаза. Для растворения осадка формаза добавляют сначала 0,5 мл 3н. раствора HCl, а затем 3 мл очищенного ацетона. Оптическую плотность измеряют на КФК-2 за синим светофильтром при длине волны 490 нм по сравнению с контролем.

Количество триоз в 1 мл исследуемого раствора определяют, используя калибровочную кривую для диоксиацетона или формулу. Рассчитывают количество триоз на 1 грамм растительного материала.

Построение калибровочной кривой

Для построения калибровочной кривой 0,1 г диоксиацетона, предварительно высушенного в эксикаторе, в котором в качестве водопоглотителя используется концентрированная серная кислота (95-96%-ная), растворяют в 200 мл дистиллированной воды. Получается раствор, 1 мл которого содержит 500 мкг диоксиацетона. Из данного раствора делают серию разведений, содержащих 5, 10, 15, 20, 25, 30 мкг диоксиацетона в 1 мл.

Из каждого разведения берут по 0,5 мл раствора, прибавляют к нему по 1 мл смеси 2 н. раствора NaOH и 0,2%-ного раствора ТТХ в соотношении 1:1, смешанных перед применением, и ставят на 15 минут в темноту до появления розового окрашивания. Затем для растворения осадка добавляют 0,5 мл 3 н. раствора соляной кислоты и 3 мл ацетона. Одновременно готовят контрольный раствор, содержащий в качестве пробы 0,5 мл дистиллированной воды. Определяют оптическую плотность растворов на КФК-2 при длине волны 490 нм по сравнению с контролем.

Определение проводят в 2-4 повторностях. Данные обрабатывают методом наименьших квадратов и по полученным результатам строят калибровочную кривую.

Вычисление результатов

Содержание триоз в 1 мл растительной вытяжки определяют по калибровочной кривой или по формуле, характеризующей данную концентрационную зависимость. В ходе построения калибровочной кривой нами была получена следующая формула для расчета триоз в 1мл исследуемого раствора:

$$C = \frac{y - 0,00185}{0,00758}, \quad (1)$$

где C - содержание триоз в 1 мл исследуемого раствора в мкг,

y - значение оптической плотности исследуемого раствора.

Содержание триоз на 1 г исследуемого материала вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C \cdot V}{g}, \quad (2)$$

где C - содержание триоз в 1мл исследуемого раствора, мкг;

V - объем вытяжки, полученный из данной навески;

g - навеска исследуемого материала в граммах.

Пример вычисления

Для анализа была взята навеска 0,5 г листьев ячменя. Объем вытяжки, полученный из данной навески, составил 25 мл. Измеренная на КФК-2 оптическая плотность исследуемого раствора - 0,024. Используя формулу (1) находим количество триоз в 1 мл исследуемого раствора:

$$C = \frac{0.024 - 0.00185}{0.00758 \text{ мл/мкг}} = 2,92 \text{ мкг/мл}.$$

Количество триоз в 1 грамме исследуемого материала рассчитываем по формуле (2):

$$X = \frac{2,92 \text{ мкг/мл} \cdot 25 \text{ мл}}{0,5 \text{ г}} = 146 \text{ мкг/г}.$$

Литература

1. Карклия В.А., Веверис А.Я., Жигуре Д.Р. Определение диоксиацетона в культуральных жидкостях *Acetobacter suboxydans* // Прикладная биохимия и микробиология. 1982. Т. 18. Вып. 2. С. 262-265.

2. Плакунова В.Г. Методики количественного определения триоз и глицерина в культурах микроорганизмов // Микробиология. 1962. Т. 31. Вып.6. С. 1094-1097.

3. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. С. 302.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО И ОКИСЛЕННОГО РИБОФЛАВИНА

(по Г.Н. Чупахиной, А.С. Гребенникову, Н.С. Лейба)

Рибофлавин (водорастворимый витамин В₂) входит в состав коферментов-флавинаденинмононуклеотида (ФМН) и флавинадениндинуклеотида (ФАД) дыхательных ферментов. В растворах рибофлавин довольно стоек, на скорость его разрушения влияют свет и рН раствора: в щелочной среде рибофлавин разрушается, а в кислой среде устойчив к нагреванию.

В основу данного метода количественного определения суммарного рибофлавина и его окисленной и восстановленной форм в растительных

тканях положен спектрофотометрический метод анализа рибофлавина в культуральной жидкости штаммов-продуцентов [1], а также флуориметрический метод определения рибофлавина в растениях [2].

Для определения содержания рибофлавина навеску анализируемого растительного материала (1г) растирают в фарфоровой ступке с добавлением 15 мл 0,1 н. раствора HCl до гомогенного состояния.

Растёртую массу количественно переносят в мерный цилиндр на 100 мл и доводят объём смеси 0,1н раствором HCl до 75 мл. Затем содержимое мерного цилиндра переносят в термоустойчивую колбу на 100 мл, которую выдерживают на водяной бане в течение 45 минут при частом помешивании.

Термическая обработка в кислой среде разрушает пигменты и способствует освобождению рибофлавина. По окончании экспозиции содержимое колбы охлаждают и отфильтровывают с помощью бумажного или стеклянного фильтра № 4.

Оптическую плотность раствора определяют спектрофотометрически при 445 нм по отношению к растворителю (01н раствор HCl). Содержание рибофлавина рассчитывают по калибровочному графику. Таким образом определяется окисленная форма рибофлавина.

Для определения общего содержания рибофлавина проводят окисление его восстановленной формы. Для этого в пробирку с притертой пробкой приливают 5 мл фильтрата и нейтрализуют его 0,1 н. раствором NaOH (pH=7). Затем добавляют 0,5 мл 0,05 н. щелочного раствора железосинеродистого калия (16,5 г перекристаллизованного $K_3Fe(CN)_6$ + 70 г Na_2CO_3 в литре воды; раствор хранить в тёмной склянке). Избыток щелочного раствора красной кровяной соли удаляют, добавляя 1,5 мл 18%-ного раствора глюкозы. Пробирку выдерживают на кипящей водяной бане в течение 30 минут, после чего содержимое охлаждают и определяют оптическую плотность раствора при 445 нм.

Рассчитывают суммарное содержание восстановленного и окисленного рибофлавина по калибровочному графику. По разнице определяют восстановленный рибофлавин.

Для построения калибровочного графика навеску чистого рибофлавина (20 мг) растворяют в 500 мл дистиллированной воды. Из данного раствора путём разбавления готовят серию стандартных растворов, содержащих от 1,2 мкг до 12 мкг рибофлавина в 1 мл. Оптическую плотность полученных растворов определяют при 445нм и по результатам спектофотометрирования строят калибровочный график. Количественное содержание рибофлавина выражают в мкг/г растительной ткани.

Литература

1. Полануер Б.М., Дедова О.А., Гаспаров В.С. Сравнение различных методов количественного определения рибофлавина в культуральной жидкости штаммов-продуцентов // Биотехнология. 1995. №5-6. С. 44-47.
2. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.М., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. Л.: Колос, 1972. С. 104-106.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Растение является довольно трудным объектом для исследования нуклеиновых кислот, тем не менее в настоящее время имеется немало методов их количественного определения в различных тканях, которые позволяют определять РНК и ДНК в одной навеске [1]. Определение фосфора РНК и ДНК ведется на спектрофотометре при длине волн 270 и 290 нм в свежем или фиксированном материале. Фиксацию материала можно проводить лиофилизацией или горячим 96%-ным этанолом.

Предварительное удаление пигментов, кислоторастворимого и липидного фосфора является неременным условием спектрофотометрического определения фосфора РНК и ДНК.

Ход работы

Для определения содержания нуклеиновых кислот навеску исследуемого материала (5 - 7 г) помещают в широкую пробирку и заливают 10 - 15 мл 0,5 н. HClO_4 , охлажденной до 0°C. Пробирку с навеской помещают в криогидратную смесь для фиксации. После фиксации навеску с HClO_4 переносят в фарфоровую ступу, тщательно растирают стеклянным песком до гомогенного состояния и прокачивают на ротаторе 30 минут при пониженной температуре. Полученный гомогенат центрифугируют в течение 5 минут при 3000 об/мин. Экстракт сливают и ставят в холодильник. Осадок заливают 10 мл 0,5 н. HClO_4 и прокачивают еще 30 минут при 0°C, а затем центрифугируют при тех же условиях. Экстракты объединяют в мерной колбе или цилиндре, а осадок трижды промывают холодной дистиллированной водой. Промывные воды объединяют с кислотными экстрактами, немедленно нейтрализуют 0,2 н. NaOH по фенолфталеину и доводят до определенного объема. Образующиеся хлопья натриевой соли хлорной кислоты удаляют центрифугированием. Нейтрализованный хлорнокислый экстракт может быть использован для определения свободных адениловых нуклеотидов.

Остаток после удаления кислоторастворимого фосфора трижды обрабатывают 96%-ным этанолом на холоде. Затем проводят многократную

экстракцию смесью этанол-серный эфир (3:1) при комнатной температуре до полного извлечения пигментов. Последний раз остаток промывают эфиром и высушивают в вакуум-эксикаторе. Подготовленная таким образом растительная масса используется для определения нуклеиновых кислот.

Остаток после извлечения кислоторастворимого и липидного фосфора заливают 0,5 н. КОН (или NaOH) из расчета 10 мл щелочи на 100 мг остатка и выдерживают при 37° С в течение часа. Затем охлаждают и центрифугируют 15 минут при 4000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают и ставят в холодильник, а осадок после промывания холодным 0,5 н. КОН отбрасывают. Прозрачные центрифугаты объединяют и нейтрализуют на ледяной бане холодной 57%-ной HClO₄ по фенолфталеину. Затем концентрацию раствора этой кислоты доводят до 5% ее содержания. На холоде выпадает осадок ДНК, а в растворе остается РНК. Через 20 минут осадок отделяют центрифугированием и два раза (по 5 мл) промывают охлажденной 5%-ной HClO₄. Центрифугаты, содержащие РНК, объединяют в конической колбочке на 50 мл, закрывают обратным воздушным холодильником и гидролизуют на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Затем охлаждают и фильтруют через стеклянный фильтр №4 или через обеззоленный “мелкопористый” фильтр. Объем прозрачного фильтрата измеряют и используют для спектрофотометрического определения фосфора РНК.

Осадок ДНК с помощью 5%-ной HClO₄ переносят в коническую колбочку на 50 мл, закрывают обратным воздушным холодильником и гидролизуют 30 минут на кипящей водяной бане. После охлаждения и центрифугирования жидкость сливают в мерную колбочку, а осадок промывают небольшим количеством 5%-ной HClO₄, центрифугируют и надосадочную жидкость присоединяют к первому центрифугату, объем доводят до метки или просто измеряют. Прозрачный раствор спектрофотометрируют. В качестве контроля, против которого измеряют оптическую плотность опытного раствора, берут 5%-ный раствор HClO₄. Оптическую плотность полученных опытных растворов измеряют при 270 и 290 нм.

Вычисление концентрации фосфора нуклеиновых кислот (X) производят по формуле:

$$X = \frac{E_{270} - E_{290}}{190} \text{ мг/мл,}$$

где E - оптическая плотность растворов при соответствующей длине волны. Деление на 190 дает количество фосфора нуклеиновой кислоты в 1 мл раствора.

Пример расчета

При спектрофотометрировании раствора РНК найдена $E_{270} = 836$, а $E_{290} = 506$. Объем раствора РНК составлял 100 мл. Перед определением оптиче-

ской плотности он был разбавлен в 3 раза. Навеска растительного материала в пересчете на сухой вес 0,5 г. Количество фосфора РНК будет:

$$X_{\text{РНК}} = \frac{(0,836 - 0,606) \cdot 100 \cdot 3}{0,5 \cdot 190} = 0,72 \text{ мг/г сухого веса.}$$

Литература

1. Окунцов М.М., Боровик З.И., Гребенников А.С. и др. Специальный практикум по биохимии и физиологии растений. Калининград, 1981. С.8-10.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛИФОСФАТОВ

(по Р. Лангену, Р. Лиссу, модификация И.С. Кулаева и др.)

В обмене веществ многих низших организмов существенное место занимают превращения неорганических полифосфатов, являющихся макроэргическими соединениями. Среди методов, используемых для количественного определения этих соединений, в настоящее время наиболее удачным является метод Лангена и Лисса, модифицированный И.С. Кулаевым с сотрудниками. Данный метод [1] позволяет определять несколько фракций неорганических полифосфатов, различающихся молекулярным весом, внутриклеточной локализаций, а также физиологическим значением.

Ход анализа

Кислоторастворимая фракция. Навеску исследуемого материала (5-7 г) заливают 10-15 мл 0,5 н. HClO_4 и фиксируют в криогидратной смеси. После фиксации навеску с HClO_4 переносят в фарфоровую ступку, растирают с кварцевым песком до гомогенного состояния и прокачивают на ротаторе 30 минут при пониженной температуре. Полученный гомогенат центрифугируют в течение 5 минут при 3000 об/мин. Экстракт сливают и ставят в холодильник. Осадок заливают 10 мл 0,5 н. HClO_4 и прокачивают еще раз в течение 30 минут при 0°C , а затем центрифугируют при тех же условиях. Экстракты объединяют в мерной колбе, а осадок трижды промывают холодной дистиллированной водой. Промывные воды объединяют с кислотными экстрактами, немедленно нейтрализуют 0,2 н. NaOH по фенолфталеину и доводят до определенного объема. Образующиеся хлопья натриевой соли хлорной кислоты удаляют центрифугированием.

Для количественного определения полифосфатов проводят следующие операции. Сначала осуществляют сорбцию нуклеотидов на активированный уголь марки БАУ с размером частиц 0,5-1,0 мм или марки Norit А (Голландия). Перед добавлением угля определяют оптическую плотность экстракта при 260 нм. Сорбцию проводят на холоде при постоянном перемешивании в течение 1-2 часов. Затем уголь отделяют либо центрифугиро-

ванием, либо фильтрованием. В экстракте снова определяют оптическую плотность при 260 нм и, если она составляет более 10% от исходной, обработку углем повторяют. После удаления нуклеотидов в экстракте определяют: 1) ортофосфат ($P_{\text{орто}}$) непосредственно в экстракте; 2) фосфор соединений, гидролизующихся до ортофосфата в течение 7 минут (P_7) и 30 минут (P_{30}); 3) общий фосфор ($P_{\text{общ}}$) после сжигания части экстракта с концентрированной H_2SO_4 и применением в качестве катализатора $HClO_4$. Количество полифосфатов рассчитывают по формуле Ломана и Лангена:

$$ПФ = (P_7 - P_{\text{орто}}) - (P_{30} - P_7),$$

где величина $(P_7 - P_{\text{орто}})$ представляет собой лабильный фосфор фракции.

Содержание стабильного фосфора, который представлен фосфором органических соединений, находят по разности между общим фосфором и суммой фосфора полифосфатов и ортофосфата:

$$P_{\text{орг}} = P_{\text{общ}} - (P_{\text{пф}} + P_{\text{орто}}).$$

Солерастворимая фракция. После удаления кислоторастворимых соединений к остатку добавляют 1,5 г перхлората натрия и 1 мл 0,5 н. $HClO_4$ и прокачивают на холоде в течение 15 минут. После этого добавляют 15 мл холодной дистиллированной воды и продолжают экстракцию еще 15 минут. Экстракт отделяют центрифугированием при 3000 об/мин, данная процедура повторяется дважды. Затем осадок промывается несколько раз холодной дистиллированной водой. Промывные воды объединяют с экстрактами и доводят до определенного объема. Солерастворимую фракцию анализируют так же, как и кислоторастворимую.

Фракция фосфолипидов. Остаток после извлечения солерастворимой фракции трижды обрабатывают 96%-ным этанолом на холоде. Затем проводят многократную экстракцию смесью этанол-серный эфир (3:1) при комнатной температуре до полного извлечения пигментов. Последний раз остаток промывают эфиром и высушивают в вакуум-эксикаторе. Все спиртовые и спирт-эфирные экстракты объединяют в мерной колбе и доводят до метки. В этой фракции определяют общий фосфор после сжигания части экстракта в концентрированной H_2SO_4 и $HClO_4$. По общему фосфору фракции судят о содержании фосфолипидов:

$$P_{\text{общ}} = P_{\text{липидов}}.$$

Щелочерастворимая фракция, рН 8-9. К остатку после удаления липидов добавляют несколько миллилитров холодной дистиллированной воды и с помощью 0,2 н. NaOH доводят рН раствора до 8-9 при $0^{\circ}C$. Экстракцию проводят в течение 40 минут при постоянном перемешивании. Затем экстракт отделяют центрифугированием. К остатку добавляют небольшое количество холодной дистиллированной воды и оставляют еще на 40 минут. Экстракт вновь отделяют центрифугированием. Остаток тщательно про-

мывают холодной водой. Оба экстракта объединяют с промывными водами и доводят до определенного объема. Во фракции определяют: 1) ортофосфат ($P_{орто}$); 2) фосфор соединений, гидролизующихся до ортофосфата в течение 7 минут; 3) общий фосфор. Количество полифосфатов рассчитывают по величине лабильного фосфора фракции:

$$P_{пф} = P_7 - P_{орто}.$$

Органический фосфор определяют по разнице:

$$P_{орг} = P_{общ} - (P_{пф} + P_{орто}).$$

Щелочерастворимая фракция, рН 12. Эту фракцию экстрагируют 0,05 н. NaOH (рН=12) при 0°C и тщательном перемешивании в течение 2 часов. Экстракт отделяют центрифугированием, а остаток несколько раз промывают холодной дистиллированной водой. Промывные воды объединяют с экстрактом и доводят до определённого объёма. Фракцию анализируют так же, как и предыдущую.

Фракция, экстрагируемая $HClO_4$ при 90-100°C. Остаток после удаления щелочерастворимых фракций обрабатывают 0,5 н. $HClO_4$ на водяной бане при 90-100°C последовательно в течение 20 и 10 минут. Остаток после центрифугирования тщательно промывают холодной дистиллированной водой. Экстракты объединяют с промывными водами и доводят до определенного объема. В объединенном экстракте определяют: 1) ортофосфат; 2) общий фосфор. Считается, что ортофосфат этой фракции образуется в основном в результате гидролиза неорганических полифосфатов. Поэтому о количестве полифосфатов в данной фракции судят по величине ортофосфата: $ПФ = P_{орто}$.

Органический фосфор рассчитывают по формуле:

$$P_{орг} = P_{общ} - P_{орто}.$$

Фракция фосфопротеинов. После всех экстракций остаток сжигают с концентрированной H_2SO_4 и $HClO_4$ и определяют общий фосфор. По общему фосфору судят о содержании фосфопротеинов:

$$P_{общ} = P_{фосфопротеинов}.$$

Таким образом, данный метод позволяет учитывать пять различных фракций полифосфатов: кислоторастворимые, солерастворимые, щелочерастворимые при рН 8-9, щелочерастворимые при рН 12 и полифосфаты, экстрагируемые $HClO_4$ при 90-100°C. Кроме того, эта методика дает возможность судить о характере накопления фосфора в некоторых органических соединениях. Так, органический фосфор кислоторастворимой (после сорбции нуклеотидов) и солерастворимой фракций представлен в основном фосфором углеводов. Следовательно, органический фосфор обеих фракций может отражать характер накопления фосфоуглеводов. О фосфоре липидов можно судить по фосфору фракции, извлекаемой смесью эта-

нол-эфир. Органический фосфор щелочерастворимых фракций и фракции горячего кислотного экстракта содержит до 95% фосфора нуклеиновых кислот. Поэтому органический фосфор этих трех фракций позволяет судить о характере накопления нуклеиновых кислот. Остаток при данных условиях фракционирования содержит в основном фосфопротеины, следовательно, величина остатка фосфора может характеризовать накопление фосфопротеинов.

При количественном учёте неорганических полифосфатов определение фосфора можно проводить по методу Пануша и др [2]. При использовании этого метода может происходить некоторый гидролиз кислотолабильных соединений, но зато он прост и быстр.

Ход определения

К 2,75 мл раствора, содержащего от 20 до 200 нМ фосфата, добавляют 1,25 мл ацетатного буфера рН (9 г уксуснокислого натрия и 0,5 мл сернокислой меди доводят до 100 мл 4 н уксусной кислотой), 0,5 мл раствора молибдата (5%-ный раствор молибдата аммония в воде) и 0,5 мл метольного реактива (0,2%-ный раствор метола в 5%-ном растворе сульфата натрия). Через 60 минут измеряют поглощение раствора на спектрофотометре при длине волны 960 нм с кислородно-кадмиевым элементом. Количество фосфора в пробе определяют по калибровочной кривой.

Для определения P_7 и P_{30} к 1 мл пробы добавляют 1 мл 2 н. HCl. Раствор гидролизуют 7 и 30 минут соответственно при 100°C, после чего быстро охлаждают и проводят определение фосфора, как описано выше.

Для определения общего фосфора к части пробы добавляется 0,5 мл концентрированной HClO₄ и 10 мл H₂SO₄. После упаривания при 120°C проба сжигается при 200°C до полного обесцвечивания. Нейтрализованную после сжигания пробу доводят до определенного объема и определяют ортофосфат.

Литература

1. Окунцов М.М., Боровик З.И., Гребенников А.С. и др. Специальный практикум по биохимии и физиологии растений. Калининград, 1981. С. 23-26.
2. Panusz H.T., Graczyk G., Wilmanska D., Skarzynsky I. Analysis of orthophosphate-pyrophosphate, mixtures resulting from weak, pyrophosphatase activities. // *Analyt. Biochem.* 35(2). 1970. 494-504.

БЫСТРОЕ КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИТРАТОВ

(по Д. Кательдо и др.)

Определение нитратов в растительных тканях титрованием салициловой кислотой [1] можно вести в высушенном и сыром материале. В первом случае материал фиксируется острым паром в течение 5 минут и досуши-

ваются до постоянного веса при $t = 70^{\circ} \text{C}$. Высушенный образец измельчается, берется навеска в 50 или 100 мг, заливается деионизованной водой - 5 или 10 мл соответственно.

При определении нитратов в сыром материале берется навеска 1 г и 6 мл воды или фосфатного буфера. Гомогенат фильтруется, и фильтрат центрифугируется при 3000g 15 минут. Супернатант сливается и используется для анализа.

В анализе используется деионизованная вода - вода, освобожденная от ионов и катионов. Дистиллят можно брать в том случае, если он свободен от нитратов. В противном случае его нужно пропустить через катионит, чтобы освободиться от нитратов и нитритов.

Суспензия инкубируется при 45°C 1 час при постоянном встряхивании, далее центрифугируется (5000g, 15 мин). Супернатант декатируется и используется для анализа. В колбу Эрленмеера на 50 мл заливается 0,2 мл центрифугата и 0,8 мл 5%-ного раствора салициловой кислоты, приготовленной на концентрированной серной кислоте (использовать серную кислоту марки ХЧ, в темной склянке раствор может храниться в течение 1 недели).

Через 20 минут при комнатной температуре в колбу медленно тонкой струей приливается из бюретки 19 мл 2 н. NaOH. Содержимое колбочки при этом нужно постоянно перемешивать. При наличии в образце нитратов появляется стойкое желтое окрашивание, стабильное на протяжении 48 часов. Раствор охладить и фотометрировать при 410 нм.

В качестве контроля используется образец, приготовленный так же, как опытный, только вместо фильтрата в него вносится 0,2 мл воды.

Калибровочный график для определения нитратов строится по KNO_3 . KNO_3 гигроскопичен, поэтому перед взятием навески его нужно высушить в термостате до постоянного веса. При приготовлении серии растворов с разной концентрацией KNO_3 (5 мкг/мл - 55 мкг /мл) для построения калибровочного графика нужно брать их в объеме не более 0,2 мл, если же объем меньше 0,2 мл, то его нужно доводить водой до 0,2 мл.

Определение нитратов можно вести в присутствии ионов хлора (до 2%), аммония и нитритов.

Литература

1. *Cataldo D.A., Haroon M., Schrader L.E., and Youngs V.L.* Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by titration of salicylic acid// *Commun. Soil Science and plant analysis.* 1975. V. 6(1). P.71 - 80.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА ХЛОРОПЛАСТОВ, КОЛИЧЕСТВА КЛЕТОК И ИХ ОБЪЕМА В ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ТКАНЯХ

Данные показатели определяются по методу А.Т. Мокроносова и Р.А. Борзенковой [1].

Пробы для измерений отбираются с помощью пробочных сверл с известным диаметром. В любом случае желательно иметь данные о собственном возрасте листа и площади листовой пластинки. Учитывая неоднородность разных участков листа, следует отбирать пробы либо на определенном участке, либо брать средние пробы равномерно по всей поверхности листа. При массовых исследованиях на одном объекте рекомендуется предварительно изучить степень структурной гетерогенности листовой пластинки. Это особенно важно для листьев однодольных - очень неоднородных по длине. Для большинства двудольных растений можно рекомендовать проводить оценку на средних участках листа, справа или слева от центральной жилки.

Подсчет числа клеток, числа хлоропластов в клетке, определение размера клеток проводится на листьях, фиксированных в 70%-ном этаноле. В этом случае пробы могут храниться в холодильнике в течение 3-4 месяцев.

Количество клеток фотосинтезирующих тканей (тыс/см²)

Для определения числа клеток в единице площади листа фиксируют этанолом. Одна проба включает 5 дисков диаметром 9,8 мм (сверло №4, общая площадь 3,8 см²).

Подсчет числа клеток производят в суспензии после предварительной мацерации тканей. Для получения суспензии пробирки с дисками, куда приливают 1 мл раствора HCl, помещают на водяную баню. Условия мацерации тканей подбирают для каждого объекта. Мацерация для подавляющего числа растений производится 0,5 - 1,0 н. HCl при 60 - 100°. Некоторые объекты (например, осоки и злаки) требуют более жестких условий мацерации, и концентрация HCl может увеличиваться до 5,0 н. Время мацерации 10 - 30 мин. Затем объем доводят водой до 5 мл и пробирку тщательно взбалтывают до получения однородной суспензии. Следует иметь в виду, что слишком жесткие условия мацерации могут привести к разрушению клеток. При работе с крупноклеточными объектами (картофель, свекла, табак, салат, и др.) подсчет клеток ведут в камере Фукса-Розенталя ($V = 3,2 \text{ мм}^3$). Если клетки мелкие и в суспензии их очень много (большинство древесных растений, злаки и др.), лучше использовать камеру Горяева ($V = 0,9 \text{ мм}^3$). Клетки подсчитывают по всему полю камеры. В исключительных случаях подсчет ведут в 0,5 - 0,25 поля камеры.

Самый простой подсчет - определение общего количества клеток в камере. Он производится при отсутствии дифференцировки листа на пали-

садную и губчатую ткани. Если лист дифференцирован, возможны следующие случаи.

1. На поперечном срезе листа видна резкая грань между палисадной и губчатой тканью, и клетки этих тканей отличаются по форме. В суспензии подсчитывают (отдельно) палисадные и губчатые клетки. Для проверки нужно подсчитать общее число клеток. Если установлено, что сумма губчатых и палисадных клеток, полученная путем сложения, равна или близка к общей сумме клеток, полученной при подсчете, то в дальнейшем подсчет общего числа клеток можно не производить.

2. Палисадная и губчатая ткани имеют резкую грань, но по форме клетки мало отличаются друг от друга. В суспензии трудно различить палисадные и губчатые клетки. В этом случае на поперечном срезе определяют количественное соотношение палисадных (П) и губчатых (Г) клеток. Затем в суспензии подсчитывают количество клеток. Зная отношение П/Г, можно определить количество палисадных и губчатых клеток в суспензии.

3. Палисадная и губчатая ткани не имеют определенной грани: палисадная ткань постепенно переходит в губчатую и, следовательно, имеется слой клеток, которые можно отнести и к палисадной, и к губчатой ткани. Здесь неизбежна условная граница между тканями или выделение третьего промежуточного слоя. Как во втором случае, определяют соотношение П/Г и вычисляют количество клеток разных тканей.

Следовательно, прежде чем приступить к мацерации, необходимо приготовить поперечный срез листа и тщательно изучить степень дифференцировки тканей.

При подсчете клеток следует учитывать только хлорофиллоносные клетки и не принимать во внимание клетки эпидермиса, волосков, сосудисто-волокнистых пучков и других тканей. Если условия мацерации ткани выбраны верно и получена однородная суспензия, подсчет клеток будет зависеть от тщательного перемешивания суспензии перед взятием пробы и правильного притирания стекла в камере. Анатомический анализ на многих видах растений показал, что при подсчете клеток в камере наиболее часто встречающийся коэффициент вариации (V%) равен 20%. За счет тщательности работы наблюдателя коэффициент можно снизить до 10-15%.

Если $V\% = 20$, то для определения среднего значения необходимо подсчитать количество клеток не менее чем в 16 камерах при заданной ошибке ($S_x\%$) 10% при $\beta = 0,95$ и не менее чем в 27 камерах при $\beta = 0,99$.

Для пересчета количества клеток в тыс./см² нужно умножить среднее значение числа клеток в полном объеме камеры Фукса – на коэффициент

$K=411$, камеры Горяева - на коэффициент $K=1462$. Эти коэффициенты справедливы для условий, когда проба листьев имеет площадь $3,8 \text{ см}^2$, а объем суспензии - 5 мл.

Объем клеток (тыс. мкм^3)

Суспензия клеток используется для определения размеров клеток палисадной ткани, имеющих форму цилиндра или эллипсоида. Как показывают специальные исследования, мацерация фиксированной этанолом ткани практически не влияет на размер клеток. Например, измерение палисадных клеток табака на поперечном и тангентальном срезах свежих листьев дало значение: $L=117,6 \text{ мкм}$, $D=34,7 \text{ мкм}$ (среднее из 100 измерений). Изменяя клетки в суспензии после мацерации, получили близкие значения: $L=111,4 \text{ мкм}$, $D=35,4 \text{ мкм}$.

Для измерения клеток каплю суспензии помещают на предметное стекло и осторожно закрывают покровным. На покровное стекло не давят. Палисадные клетки фотографируют при увеличении 15×10 или 15×20 (в зависимости от размера). При этом же увеличении фотографируют шкалу объект-микрометра. Полученные негативы проектируют на экран фотоувеличителя и с помощью линейки объект-микрометра измеряют длинную (L) и короткую (D) оси клеток, включая клеточную оболочку. Объем клеток рассчитывается по формуле цилиндра:

$$V = \pi r^2 L K,$$

где K - поправочный коэффициент, величина которого меняется в зависимости от соотношения L/D .

Эти коэффициенты эмпирически найдены Ю.Л. Цельникер и имеют следующие значения:

L/D	2,6	2,8	3,0	3,2	3,4	3,6	3,8	4,0	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0
K	0,69	0,70	0,73	0,76	0,78	0,82	0,83	0,86	0,89	0,92	0,94	0,97	1,00

При отношении L/D больше 5 поправочный коэффициент можно не вносить, так как клетка может быть принята за цилиндр. При отношении L/D меньше 2,5 объем клетки целесообразно определять по формуле эллипсоида вращения:

$$V = \frac{4}{3} \pi \cdot \frac{L}{2} \left(\frac{D}{2} \right)^2.$$

Средний объем клеток можно рассчитывать двумя путями.

1. Определяется объем каждой отдельной клетки и затем вычисляется средний объем.

2. Объем вычисляется по средним значениям L и D . Такой способ расчета проще, но ошибка найденного среднего объема клеток увеличивается, так как он определяется по формуле произведения средних.

При определении средних значений L и D $V\% = 15 - 20$. Измеряя 50 - 100 клеток при $V\% = 15 - 20$, имеем $Sx\%$ не более 5% при $\beta = 0,95$.

Большую трудность вызывает измерение объема клеток в губчатой ткани, так как у многих объектов эти клетки имеют неправильную форму. В этом случае возможны два решения, которые дают лишь приближенные значения объема клеток.

1. Делают и фотографируют тангентальный срез с нижней поверхности листа. Снимки проецируют на экран и определяют площадь контуров 50 - 100 клеток. Затем, пользуясь объект-микрометром, измеряют высоту клетки на поперечном срезе. Объем определяют по произведению площади проекции клетки на высоту.

2. Получив серию снимков поперечных и тангентальных срезов листа, можно построить объемную модель клетки из пластилина в удобном масштабе и определить объем клетки по объему модели, используя при этом удельный вес пластилина. Этот случай оказывается единственно возможным при необходимости определить объем клетки у растений, имеющих очень сложную амебообразную форму клеток (например, у некоторых папоротников). Ошибка измерений при этом значительна.

Число хлоропластов в клетке

Чаще всего при мацерации тканей хлоропласты в клетке сохраняют свою целостность и можно подсчитать их количество. Если число хлоропластов в клетке невелико (до 30), подсчет можно производить в нативной клетке. Если хлоропластов более 30, непременным условием является приготовление давленных препаратов. Каплю суспензии помещают на предметное стекло и закрывают покровным. Небольшого нажатия на покровное стекло достаточно, чтобы хлоропласты в клетке распределились по плоскости. Клетка при этом изменяет свою форму, но при некотором навыке удастся различить палисадные и губчатые клетки.

Применение давленных препаратов повышает скорость и точность измерений по сравнению с подсчетом хлоропластов в целых клетках. На давленных препаратах обнаруживают на 30-50% больше пластид, чем в целых клетках. Подсчет хлоропластов у объектов с большим числом пластид (150 - 300) облегчается, если применять окулярную сетку.

При подсчете хлоропластов нужно быть очень внимательным, так как за хлоропласты можно принять их фрагменты. Разрушение хлоропластов иногда происходит во время приготовления давленных препаратов или при

мацерации, если условия мацерации оказываются слишком жесткими, а также при длительном хранении фиксированного материала. В некоторых случаях наблюдается плазмолиз клетки и агглютинация хлоропластов. Тогда подсчет хлоропластов ведут на свежем материале на срезах.

Как правило, клетки палисадной и губчатой ткани существенно отличаются по объему и по числу хлоропластов. Поэтому число хлоропластов определяют отдельно в тех и других клетках. В свою очередь среди палисадных и губчатых клеток вариация по размеру составляет, как указывалось, 15-20%, а в некоторых случаях может достигать 30-35%. Поэтому при определении средней величины количества хлоропластов в клетке нужно стремиться к тому, чтобы при подсчете в поле зрения микроскопа попадали разные по величине клетки. В противном случае можно получить искаженный результат.

Средний коэффициент вариации числа хлоропластов в клетке 25-30%. Для определения среднего значения числа хлоропластов в клетке при $\beta = 0,95$ и $Sx \% = 10$ нужно произвести подсчет не менее чем в 25 - 35 клетках, а при $Sx \% = 5$ в 100 - 140 клетках.

Литература

1. Мокронос А.Т., Борзенкова Р.А. Методика количественной оценки структуры и функциональной активности фотосинтезируемых тканей и органов // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 1978. Т.61. Вып. 3. С.119-133.

ПОЛУЧЕНИЕ АЛЬБИНОСНЫХ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ

(по Г.Н. Чупахиной)

Для получения альбиносных проростков ячменя в качестве мутагена используется антибиотик стрептомицин, который ингибирует у бактерий 30S-субъединицы 70S-рибосом, в результате чего появляются ошибки при считывании природной матрицы. Помимо бактерий 70S-рибосомы содержат хлоропласты растений, поэтому обработка семян ячменя стрептомицином приводит к подавлению синтеза хлорофилла. Из обработанных семян появляются проростки, первый лист которых имеет пигментированной только верхнюю часть, составляющую не более четверти от всей длины листа. Между зеленым и альбиносным участками находится небольшая переходная желто-зеленая зона.

Семена ячменя обрабатываются раствором стрептомицина в концентрации 2,5 мг/мл. Семена помещаются в чашки Петри в два слоя и смачиваются раствором антибиотика. Через сутки раствор впитывается семенами, поэтому приливается новая порция стрептомицина. Возможна другая схема обработки семян: первоначально семена замачиваются в воде, а че-

рез сутки вода заменяется на раствор антибиотика. Семена выдерживаются в чашках Петри до прорастания, затем высаживаются в почву. Для посева используются только проросшие в растворе стрептомицина семена.

Экспериментально полученные альбиносные проростки используются в исследовательской работе, в частности при изучении светозависимых процессов, не связанных с фотосинтезом.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛАГОЁМКОСТИ ПОЧВЫ

Под полной влагоемкостью почвы понимают то количество воды, которое способна удержать данная почва. Определение полной влагоемкости почвы необходимо при постановке опытов с почвенными культурами. Эта работа складывается из двух задач: 1) определения влажности почвы; 2) определения ее влагоемкости.

Для определения влажности почвы в металлический или стеклянный весовой стаканчик (с известным весом) берется навеска почвы и высушивается в сушильном шкафу при температуре 100-150° С в течение примерно 6 часов. После этого стаканчик с почвой ставят в эксикатор, где он остывает, а затем взвешивают. После первого взвешивания высушивание продолжается в течение часа, затем стаканчик с почвой взвешивают еще раз. Если вес стаканчика с почвой не изменился, то после второго взвешивания делают соответствующие расчеты. Во многих случаях двукратного высушивания почвы бывает вполне достаточно. В противном случае необходимо продолжить сушку до постоянного веса. Ниже приводим пример расчета влажности почвы.

Таблица 1

Определение влажности почвы (вес в г)

Вес бюкса	Вес бюкса с почвой	Вес почвы	Вес бюкса с почвой после высушивания			Убыль в весе (кол-во воды)	Кол-во воды в %
			1	2	3		
22,55	28,55	6,00	27,50	27,47	27,47	1,08	18,0

Количество воды рассчитывают в процентах к весу почвы:

$$\begin{aligned}
 6 \text{ г} & - 100 \% \\
 1,08 \text{ г} & - x\% \\
 x & = \frac{1,08 \cdot 100}{6} = 18\%.
 \end{aligned}$$

Вычисленный процент воды заносится в последнюю графу вышеприведенной таблицы.

Для определения влагоемкости употребляют цилиндры с сетчатым дном, впаянным на 1 - 2 см выше нижнего края цилиндра. Диаметр цилиндра 5 - 6 см, высота 15 - 18 см.

Можно брать стеклянные трубки, обвязанные с одного края марлей. Перед тем как насыпать землю в цилиндр, на дно его кладут кружок из полотна или фильтровальной бумаги и цилиндр со смоченным кружком взвешивают; затем в него берут навеску анализируемой почвы. После этого цилиндр помещают в чашку с водой (под цилиндр подкладывают стеклянные палочки, чтобы дать свободный доступ воде ко дну цилиндра). Нужно следить за тем, чтобы уровень воды в чашке не был ниже дна цилиндра, но и не стоял высоко. В первом случае почва не будет смачиваться, а во втором - нижний слой будет перенасыщаться водой. Цилиндр сверху покрывают стеклянным колпаком для создания пространства, насыщенного парами воды. Когда почва будет смочена до самого верха, цилиндр вынимают из чашки, ставят на полотенце или фильтровальную бумагу для удаления излишков воды и затем взвешивают.

Взвешивание обычно производят через 48 часов после закладки опыта. После этого цилиндр снова ставят в чашку с водой и через 2 часа производят вторичное взвешивание. Если вес цилиндра с почвой не изменился, то принимают полученную цифру, в противном случае продолжают насыщение почвы водой до постоянного веса. Расчёты для определения влагоемкости почвы производят следующим образом.

Таблица 2

Определение влагоемкости почвы (вес в г)

Вес цилиндра	Вес цилиндра с почвой	Вес почвы	Вес цилиндра с почвой, насыщенной водой			Прибыль в весе (кол-во поглощ. воды)	Кол-во поглощ. воды в %
			1	2	3		
127,32	358,52	231,20	409,37	409,36	409,38	50,86	22

Количество поглощённой воды определяют в процентах к весу взятой почвы. Вычисленный процент заносят в соответствующую графу таблицы.

$$\begin{aligned}
 &231,20 - 100\% \\
 &50,86 - x\% \\
 &x = \frac{50,86 \cdot 100}{231,20} = 22\% .
 \end{aligned}$$

Далее определяют общую (полную) влагоёмкость почвы. Она равняется проценту воды, уже содержащейся в почве (см. табл. 1), и проценту воды, поглощённой почвой (см. табл. 2), т.е. $18+22=40(\%)$.

Общая (полная) влагоёмкость рассчитывается на абсолютно сухую почву. Пример соответствующих расчетов приводится ниже.

Определение количества абсолютно сухой почвы в 100 г данной почвы:

$$100,0 - 18,0 = 82,0 \text{ (г)}.$$

Определение влагоёмкости в 100 г абсолютно сухой почвы:

$$\begin{array}{r} 82,0 - 40,0 \\ 100 - x \\ x = \frac{100 \cdot 40}{82,0} = 48,78 \text{ (г)} \end{array}$$

Обычно при поливе растений поддерживают влажность почвы на уровне 60-70% от полной влагоёмкости. Ниже мы даем соответствующие расчёты.

Определение количества воды на 100 г абсолютно сухой почвы при 60% от полной влагоёмкости:

$$\begin{array}{r} 100\% - 48,78 \text{ г} \\ 60\% - x \text{ г} \\ x = \frac{48,78 \cdot 60}{100} = 29,27 \text{ (г)}. \end{array}$$

Определение полной влагоёмкости почвы, а также оптимальной влажности (60-70% от полной влагоёмкости) необходимо для расчётов количества поливной воды в работе с почвенными и песчаными культурами.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ МЕТОДОМ ПОПАРНЫХ СРАВНЕНИЙ

В физиологических и биохимических исследованиях встречаются случаи, когда, несмотря на несоответствие сравниваемых выборок нормальному распределению, они могут быть обработаны по параметрам нормального распределения или распределения Стьюдента благодаря возможности сопоставления пар измерений [1].

Для примера приводится статистическая обработка данных опытов по изучению действия винной кислоты на биосинтез витамина С в проростках ячменя. Взяты варианты: листья ячменя, находящиеся на растворе винной кислоты (x_1), и контрольные листья (x_2):

Таблица 3

Уровень витамина С в листьях ячменя, мкг/г

На растворе винной кислоты	Контроль	d	d ²	Σd ²
114,7	99,7	15,0	225,0	4686,0
132,9	100,1	31,8	1011,2	
140,6	114,4	26,2	686,4	
129,6	102,5	27,1	734,4	
120,5	86,9	33,6	1129,0	
120,5	90,5	30,0	900,0	

$$X_1 = 126,5; \quad X_2 = 99,0; \quad D = 27,5; \quad D^2 = 756,25$$

d - разница между парными значениями сравниваемых величин;

D - разница между средними арифметическими сравниваемых совокупностей.

Средняя квадратичная ошибка различий, наблюдаемых между парными вариантами:

$$m_d = \sqrt{\frac{\left(\frac{\sum d^2}{n} - D^2\right)}{(n-1)}} = \sqrt{\frac{\left(\frac{4686,0}{6} - 756,2\right)}{(6-1)}} = \sqrt{4,96} = 2,22.$$

Критерий достоверности:

$$t = \frac{D}{m_d} = \frac{27,5}{2,22} = 12,39.$$

Для уровня значимости $P=0,05$ и числа степеней свободы $n=5$ табличное значение критерия достоверности $t=2,57$ (см. приложение, табл. 9). Полученное в опыте $t=12,39$ значительно больше табличного, значит, существующие различия между этими двумя вариантами опыта достоверны.

Литература

1. Методы биохимического анализа растений. / Под ред. В.В. Полевого, Г.Б. Максимова. Л.: Изд-во ЛГУ, 1978. С.174-176.

Приложение

Таблица 1

Разбавление концентрированных кислот (плотность H₂SO₄ - 1,84, HCl - 1,19, HNO₃ - 1,42)

H ₂ SO ₄		HCl		HNO ₃	
Требуемая плотность	Кол-во кислоты (мл), добавляемое к 100 мл воды	Требуемая плотность	Кол-во кислоты (мл), добавляемое к 100 мл воды	Требуемая плотность	Кол-во кислоты (мл), добавляемое к 100 мл воды
1,15	15	1,04	24	1,10	23
1,20	21	1,06	41	1,15	39
1,25	28	1,08	65	1,20	61
1,30	36	1,10	99	1,25	94
1,35	46	1,12	151	1,30	150
1,40	57	1,14	250	1,35	281
1,45	70	—	—	—	—
1,50	85	—	—	—	—
1,55	104	—	—	—	—
1,60	128	—	—	—	—

Таблица 2

Разбавление этилового спирта водой при 15,6° С
(количество мл воды, которое нужно добавить к 100 мл
исходного раствора)

Требуемая концентрация, % по объему	Исходная концентрация спирта, % по объему								
	90	85	80	75	70	65	60	55	50
85	6,56								
80	13,79	6,83							
75	21,89	14,83	7,20						
70	31,05	23,14	15,35	7,64					
65	41,53	33,03	24,66	16,37	8,15				
60	53,65	44,48	35,44	21,47	17,58	8,76			
55	67,87	57,90	48,07	38,32	28,63	19,02	9,74		
50	84,71	73,90	63,04	52,43	41,47	31,25	20,47	10,35	
45	105,34	93,30	81,38	69,54	57,78	46,09	34,46	20,90	11,41
40	130,80	117,34	104,01	90,76	77,58	64,48	51,43	38,46	25,55
35	163,28	148,01	132,88	117,82	102,84	87,93	73,08	58,31	43,59
30	206,22	188,57	171,05	153,61	136,04	118,94	101,71	84,54	67,45
25	266,12	245,15	224,30	203,53	182,83	162,21	141,65	121,16	100,73
20	355,8	329,84	304,01	278,26	252,58	226,98	201,43	175,96	150,55
15	505,27	471,00	436,85	402,81	368,83	334,91	301,07	267,29	233,64
10	804,54	753,65	702,89	652,21	601,60	551,96	500,59	450,19	399,85

Пример: чтобы получить 70%-ный спирт из 90%-ного, следует к 100 мл 90%-ного спирта добавить 31,05 мл воды.

Таблица 3

Фосфатный буфер 0,1 М

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

Двузамещенный фосфат натрия (Na₂HPO₄ · 2H₂O), относит. мол. масса 178,05; однозамещенный фосфат натрия (NaH₂PO₄ · H₂O), относит. мол. масса 138. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 200 мл.

Таблица 4

Ацетатный буфер 0,2 М

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

Ацетат натрия (CH₃COONa · 3H₂O), относит. мол. масса 136,09

Таблица 5

Трис HCl-буфер 0,05 М

рН при температуре		0,2 М раствор трис, мл	0,1 М раствор HCl, мл
23°C	37°C		
9,10	8,95	25	5,0
8,92	8,78	25	7,5
8,74	8,60	25	10,0
8,62	8,48	25	12,5
8,50	8,37	25	15,0
8,40	8,27	25	17,5
8,32	8,18	25	20,0
8,23	8,10	25	22,5
8,14	8,00	25	25,0
8,05	7,90	25	27,5
7,96	7,92	25	30,0
7,84	7,73	25	32,5
7,77	7,63	25	35,0
7,66	7,52	25	37,5
7,54	7,40	25	40,0
7,36	7,22	25	42,5
7,20	7,05	25	45,0

Трис, относит. мол. масса 121,14. Объем раствора доводят дистиллированной водой до 100 мл.

Таблица 6

Охлаждающие смеси

Вещество	% вещества в смеси со льдом	Температура смеси, °С
NH ₄ Cl	20	-15,5
NH ₄ NO ₃	31	-26
NH ₄ NO ₃	16	-14
NaCl	24	-21
CaCl ₂ ·2H ₂ O	55	-40
Спирт этиловый	50	-24
Твердая углекислота	—	-78,8
Твердая углекислота с этанолом	—	от -72 до -115
Твердая углекислота с ацетоном	—	-80
Жидкий азот	—	-196
Жидкий азот с ацетоном	—	до -150

Таблица 7

Индикаторы

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

Таблица 8

Плотность некоторых органических жидкостей при комнатных температурах

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

РАСЧЕТ ВЕЛИЧИНЫ УСКОРЕНИЯ СИЛЫ ТЯЖЕСТИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ РАДИУСА И ЧИСЛА ОБОРОТОВ ЦЕНТРИФУГИ

Соотношение между ускорением силы тяжести g и числом оборотов в минуту при центрифугировании определяют по формуле:

$$Q = -\frac{2\pi \cdot n^2 r}{60 \cdot 981},$$

где n - число оборотов в минуту; r - радиус центрифуги (расстояние от оси центрифуги до дна пробирки), см.

Таблица 9

**Значения t при разных уровнях значимости P
и числах степеней свободы ($n-1$)**

Число степеней свободы ($n-1$)	Уровень значимости (P)			
	0,1	0,05	0,02	0,01
1	6,314	12,706	31,821	63,657
2	2,920	4,303	6,965	9,925
3	2,353	3,182	4,541	5,841
4	2,132	2,776	3,747	4,604
5	2,015	2,571	3,365	4,032
6	1,943	2,447	3,143	3,707
7	1,895	2,365	2,998	3,499
8	1,860	2,306	2,896	3,355
9	1,833	2,262	2,821	3,250
10	1,812	2,228	2,764	3,169
11	1,796	2,201	2,718	3,106
12	1,782	2,179	2,681	3,055
13	1,771	2,160	2,650	3,012
14	1,761	2,145	2,624	2,977
15	1,753	2,131	2,602	2,947
16	1,746	2,120	2,583	2,921
17	1,740	2,110	2,567	2,898
18	1,734	2,101	2,552	2,878
19	1,729	2,093	2,539	2,861
20	1,725	2,086	2,528	2,845
21	1,721	2,080	2,518	2,831
22	1,717	2,074	2,508	2,819
23	1,714	2,069	2,500	2,807
24	1,714	2,064	2,492	2,797
25	1,708	2,060	2,485	2,787
26	1,706	2,056	2,479	2,779
27	1,703	2,052	2,473	2,771
28	1,701	2,048	2,467	2,763
29	1,699	2,045	2,462	2,756
30	1,697	2,042	2,457	2,750
~	1,645	1,960	2,326	2,576

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПОРОШКА ПОЛИАМИДА (ПОЛИКАПРОЛАКТА-
МА)**

Сырьём для получения полиамида служат отходы прядильного капронового производства.

Первый способ. Бесцветное капроновое волокно или пряжу тщательно отмывают от загрязнения минеральными маслами с помощью стирального порошка, прополаскивают водой и сушат при 50-60°C. Затем обезжиривают дважды хлороформом или смесью хлороформа с дихлорэтаном (1:1 по объему). Пряжу сушат на воздухе в вытяжном шкафу. Затем 200 г капронового волокна растворяют в 400 см³ HCl ($\rho=1,19$) в течение 15 мин при комнатной температуре (18-20°C). Для осаждения полиамида приливают 2,4 дм³ 50%-ного этанола. Суспензию при энергичном помешивании разбавляют водой (0,8 см³) и фильтруют на воронке Бюхнера. Осадок промывают три раза водой (по 3 дм³ каждый раз), а затем три раза раствором щелочи (30 г на 1 дм³). Далее отмывают осадок от щелочи до нейтральной реакции (по фенолфталеину). Осадок переносят на листы фильтровальной бумаги и сушат при комнатной температуре. Сухой капроновый порошок просеивают через сито с диаметром отверстий 0,2-0,3 мм (80-50 меш) и хранят в закрытых банках.

Второй способ. Капроновое волокно или пряжу предварительно отмывают и обезжиривают, как указано в первом способе. После высушивания растворяют в 80%-ной уксусной кислоте при нагревании: 200 г пряжи опускают в 1 дм³ кипящей кислоты и сразу прекращают нагрев. Для осаждения капрона медленно приливают 1,5-2,0 дм³ воды, постоянно помешивая. При этом образуется густая масса, которую переносят на воронку Бюхнера и отмывают от кислоты до нейтральной реакции (по метиловому красному). Затем для обезвоживания порошок заливают два-три раза 96%-ным спиртом и сушат при комнатной температуре. Сухой порошок просеивают через сито 0,2-0,3 мм (80-50 меш).