

Державний вищий навчальний заклад  
“Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника”  
Факультет природничих наук  
**Кафедра хімії**

Затверджено  
на засіданні кафедри хімії  
(протокол № 1 від “25” 08.20020 р.)

Методичні вказівки та інструкції до виконання  
лабораторних робіт  
з курсу «**Біонеорганічна хімія**»

для студентів спеціальності 102 Хімія

Підготувала доцент кафедри хімії, к.т.н. **Хацевич О. М.**

Івано-Франківськ,

2020

## Лабораторна робота № 1

**Тема:** Експериментальне вивчення хімічних властивостей комплексних сполук (КС).

1. **Мета:** Одержання КС з катіонним та аніонним комплексом. Вивчення електролітичної дисоціації комплексних сполук.
2. **Матеріали, реактиви, обладнання:** штатив з пробірками, купруму сульфат, 25 % розчин аміаку, розчин нітрату меркурію (II), калій йодиду (розчин), розчин NaOH, гексаціаноферрату (III) калію і гексаціано-II-ферату калію (розчин), розчин солі Мора  $(\text{NH}_4)_2[\text{Fe}(\text{SO}_4)_2]$ , сульфід амонію, хлорид барію, 2 н розчин HCl (20 мл), бензол (10 мл), сульфатна кислота (конц.) – 10 мл, хлорид кальцію, калію перманганат, сіль кобальту (II), аліловий спирт, розчин вісмут (III) нітрату та KSCN (конц.).

### 3. Хід роботи

#### 3.1 Одержання КС з катіонним комплексом

Одержати осад купрум гідроксиду, наливши в пробірку 2-3 мл розчину купрум сульфату і такий же об'єм розчину натрій гідроксиду. До осаду додати 1-2 мл 25 % розчину амоніаку. Що відбувається? Порівняйте забарвлення йонів  $\text{Cu}^{2+}$  у розчині сульфату купруму і забарвлення одержаного розчину. Присутністю яких йонів зумовлене забарвлення розчину? Напишіть рівняння реакцій.

#### 3.2 Одержання КС з аніонним комплексом

У дві пробірки внести по 2-3 мл розчину нітрату меркурію (II). В одну додати розчин йодиду калію до повного розчинення оранжевого осаду йодиду меркурію (II), а другу залишити для контролю. Дослідити наявність йонів  $\text{Hg}^{2+}$  в обох пробірках, додаючи в кожен з них по краплі розчину натрій гідроксиду. З якого розчину випав жовтий осад оксиду меркурію (II)? Чому в другій пробірці не випадає осад під дією луку? Написати рівняння реакцій, що характеризують хімізм описаних дослідів.

У пробірку внесіть 3–4 краплі 0,5Н розчину вісмуту (III) нітрату, додайте краплями 0,5Н розчин калій йодиду до утворення темно-бурого осаду вісмут (III) йодиду. До одержаного осаду краплями додайте 0,5 Н розчин йодиду калію до його повного розчинення. Відмітьте забарвлення одержаного розчину. Напишіть відповідні молекулярні та скорочені йонні рівняння реакцій.

#### 3.3 Комплексні сполуки в реакціях обміну

В пробірку наливають 2-3 мл розчину сульфату купруму, додають такий же об'єм розчину комплексної солі гексаціано-II-ферату калію. Якого

кольору утворився осад гексаціано-ІІ-ферату купруму. Написати молекулярне та йонне рівняння.

До 2–3 крапель 1Н розчину хлориду заліза (ІІІ) додайте стільки ж 1Н розчину гексаціаноферрату (ІІ) калію  $K_4[Fe(CN)_6]$ . Відмітьте, що відбувається. Напишіть рівняння реакцій.

До 2–3 крапель 1Н розчину сульфату заліза (ІІ) додайте такий же об'єм 1Н розчину гексаціаноферрату (ІІІ) калію  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Відмітьте, що відбувається. Напишіть рівняння реакцій.

### **3.4 Електролітична дисоціація подвійної та комплексної солі**

3.4.1 Налити в три пробірки по 2-3 мл розчину солі Мора  $(NH_4)_2[Fe(SO_4)_2]$ . У першу пробірку прилити розчин гідроксиду натрію до лужної реакції і легко нагріти. Дослідити лакмусовим папірцем і на запах газ, що виділився. В другу пробірку додати 2-3 мл розчину сульфід амонію, а в третю – стільки ж розчину хлориду барію. Відзначити колір осадів, що утворилися. На присутність яких йонів у розчині подвійної солі вказують ці реакції? Написати реакції в молекулярному та йонному вигляді.

3.4.2 Перевірити дією розчину сульфід амонію, чи виявляються йони  $Fe^{2+}$  у розчині гексаціано-ІІ-ферату калію. Чи випав осад сульфід феруму чорного кольору? Чому? Написати відповідні рівняння реакції. Чим відрізняються подвійні солі від комплексних?

### **3.5 Комплексні сполуки в окисно-відновних реакціях**

#### **3.5.1. Відновлення гексаціано-ІІІ-ферату калію**

У пробірку внести 2-3 мл 0,1 н розчину йодиду калію, 3 мл 2 н розчину хлоридної кислоти і 2 мл бензолу. Відзначити, що шар бензолу залишився безбарвним. Додати 2 мл розчину комплексної солі і перемішати розчин. За забарвленням бензольного розчину переконатися в тому, що виділився вільний йод. Написати рівняння реакції взаємодії гексаціано-ІІІ-ферату калію з йодидом калію. Вказати окисник і відновник.

#### **3.5.2. Окиснення гексаціано-ІІ-ферату калію**

У пробірку помістити 2-3 мл розчину калій перманганату, підкислити сульфатною кислотою (2 мл) і додати краплями розчин гексаціано-ІІ-ферату калію до знебарвлення розчину. Написати рівняння реакції.

#### **3.5.6. Одержання хелату кальцію**

У дві пробірки налити по 1 мл розведеного розчину хлориду кальцію. В одну пробірку прилити 1 мл трилону Б, в другу – 1 мл дистильованої води. В обидві пробірки додати по 1 мл оксалату амонію. Що спостерігається в результаті реакції, в якій із пробірок утворився осад?

### **3.6. Гідратна ізомерія аквакомплексів**

Декілька темно-зелених кристалів гексагідрату хлориду хрому (ІІІ)  $CrCl_3 \cdot 6H_2O$  розчиніть у 6–7 краплях води. Відмітьте забарвлення розчину. Нагрійте розчин до зміни його забарвлення. Визначте будову комплексу до та після нагрівання. Висновки зробіть з урахуванням кольору гідратних ізомерів:

$[\text{Cr}(\text{OH}_2)_6]\text{Cl}_3$  — синьо-фіолетовий,  
 $[\text{Cr}(\text{OH}_2)_5\text{Cl}]\text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  — темно-зелений,  
 $[\text{Cr}(\text{OH}_2)_4\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  — світло-зелений.

### 3.7. Вплив концентрації розчину на комплексоутворення.

До 4–5 крапель 0,5 N розчину солі кобальту (II) додайте 2–3 краплі алілового спирту, потім 3–4 краплі концентрованого розчину роданіду калію KSCN. Суміш перемішайте скляною паличкою. Зверніть увагу на забарвлений шар розчину. Додайте 10–12 крапель води та перемішайте. Спостерігайте зміну забарвлення розчину внаслідок утворення аквакомплексу.

До 3-4 крапель 0,5 N розчину солі кобальту (II) додайте краплями розчин аміаку з масовою часткою 25 % до випадіння рожевого осаду гідроксиду кобальту (II) та його наступного розчинення внаслідок утворення комплексної сполуки з координаційним числом кобальту (II) - 6. Відмітьте забарвлення розчину. Напишіть рівняння реакцій.

## 4. Контрольні запитання і завдання

1. Що таке внутрішньокмлексні сполуки, хелати?
2. Що таке комплексони? Навести приклади.
3. Навести хімізм реакції комплексонометричного визначення йонів металів.
4. Який механізм дії індикатора в комплексонометрії?
5. До якого типу КС відноситься і якими властивостями характеризується комплекс Fe (II) з порфірином?
6. Які комплексні сполуки використовуються у медичній практиці?

### Задачі для самостійного розв'язування:

1. На титрування 100 мл води в присутності хромогену чорного витрачено 8,2 мл 0,05 N розчину трилону Б. Обчислити загальну твердість води.

Відповідь: 4,1 мг-екв/л.

2. Яку масу трилону Б необхідно взяти для приготування 0,5 дм<sup>3</sup> 0,05 N розчину?

Відповідь: 0,4653 г.

3. Визначити вміст Феруму в гемоглобіні, якщо відомо що його молекула має 4 атоми Феруму, а молярна маса гемоглобіну близько 65 000.

4. Визначити масу  $\text{K}_3[\text{Co}(\text{SCN})_6]$ , що отримають при взаємодії 25 г KSCN з  $\text{CoCl}_3$ . Вирахувати масову частку (%) виходу продукту реакції, якщо його маса становить 20,80 г.

5. Вирахувати об'єм 10 %-го розчину амоніаку  $\rho = 0,957 \text{ г/см}^3$ , потрібний для утворення комплексної солі  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]\text{SO}_4$  при взаємодії з 50,0 г  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Вирахувати % виходу цієї солі, якщо її маса становить 42,0 г.

## Лабораторна робота № 2

**Тема:** Якісні реакції на біоліганди. Спрощений метод визначення нітратів у рослинах.

- 1. Мета роботи.** Використовуючи напівкількісний швидкий метод, провести порівняльне визначення вмісту нітратів у соках різних рослин.
- 2. Матеріали, реактиви, обладнання.** Картопля, капуста, буряк столовий, морква тощо; 1 %-й розчин дифеніламіну в концентрованій сульфатній кислоті, контрольний розчин нітратів (1,631 г хімічно чистого сухого  $KNO_3$  розчиняють у воді та доводять до 1 л); ручний прес для вичавлювання соку з рослин, чашки Петрі, піпетки, скальпелі.

Одним із методів визначення нітратів є використання реакції нітрат-йону з дифеніламіном, під час якої з'являється синє забарвлення. За інтенсивністю отриманого забарвлення розчину роблять висновок щодо кількості нітратів у об'єкті дослідження.

### 3. Хід роботи

З контрольного розчину нітратів приготувати стандартні розчини концентрацією: 1000, 500, 250, 125, 10 мг/л. Чашку Петрі поставити на білий папір, на дно чашки нанести по краплині стандартних розчинів різної концентрації, а також краплину соку досліджуваної рослини, вичавлюючи її ручним пресом.

*Примітка.* Замість краплини соку можна використати гомогенну масу, отриману з рослинної проби в об'ємі краплини.

До стандартних розчинів і клітинного соку додати по одній краплині дифеніламінового реактиву.

*Примітка.* Поява синього забарвлення свідчить про наявність нітратів. Впродовж 1-2 хв. забарвлення змінюється, тому оцінювати його треба відразу, порівнюючи зі стандартними розчинами. Під час виконання цієї роботи доцільно вивчати такі питання: як впливає освітлення на вміст нітратів у різних частинах рослин; в яких частинах рослини перетворюються нітрати; як відновлюються нітрати в злакових і бобових рослинах.

Результати дослідів оцінити за шкалою стандартних розчинів нітратів і записати у таблицю "Визначення вмісту нітратів".

## Лабораторна робота № 3

**Тема:** Антагоністичний вплив йонів  $K^+$  та  $Ca^{2+}$   
на цитоплазму рослинної клітини

- 1. Мета роботи.** Виявити антагонізм йонів калію та кальцію на цитоплазму рослинної клітини.
- 2. Матеріали, реактиви, обладнання.** Синя цибуля; 1 М розчин  $KNO_3$ , 1 М розчин  $Ca(NO_3)_2$ ; мікроскопи, предметне скло, покривні скельця, скальпелі, леза бритв, препарувальні голки, скляні палички, невеликі скляні бюкси з притертими кришками.

### 3. Теоретична частина

Питання про причини антагоністичного впливу йонів на рослинний організм – одне із найважливіших у теорії кореневого живлення – на сьогодні залишається остаточно не дослідженим. Встановлено, що *йони-антагоністи* не лише протилежно впливають на фізико-хімічні властивості протоплазми та на певні ланки обміну речовин, а й конкурують за участь в органічному комплексі та ферментативному каталізі. Класичними прикладами антагонізму є конкуренція між йонами калію та кальцію, натрію та калію, амонію та калію, а також між різними двовалентними катіонами. Прояви антагонізму різноманітні, а приклади його численні: рослини, які вирощують на середовищі із високим вмістом калію, фосфору й заліза, потерпають від недостатньої кількості фосфору. У рослин, які отримали помірні дози феруму і калію, за високого вмісту фосфору розвивається апікальний хлороз і ознаки нестачі калію в старих листках; молібден гальмує надходження феруму й уповільнює його рух у верхній частині рослин. Таким чином, формування високих врожаїв із високою якістю продукції залежить не лише від кількості поживних речовин, а й від співвідношення елементів мінерального живлення.

### 4. Хід роботи

**4.1.** У три бюкси з притертими кришками налити по 5 мл 1 М (моль/дм<sup>3</sup>) розчину  $KNO_3$ , 1 М (моль/дм<sup>3</sup>) розчину  $Ca(NO_3)_2$  та суміш розчинів, що складається з 9 частин першого і 1 частини другого( = ). У розчини занурити шматочки епідерми луски цибулі, клітини якої забарвлені пігментами у фіолетовий колір. За 30 хв. зрізи вийняти і розглянути під мікроскопом.

*Примітка.* У клітинах епідерми зрізів, які були в розчині нітрату калію, спостерігатиметься ковпачковий плазмоліз. Це – результат впливу на цитоплазму йонів калію. В клітинах епідерми, що зазнали впливу йонів кальцію, ковпачкового плазмолізу не буде. В клітинах епідерми, які

*перебували в третьому розчині, ковпачкового плазмолізу також не спостерігається. Отже, за сумісної дії, йони кальцію мають антагоністичний вплив на йони калію. Незначна кількість йонів кальцію у розчині з йонами калію повністю нівелює вплив останнього на цитоплазму.*

Дослід можна ускладнити, якщо приготувати кілька розчинів нітрату калію з нітратом кальцію. Їх змішують у співвідношенні: 90:10; 91:9; 92:8; 93:7; 94:6; 95:5; 96:4; 97:3; 98:2 і 99:1. Залежно від фізіологічного стану клітин антагоністичний вплив кальцію на йони калію припиняється, коли концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  буде в межах від 1/35 до 1/60 загальної концентрації солей.

Результати спостережень записати у таблицю. Зробити висновки щодо отриманих результатів.

### **5. Контрольні запитання та завдання**

1. Які фізіологічні механізми формування антагонізму йонів у рослинах?
2. Наведіть приклади антагоністичного впливу йонів на рослини?
3. Яке значення має антагоністичний вплив йонів для рослин?
4. На чому ґрунтується виявлення антагоністичної дії йонів калію та кальцію на цитоплазму рослинної клітини?
5. Чи впливає рН середовища на формування антагонізму йонів?

## Лабораторна робота № 4

**Тема:** Визначення в попелі макро- і мікроелементів.

- 1. Мета роботи.** Визначити хімічний склад попелу деревини кількох видів рослин: яблуні, сосни, берези; оцінити значення попелу, як мінерального добрива.
- 2. Матеріали, реактиви, обладнання.** Попіл деревини досліджуваних рослин; вода дистильована,  $\text{HNO}_3$  (конц.),  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (конц.), 1 н. розчин  $\text{NaOH}$ , 5 %-і розчини  $\text{HCl}$ ,  $\text{NH}_4\text{CNS}$ , натрій гексанітрокобальтату, оксалатної кислоти, 10 %-і розчини  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{HNO}_3$ , етиловий спирт, кристалічний  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , плюмбуму пероксид, амонію персульфат; порцелянові тиглі, електрична плитка, фільтри, пробірки, лакмусовий папір, піпетки, чашки Петрі.

### 3. Теоретична частина

Поживні елементи, які поглинаються рослинами з ґрунту в різних концентраціях, мають певне біохімічне і фізіологічне значення і відповідають за синтез певних речовин у рослинному організмі.

*Нітроген* - входить до складу амінокислот, білків, нуклеїнових кислот, гормонів росту, багатьох вітамінів, хлорофілу та інших життєво важливих органічних сполук.

*Фосфор* – компонент фосфопротеїнів, нуклеїнових кислот (НК), фосфоліпідів, фосфорних ефірів цукрів, нуклеотидів. Особливе значення фосфору в енергетиці клітини, оскільки він входить до складу основних енергетичних депо АТФ і НАДФ. Фосфор посилює накопичення цукрів у фруктах і овочах, крохмалю в бульбах картоплі.

*Калій* - складає основну частину катіонів клітинного соку і є основним йоном нейтралізації від'ємно заряджених аніонів. Цей елемент сприяє підтримці стану гідратації колоїдів цитоплазми, регулює її водоутримуючу здатність і забезпечує надходження води в рослину, допомагає рослинам легше переносити посуху і заморозки. Калій потрібен для поглинання і транспортування води по рослині, один із катіонів-активаторів ферментних систем. Під впливом калію посилюється накопичення крохмалю в бульбах картоплі, сахарози в цукровому буряку, моносахаридів у плодах і овочах, підвищується стійкість рослин до грибкових і бактеріальних захворювань.

*Кальцій* - стабілізує функції усіх клітинних структур. Йони кальцію виконують сигнальну функцію і є універсальними регуляторами життєдіяльності клітини. Кальцій регулює активність ферментів, бере участь у структурній організації хромосом, є зв'язуючою ланкою між ДНК і білком, виконує різноманітні функції в обміні речовин організму.



*Магній* - входить до складу хлорофілу, підтримує структуру рибосом, сприяє обміну речовин, підвищує активність ферментів, необхідний для процесів дихання, фотосинтезу, синтезу НК і білків. Магній підсилює синтез ефірних олій, каучуку, вітамінів А і С.

*Сульфур* - входить до складу амінокислот – цистину, цистеїну, метіоніну; вітамінів – ліпоєвої кислоти, біотину, тіаміну; деяких антибіотиків, зокрема пеніциліну та багатьох ферментів. Одна з основних функцій сульфуру – участь SH-групи в утворенні ковалентних, водневих, меркаптидних зв'язків. Інша важлива функція сульфуру – підтримка певного рівня окисно-відновного потенціалу.

*Ферум* - міститься в окисно-відновних ферментах (цитохроми, цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза) і має важливе значення у диханні рослин, фотосинтезі, синтезі хлорофілу тощо.

В аналітичній хімії існує низка методів, за допомогою яких можна якісно й кількісно визначити наявність у золі певних елементів. Ця інформація необхідна для встановлення потреби рослин в елементах живлення.

#### 4. Хід роботи.

**4.1.** У порцеляновий тигель помістити 1 г попелу, додати 1 мл концентрованої  $\text{HNO}_3$ , перемішати скляною паличкою і додати 10-20 мл дистильованої води.

Тигель з кислотною витяжкою попелу поставити на електричну плитку, розчин довести до кипіння, відфільтрувати. Одну частину фільтрату розлити у три пробірки по 2 мл для визначення калію, фосфору, сульфуру.

- *Визначення калію.* До 2 мл фільтрату додати 0,5 мл кобальт нітриту натрію і 2 мл етилового спирту. Витримати 15-30 хв. За наявності йонів калію випадає жовтий осад.

- *Визначення фосфору.* До 2 мл фільтрату внести кристали нітрату амонію  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , довести до кипіння, додати 1 мл 10 %-го водного розчину  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ . За наявності йонів фосфору випадає золотаво-жовтий осад.

- *Визначення сульфуру.* До 2 мл фільтрату додати 1 мл 10 %-го розчину  $\text{BaCl}_2$ . За наявності  $\text{SO}_4^{2-}$  утворюється біла каламуть.

**4.2.** Другу частину фільтрату довести розчином  $\text{NaOH}$  до слаболужної реакції за лакмусом і відфільтрувати драглистий осад, в якому міститься  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ,  $\text{Mn}(\text{OH})_2$ .

*Увага! Осад зберігають для визначення феруму та марганцю (див. п. 4.б.).*

**4.5.** Лужний розчин після фільтрування нейтралізувати  $\text{HCl}$  і підкислити кількома краплями ацетатної кислоти для визначення кальцію.

- *Визначення кальцію.* До 2 мл фільтрату додати 1 мл 5 %-го розчину оксалатної кислоти. За наявності йонів кальцію з'являється біла каламуть.

**4.6.** Драглистий осад на фільтрі облити 10 мл нітратної кислоти, відфільтрувати, фільтрат розлити у дві пробірки по 2 мл для визначення феруму і марганцю.

*Примітка.* Використовують фільтрат, що залишився після відокремлення драглистого осаду, нейтралізований та підкислений ацетатною кислотою (п.4.4).

- *Визначення феруму.* До фільтрату в пробірку додати 2-3 краплини 5 %-го  $\text{NH}_4\text{CNS}$ . За наявності йону феруму з'являється червоне забарвлення.
- *Визначення марганцю.* До 2 мл фільтрату додати 0,5 мл концентрованої нітратної кислоти і 0,5 мл плюмбум пероксиду (або 0,1 г амоній персульфату), нагріти 5 хв. на киплячій водяній бані. Якщо є марганець, розчин забарвлюється у фіолетовий колір.

Результати дослідів записати у таблицю "Хімічний склад попелу".

### **Контрольні запитання та завдання**

1. Що таке вибіркова поглинальна здатність?
2. Чому концентрація поживних елементів у рослин і в ґрунті суттєво відрізняється?
3. Наведіть приклади життєво необхідних елементів живлення рослин.
4. Яке фізіологічне значення життєво необхідних елементів у метаболізмі рослин?
5. Яка роль Нітрогену у живих організмах?
6. Яка роль та значення Калію для нормального функціонування живих систем?

## Лабораторна робота № 5

**Тема:** Вивчення реакцій виявлення іонів біоелементів.  
Мікрохімічний аналіз золи.

- 1. Мета роботи.** Ознайомитися з мікрохімічними (крапельними) методами аналізу елементів і визначити елементний склад листків рослин.
- 2. Матеріали, реактиви, обладнання.** Попіл листків різних видів рослин; дистильована вода, амоніак, 10 %-й розчин хлоридної кислоти, 1 %-ві розчини: сульфату талію, хлориду платини, сульфатної кислоти, фосфату натрію, молібдату амонію в нітратній кислоті, нітрату стронцію, жовтої кров'яної солі, тартрату натрію, оксалатної кислоти, гідрату нітрату меркурію (I), плюмбум ацетату, аргентум нітрату, комплексна натрієва мідно-свинцева нітритна сіль  $\text{Na}_2[\text{CuPb}(\text{NO}_2)_6]$  для аналізу на калій; пробірки (по чотири на студента), скляні палички, штативи для пробірок, предметне скло, маленькі лійки, мікроскопи, фільтрувальний папір, порцелянові пластинки.

### *Приготування реактиву:*

• *сіль*  $\text{Na}_2[\text{CuPb}(\text{NO}_2)_6]$ : 2 г  $\text{NaNO}_3$  (що не містить калію), 0,9 г  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  розчиняють у 15 мл дистильованої води, підкисленої 0,2 мл 30 %-ї ацетатної кислоти. Отриманий розчин зберігають у склянці з притертою кришкою.

### 3. Теоретична частина

Серед усіх поживних елементів у рослин 24 хімічні елементи є життєво необхідними, 21 елемент вважають умовно необхідними. *Життєво необхідні* – це елементи, без яких рослина не може повністю закінчити цикл свого розвитку і які не можуть бути замінені іншими елементами. Фізіологічне значення умовно необхідних елементів остаточно не досліджено. Елементи, необхідні рослинам, відносяться до різних груп періодичної системи елементів. Наразі слід зазначити, що за високих концентрацій більшість елементів токсичні для рослин.

Для встановлення хімічного складу попелу застосовують мікрохімічний метод – якісні реакції, в результаті яких утворюються характерні для певних речовин кристали або забарвлення розчину. Цей метод не потребує значної кількості матеріалу. Аналіз дає змогу виявляти як макротак і мікроелементи.

#### 4. Хід роботи

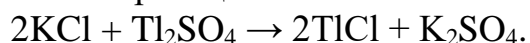
Мінеральні речовини, що входять до складу попелу, розчинні у воді або кислоті. Тому для мікрохімічного аналізу готують два розчини попелу: у воді і в 10 %-й соляній кислоті.

**4.1.** Приготування водної і кислотної витяжки попелу – у дві пробірки внести по 1 см<sup>3</sup> попелу та додати: в першу - 5 мл води, а в другу – 5 мл 10 %-ї НСl, розчини ретельно перемішати скляною паличкою (для кожної пробірки окремо). За 2-3 хв. відфільтрувати крізь паперовий фільтр у чисті сухі пробірки.

**4.2.** На предметне скло, на відстані 1 см, нанести краплину витяжки попелу (водної або кислотної, відповідно до елемента, який визначається) і краплину відповідного реактиву.

4.2.1. *Виявлення хлору.* Використовують водну витяжку попелу.

- Реактивом на хлориди є сірчаноокислий талій (Tl<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Між хлоридами і сульфатом талію відбувається реакція:



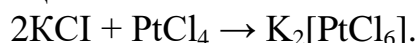
У результаті реакції хлорид талію випадає у вигляді кристалів хресто- або мечеподібної форми (рис. 1). Внаслідок значного заломлення променів ці кристали мають чорний колір. Сульфат талію можна замінити нітратом талію.

- Як реактив на хлориди використовують також розчин аргентум нітрату AgNO<sub>3</sub>. Хлориди з AgNO<sub>3</sub> утворюють білий осад (реакція відбувається у пробірці).

4.2.2. *Виявлення калію.* Для реакції використовують як водну, так і кислотну витяжку попелу залежно від реактивів.

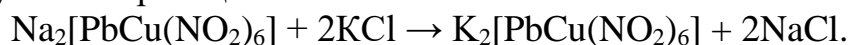
- Реактив натрій тартрату однозаміщеного NaHC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> з нейтральним розчином солей калію утворює кристали калій тартрату однозаміщеного KHC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> у вигляді великих призм і пластинок. Для реакції використовують водний розчин, який обов'язково доводять до нейтрального рН, оскільки кристали тартрату калію однозаміщеного добре розчиняються в кислотах і лугах.

- Реактив – хлорид платини PtCl<sub>4</sub>. Використовують водний або кислотний розчини. Відбувається реакція:



У результаті реакції утворюються жовто-зелені октаедричні кристали гексахлорплатинату калію, інколи у вигляді тетраедричних кубів (рис. 1).

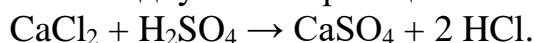
- Реактив комплексної солі Na<sub>2</sub>[CuPb(NO<sub>2</sub>)<sub>6</sub>]. Використовують водну витяжку попел. Відбувається реакція:



Через деякий час утворюються свинцево-чорні і темно-коричневі кристали свинцево-мідного нітрату калію (рис.1)

3.2.3. *Виявлення кальцію.* Для реакцій на Кальцій і наступні елементи використовують кислотну витяжку попелу.

- Реактив – сірчана кислота. Відбувається реакція:

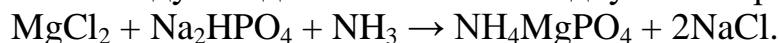


У результаті реакції утворюються характерні довгі тонкі голки гідратованого кальцій сульфату  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (гіпс), потім голки об'єднуються в структури, що нагадують сніжинки, які накопичуються одна на одну (рис. 1). Голки можуть переходити в тонкі призми та маси пластинок, що накопичуються одна на іншу.

- Реактив – оксалатна кислота. У результаті реакції випадають кристали оксалату кальцію ( $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) у вигляді октаєдрів, кубів, інколи хрестів.

3.2.4. *Виявлення магнію.*

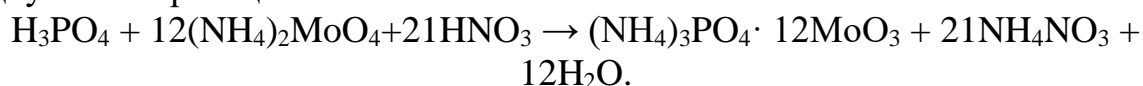
- Реактив – фосфат натрію  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Спочатку в краплину досліджуваної рідини додають краплину амоніаку для нейтралізації середовища, вже потім з'єднують із реактивом дугоподібним каналом. Відбувається реакція:



У результаті реакції утворюються кристали фосфорно-аміачно-магнезіальної солі у вигляді кришечок, сніжинок, крил, квадратів, прямокутників, зірок (рис. 1).

3.2.5. *Виявлення фосфору.*

- Реактив – 1 %-й розчин молібдату амонію в 15 %-й нітратній кислоті. Відбувається реакція:



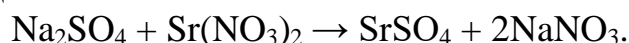
У результаті реакції випадає жовто-зелений осад дрібних кристалів амонію фосфоромолібдату. З часом осад набуває інтенсивнішого забарвлення (рис. 1).

- Реактив – меркурій (I) нітрат  $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$ . У результаті реакції утворюється осад фосфату меркурію у вигляді пучків, голок, кристалічних розеток.

3.2.6. *Виявлення сульфору.*

- Реактив – стронцій нітрат  $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ .

Відбувається реакція:



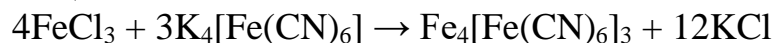
У результаті реакції випадає дрібнокристалічний осад сульфату стронцію. Кристалики мають заокруглену форму.

- Реактив – аргентум нітрат  $\text{AgNO}_3$ . У результаті реакції утворюються кристали аргентум сульфату  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ , які мають форму витягнутих шестикутників і ромбів. Охолодження може прискорити формування кристалів.

- Реактив – плюмбум ацетат  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ . У результаті реакції утворюються дуже дрібні кристали плюмбум сульфату у вигляді довгих голок, зірок, ромбів (рис. 1).

### 3.2.7. Виявлення феруму.

• Реактив – жовта кров'яна сіль  $K_4[Fe(CN)_6]$ . Реакція відбувається у пробірці або на порцеляновій пластинці. До кількох краплин досліджуваної рідини поступово додати кілька краплин 1 %-го розчину жовтої кров'яної солі. Відбувається реакція:



Наявність феруму визначають за утворенням берлінської блакиті яскраво-синього забарвлення.

*Примітка.* Препарат можна злегка підсушити над полум'ям, в результаті кристалізації утворюються великі, правильно сформовані кристали. Необхідно також уникати повного перемішування краплин, тому що відбудеться швидка кристалізація – випадуть дуже дрібні кристали, які майже непомітні в полі зору мікроскопа. Скляні палички і мікропіпетки після нанесення реактиву слід вимити і витерти фільтрувальним папером, щоб його залишки не заважали наступній реакції.

Результати мікрохімічного аналізу записати у таблицю.



**Рис.1.** Кристали (під мікроскопом):

- 1 – хлориду талію;
- 2 – свинцево-мідного калій нітрату;
- 3 – кальцій сульфату (гіпсу);
- 4 – фосфорно-аміачно-магнезіальної солі;
- 5 – фосфор-молібдату амонію.

## 5. Контрольні запитання і завдання

1. Як класифікують поживні елементи за їхнім вмістом у рослинах?
2. Які поживні елементи є життєво та умовно необхідними для рослин?
3. За якими критеріями хімічний елемент можна вважати життєво необхідним?
4. Для чого готують водну і кислотну витяжку попелу?
5. Чому для одержання елементів, що є в попелі використовують  $HCl$ , а не інші кислоти?
6. Як виявити калій, кальцій, магній та інші елементи в попелі?
7. Для чого проводять аналіз попелу рослин?

## Лабораторна робота № 6

**Тема:** Хімічний аналіз соку рослин (за методом К. П. Магницького).

**1. Мета:** ознайомитися з діагностичним методом К.П. Магницького. За отриманими результатами дати рекомендації щодо підживлення рослин певними мінеральними елементами.

**2. Матеріали, реактиви, обладнання.** Проби рослинного матеріалу, взяті з поля, або рослини, вирощені в лабораторії методом водних культур на живильних розчинах; польова лабораторія К. П. Магницького.

### ***Приготування реактивів польової лабораторії К. П. Магницького:***

- *Змішаний концентрований стандартний розчин, який містить нітроген, фосфор, калій, магній, хлор.* Для приготування розчину беруть 7,22 г нітрату калію, 0,18 г гідроортофосфату калію, 6,05 г хлориду калію, 1,01 г сульфату магнію і розчиняють у 1 л дистильованої води. З цього розчину готують три стандартних розчини менших концентрацій: в мірні колби місткістю 100 см<sup>3</sup> наливають 10, 25 і 50 см<sup>3</sup> концентрованого розчину. Об'єм доводять водою до позначки і додають 4-5 краплин толуолу чи хлороформу. Можна приготувати стандартний розчин. Для цього раніше зазначені наважки розчиняють у 100 мл води.
- *Сухий реактив на нітратний азот.* Беруть 100 г сульфату барію, 10 г сульфату мангану, 2 г цинкового пилю, 75 г лимонної кислоти, 4 г сульфанілової кислоти, 2 г альфанафтил-аміну. Компоненти, до того як змішати у певній послідовності, розтирають у ступці кожен окремо. Усі вказані реактиви змішують окремо з невеликою кількістю сульфату барію (крім лимонної кислоти). Потім усі реактиви з лимонною кислотою включно ретельно змішують. Правильно приготовлений реактив має світло-сіре забарвлення. Поява рожевого чи червоного забарвлення вказує на те, що один із реактивів має домішки солей нітратної кислоти і не може використовуватися для аналізів. Реактив зберігають у пофарбованій в чорний колір склянці, щільно закритій корковою пробкою.
- *Буферний розчин.* До 10 мл ацетатної кислоти і 3 г ацетату натрію поволі додають воду, ретельно перемішують і доводять водою до 100 мл.
- *Реактив на фосфор.* 1 г молібдату амонію розчиняють у 20 мл дистильованої води за нагрівання, фільтрують гарячим. Коли розчин охолоне, додають, помішуючи, 20 мл концентрованої хлоридної кислоти і доводять об'єм водою до 200 мл.
- *Реактив на калій.* 3 г дипікриламіанату магнію і 1,3 г оксиду магнію розчиняють у 100 мл дистильованої води, витримують 15-20 год. і фільтрують.
- *Розбавлена хлоридна кислота.* Концентровану хлоридну кислоту розбавляють водою у співвідношенні 1 : 5.

- *Реактив на магній.* 10 мг титанового жовтого розчиняють у 5 мл води і 15 мл етилового спирту.
- *1 %-й розчин крохмалю.* В 100 мг крохмалю додають кілька краплин води і розмішують до стану пасти, поволі додають 10 мл окропу.
- *10 %-й розчин NaOH.*
- *Реактив на хлор.* 4,8 г аргентум нітрату розчиняють у 1 л дистильованої води. 1 мл цього розчину осаджує 1 мг хлору. Розчин зберігають у склянці з темного скла.
- *Індикаторний папір на хлор.* Фільтрувальний папір насичують 10 % розчином хромовоокислого калію, висушують, нарізають квадратами розміром 0,5x0,5 см.

### 3. Теоретична частина

Визначення вмісту елементів живлення рослин за *методом К. П. Магницького* ґрунтується на їхній властивості утворювати з певними сполуками кольорові розчини або осади. Інтенсивність забарвлення порівнюють з паперовою еталонною кольоровою шкалою або зі шкалою стандартних розчинів, які одночасно з соком рослин обробляють однаковими реактивами. Існує певний взаємозв'язок між вмістом у тканинах окремих елементів. За умови значної нестачі Нітрогену в соку міститься багато мінерального Фосфору (гальмуються процеси переходу його в органічні форми). За нестачі Калію й Мангану спостерігається підвищений вміст мінеральних сполук Нітрогену та Фосфору. Аналіз клітинного соку у польових умовах дає змогу контролювати динаміку живлення рослин та визначати їх потреби у певних мінеральних елементах.

Аналізуючи отримані результати, слід враховувати особливості видів і сортів рослин, взятих для аналізу. Наприклад, у листках зернових значно більше Фосфору, а нітратів - менше порівняно з черешками листків картоплі. Під час діагностичних визначень особливу увагу звертають на відбір проб для аналізу. Рослин, що мають типовий вигляд для певної території, відбирають із трьох – п'яти ділянок. Дослідні ділянки розміром 50 - 100 м<sup>2</sup> мають бути однорідними за рельєфом, агротехнікою й удобренням. За час вегетації з кожної ділянки беруть по одній пробі. Склад і об'єм проби може варіювати залежно від культури.

У картоплі, помідорів, буряка, кукурудзи, соняшника, тютюну, капусти проби беруть не менше ніж із шести рослин – по одній листковій пластинці однакового фізіологічного віку. У картоплі, помідорів, тютюну беруть листки, що закінчили ріст: до початку процесу бутонізації – 2-3-й листок, під час цвітіння та пізніше – 3-4-й листок нижнього ярусу. У буряка, турнепсу, капусти у молодому віці пробу беруть із зовнішніх листків розетки. Пізніше, коли листки зовнішнього ярусу відмирають, відбирають листки, що стоять напіввертикально і вже закінчили ріст. У плодово-ягідних культур проби беруть під час інтенсивного росту пагонів. У зернових культур у початкових фазах розвитку для аналізу беруть всю рослину. Проби беруть о 8 - 11 годині



ранку. Якщо аналіз проводять не на полі, рослини вміщують у целофанові пакети з відповідними етикетками.

## 4. Хід роботи.

### 4.1. Приготування витяжки.

Для приготування витяжки необхідно подрібнити 2 г рослинного матеріалу, додати 0,5 г активованого вугілля, 6 см<sup>3</sup> води, розтерти у ступці.

*Примітка.* Сік для аналізу краще вичавлювати з черешків листків. Якщо черешок довгий, використовують його нижню частину. Сік збирають у пробірки або у заглиблення в пластинках. Якщо черешки малі, а з листків вичавити сік важко, готують водну витяжку, в яку додають активоване вугілля. Вугілля, поглинаючи пігменти, освітлює витяжку. Цей спосіб використовують для аналізу зернових, овочевих і плодово-ягідних культур, кормових трав.

Розтерту масу загортають у шматок щільної тканини і пресом вичавлюють витяжку у пробірку.

*Примітка.* Якщо потрібно, використовують паперовий фільтр. Враховують, що витяжка, порівняно з соком, буде розведена у чотири рази. Щоб визначити Фосфор і Магній, сік розвести водою у співвідношенні 1:3 (у разі використання витяжки розведення не потрібно).

4.1.1 Визначення у витяжці Хлору: реактив на хлор розвести водою в чотири рази.

4.1.2. Визначення Калію та Нітрогену: чотири краплини витяжки перенести у заглиблення пластинки, випарити на сонці чи водяній бані до сухого залишку, додати краплину води і провести аналіз згідно з інструкцією.

4.1.3 Результати аналізу записати у міліграмах елементу на 1 кг соку або в умовних балах (величина балу відповідатиме номеру стандартного розчину).

*Примітка.* Якщо забарвлення досліджуваного соку інтенсивніше за забарвлення останнього стандартного розчину, то сік розводять водою (на краплину соку краплину води). Відповідно до розведення збільшують результати.

**Увага!** Треба враховувати, що кольорові плями на папері розраховані для краплин соку і реактиву однакового розміру – близько 0,04 мл. Використовуючи шкали стандартних розчинів, розмір краплин також має бути однаковим. Для зручності у польовій лабораторії є змішані стандартні розчини, які вміщують усі елементи у відомій концентрації. Нумери стандартних розчинів від першого йдуть у порядку збільшення концентрації усіх елементів.

4.1.4. Після відбору проби крапельницю ретельно промивають водою, залишки вилучають фільтрувальним папером.

4.1.5. Результати аналізу розраховують користуючись табл. 1 або за надписами під шкалою кольорових плям.

*Примітка.* Концентрація фосфору та магнію в стандартних розчинах у чотири рази нижча, ніж вказано у табл. 1. Для аналізу на ці елементи

використовують сік, розведений у чотири рази водою, тому дані таблиці відповідають концентрації соку.

Таблиця 1.

Розрахунок результатів аналізу на окремі елементи в порівнянні зі шкалою стандартів

Номер стандартного розчину	Бал	Характеристика вмісту елементів	Вміст елементів, мг/кг соку			
			нітратний азот	фосфор	калій	магній
1	1	Дуже низький	100	16	600	40
2	2	Низький	250	40	1500	100
3	3	Помірний	500	80	3000	200
4	4	Високий	1000	160	6000	400

**5.2. Визначення нітратного нітрогену.** Вміст нітратного нітрогену значно вищий у стеблах і черешках, ніж у листових пластинках.

- *Визначення на зрізах рослин* (якісне визначення). На зріз стебла або черешка насипати сухий реактив на нітроген об'ємом, що дорівнює зерну жита, і розтерти іншою частиною зрізу стебла. Чимшвидше з'явиться забарвлення і чим воно яскравіше, тим більше нітратів у рослинах.

- *Визначення в клітинному соку рослин* (кількісне визначення). У заглиблення порцелянової пластинки насипати реактив на нітроген об'ємом, що дорівнює зерну жита, додати по три краплі буферного розчину. У перший ряд заглиблень пластинки додати по одній краплі змішаних стандартних розчинів, а до тих, що залишилися, додати по одній краплі клітинного соку досліджуваних рослин. Розмішати і за 1 хв. порівняти забарвлення досліджуваних соків зі шкалою стандартних розчинів. Результати використовують для практичних рекомендацій.

*Наприклад, для одержання високого врожаю картоплі, вміст нітратного нітрогену в клітинному соку стебел або черешків має дорівнювати 4 балам. Під час цвітіння він не повинен бути нижче 3 балів, за 1-2 бали підживлюють аміачною селітрою (0,5-1,5 ц/га).*

**5.8. Визначення фосфору.**

Як загальна кількість фосфору, так і відносний вміст різних його форм в окремих частинах рослини бувають неоднаковими і змінюються залежно від виду рослин, дії зовнішніх і внутрішніх факторів.

- У заглиблення порцелянової пластинки, що має кілька рядів заглиблень, ввести по одній краплі соку, розведеного водою у співвідношенні 1:3.

- У перший ряд заглиблень додати по одній краплі з чотирьох змішаних стандартних розчинів.

- В усі заглиблення з пробами додати по дві краплі реактиву на фосфор.

- Вміст розмішати олов'яною паличкою (олово теж реактив), поки забарвлення не стане стійким – не зникатиме через 10 с.

Отримане забарвлення соку порівняти зі шкалою стандартних розчинів або з кольоровою паперовою шкалою. Розведення клітинного соку водою зменшує концентрацію органічних кислот, які заважають утворенню синього забарвлення в результаті реакції.

**5.3. Визначення калію.** Деякі види рослин потребують дуже багато калію (наприклад, картопля). У результаті реакції на калій утворюється осад помаранчево-червоного забарвлення.

- У заглиблення другого ряду пластинки внести по краплині соку.
- У перший ряд заглиблень додати по краплині з чотирьох змішаних стандартних розчинів.
- До соку і стандартних розчинів додати по краплині реактиву на калій і хлоридну кислоту. Суміш перемішати.
- Забарвлення проб порівняти зі шкалою стандартних розчинів (або плямами на папері).

*Наприклад, для високого врожаю картоплі вміст калію в клітинному соці стебла до і під час бутонізації має бути високим (4 бали), під час цвітіння – не нижче 3 балів. За 1-2 бали рослини підживлюють калійними добривами, що містять незначну кількість хлору: каліймагnezією – 2-3 ц/га, хлоридом калію – 0,5-1,0, попелом – 5-10 ц/га.*

#### **5.4. Визначення магнію.**

У разі взаємодії титанового жовтого з гідроксидом магнію розвивається жовто-червоне забарвлення.

- Одну краплину соку розвести водою у співвідношенні 1:3.
- В один ряд заглиблень порцелянової пластинки внести по одній краплині стандартних розчинів.
- Додати послідовно по краплині титанового жовтого і перемішати, потім по краплині 1 %-го розчину крохмалю (свіжоприготовленого), їдкою натру.
- Порівняти забарвлення зі шкалою стандартних розчинів або кольоровою паперовою шкалою.

*Наприклад, для картоплі під час бутонізації вміст магнію має відповідати 3-4 балам. Якщо до і під час бутонізації мають 1 бал, то на 1 га вносять 1-2 ц каліймагnezії, на кислих ґрунтах доломітове борошно (5-10 ц/га).*

#### **5.5. Визначення хлору.**

Вміст хлору в рослинах залежить від багатьох факторів. Надлишок хлору негативно позначається на фізіологічному стані рослин, зокрема, у картоплі різко знижується врожайність і крохмалистість бульб.

- У заглиблення пластинки помістити невеликі кружечки індикаторного паперу і додати по одній краплині соку.
- Краплинами додати реактив на хлор, щоразу перемішуючи скляною паличкою, поки не з'явиться стійке коричневе забарвлення. Використану кількість краплин реактиву відмітити в таблиці 1.

Хлор титрують у нейтральному середовищі. Вільні органічні кислоти (якщо вони є) нейтралізують сухим реактивом  $\text{CaCO}_3$ . Якщо на титрування однієї краплини соку використано 1-3 краплини аргентум нітрату, вміст хлору для картоплі та деяких інших культур є нормальним. П'ять і більше краплин

свідчать про появу ознак токсичності, зниження врожаю. У разі високого вмісту хлору в період бутонізації і одночасно низькому вмісті нітратів рослини підживлюють нітратними добривами (аміачною селітрою або гноївкою). Завдяки антагонізму між йонами нітрати зменшують надходження хлору.

- Результати аналізів на хлор розрахувати за таблицею 2.

*Таблиця 2.* Розрахунок результатів аналізу на хлор за шкалою стандартних розчинів.

Кількість краплин	1	2	3	4	5	6
Вміст хлору на 1 л, мг	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6.

Зробити висновки щодо отриманих результатів у звіті.

## Лабораторна робота № 7

**Тема:** Визначення інтенсивності фотосинтезу за накопиченням в листках органічного карбону (метод Ф.З. Бородуліної).

**1. Мета.** Освоїти методику визначення вмісту органічного карбону накопиченого в листках рослин в результаті процесу фотосинтезу. Дослідити інтенсивність фотосинтезу залежно від умов навколишнього середовища (інтенсивності світла, температури, кількості  $\text{CO}_2$  в повітрі).

**2. Обладнання та реактиви.** Пеларгонія або інші кімнатні рослини, витримані напередодні досліду впродовж двох діб у темряві; 0,4 н. розчин дихромату калію в розбавленій  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:1); 0,2 н розчин солі Мора (блакитно-зелені кристали без бурого нальоту розчиняють у 1 л води з 20 мл конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); 0,5 %-ий розчин дифеніламіну у 80 %-ій сульфатній кислоті; колби місткістю 200 мл, скляні лійки, піпетки місткістю 10 мл, бюретки місткістю 25 мл, свердло, лінійки, електроплитка, кристалізатори з холодною водою.

### 3. Теоретична частина

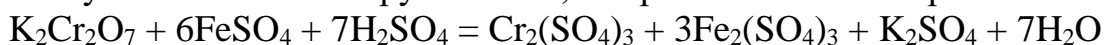
Фотосинтез – унікальний в фізико-хімічному відношенні процес, який збільшує вільну енергію біосфери за рахунок зовнішнього джерела – Сонця і забезпечує існування як рослин, так і усіх гетеротрофних організмів, у тому числі й людини. Зараз важко, а то і зовсім неможливо знайти будь-які природні явища, які не поєднані з фотосинтезом. Із накопиченням знань про механізми даного процесу фотосинтез визначають як фототрофну функцію деяких бактерій, водоростей та вищих рослин. Фототрофна функція – це сукупність процесів поглинання, перетворення та використання в багатьох ендергонічних реакціях світлових квантів, у яких відбувається первинне становлення пластичних та енергетичних ресурсів життя на нашій планеті. Особливістю рослинної клітини є наявність у ній хлоропластів, у яких утворюється органічна речовина із  $\text{CO}_2$  і  $\text{H}_2\text{O}$  за рахунок енергії Сонця. Фотосинтез – це окисно-відновний процес. За участю хлорофілу й енергії сонячних квантів вода фотоокиснюється, в результаті чого виділяються кисень та водень, останній і відновлює вуглекислий газ до рівня вуглеводів. Ці реакції відбуваються відповідно в світлову та темнову фази фотосинтезу. У тилакоїдах хлоропласта відбуваються світлові реакції фотосинтезу: уловлювання квантів світла пігментами – хлорофілом, каротиноїдами, фікобілінами, фотоокиснення води, транспортування електронів за участю електронно-транспортного ланцюга з утворенням відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотид фосфату (НАДФ.  $\text{H}_2$ ) і макроергічних сполук аденозинтрифосфату (АТФ). Певна частина синтезованих у світлових реакціях НАДФ.  $\text{H}_2$  і АТФ пізніше використовується в процесі синтезу

органічних сполук із вуглекислого газу та води. Ці реакції відбуваються у хлоропластах і їх називають темновими реакціями фотосинтезу.

У процесі фотосинтезу карбон (у вигляді  $\text{CO}_2$ ), що поглинається рослиною, включається в молекули синтезованих органічних сполук. Оскільки між кількістю синтезованих речовин і фотосинтетичною активністю листка існує пряма залежність, то за змінами вмісту карбону органічних речовин можна оцінити інтенсивність їх утворення внаслідок фотосинтезу. Кількість органічного карбону визначають за методом І. В. Тюрина, який базується на принципі мокрого спалювання рослинного матеріалу в суміші сульфатної кислоти з калій дихроматом. Реакція відбувається за рівнянням:



Невикористаний для окиснення органічного карбону залишок калій дихромату визначається титруванням 0,2 М розчином солі Мора:



Індикатором реакції є дифеніламін, який у відновленій формі безбарвний, у разі окиснення переходить у дифеніл бензидин фіолет синьо-фіолетового кольору. Калій дихромат окиснює дифеніламін. Унаслідок цього його розчин набуває червоно-бурого забарвлення. Під час титрування сіллю Мора шестивалентний хром відновлюється до тривалентного, внаслідок чого його розчин поступово набуває синього забарвлення, а до кінця титрування синьо-фіолетового. Коли весь хром прореагує, наступне додавання солі Мора зумовлює перехід окисненої форми індикатору у відновну (безбарвну). Внаслідок цього з'являється зелене забарвлення, яке надають розчину йони хрому (III). Чіткому переходу синьо-фіолетового забарвлення в зелене заважають йони  $\text{Fe}^{3+}$ , що утворюються в процесі реакції. Отже, чим більше дихромату калію використовується на спалювання органічного карбону, тим інтенсивніший фотосинтез. За різницею кількості карбону в рослинному матеріалі до початку фотосинтезу й після нього на світлі визначають інтенсивність фотосинтезу.

## 4. Хід роботи

### 4.1. Підготовчі роботи.

З кількох половинок листків рослин свердлом вирізати 3-6 дисків площею поверхні (0,5-1,0 см). Диски опустити у конічну колбу місткістю 200 мл з 10 мл розчину дихромату калію в сульфатній кислоті.

Вміст колб перемішати, накрити скляними лійками, які використовують як обернені холодильники (рис. 1). Розчини прокип'ятити впродовж 5 хв. на електроплитці.

*Примітка.* Якщо розчин у колбі набуває зеленого забарвлення, дослід повторюють з меншою кількістю рослинних дисків, оскільки хромової суміші виявилось недостатньо для озолення рослинного матеріалу.

### 4.2 Попереднє визначення карбону.

Після кип'ятіння колби охолодити, долити 20 мл води і додати 5 краплин індикатору дифеніламіну або фенілантранілової кислоти. Розчини

титрують сіллю Мора з відомим титром до світло-зеленого кольору. Одержані дані дають змогу визначити вміст органічного карбону в листках до початку фотосинтезу.

*Примітка.* Внаслідок окиснення дифеніламіну розчин дихромату калію набуває бурого забарвлення.

#### 4.3. Визначення карбону в листках після фотосинтезу.

Дослідні рослини виставити на світло різної інтенсивності. За 1 годину з другої половинки дослідних листків вирізати нові диски, які теж спалюють. Визначити вміст органічного карбону в зразках за наведеною вище методикою.

Паралельно провести контрольне визначення (без рослинного матеріалу), повторюючи всі описані вище операції.

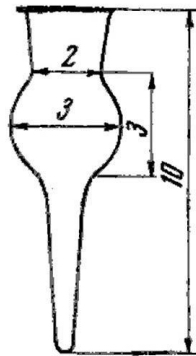


Рис.1 Холодильник з водою.

#### 4.4. Розрахунки.

Кількість карбону ( $X$ ) на 1 дм<sup>2</sup> поверхні листків до і після освітлення рослин за 1 год. обчислити за формулою:

$$X = \frac{(A - B) \cdot k \cdot 0,6 \cdot 100}{S},$$

де  $A$  – кількість солі Мора, що використана на титрування контрольної колби (без рослинного матеріалу), мл;  $B$  – кількість солі Мора, що використана на титрування дослідної колби, мл;  $k$  – поправка до титру солі Мора ( $k=1$ );  $S$  – площа дисків (у см<sup>2</sup>), взятих для аналізу; 0,6 – коефіцієнт для перерахунку мл солі Мора у мг карбону. Результати дослідів записати у таблицю 1.

Таблиця 1

Рослина	Час визначення	Використано				Площа дисків, см <sup>2</sup>	Кількість вуглецю (мг / м <sup>2</sup> )	Інтенсивність фотосинтезу (мг вуглецю / (м <sup>2</sup> · год))
		K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , мл		солі Мора, мл				
		Конт роль (А)	Дослід (В)	Контроль (А)	Дослід (В)			
	Вміст органічних речовин на початку дослідів							
	Після фотосинтезу на світлі							

## Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть основні принципи методів, за якими визначають інтенсивність фотосинтезу.
2. Які показники фотосинтезу враховано у методі Ф.З. Бородуліної для визначення інтенсивності процесу?
3. Запишіть хімічні реакції, що проходять під час фотосинтезу та дихання рослин.
4. Запишіть реакції, що лежать в основі описаного методу визначення карбону.



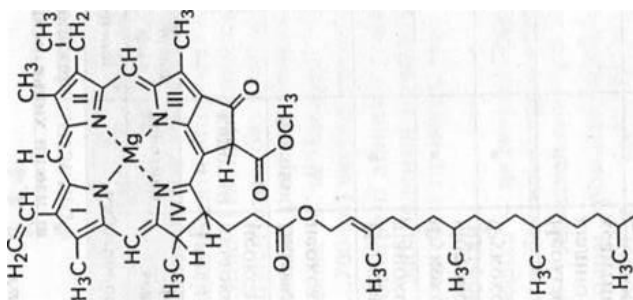
## Лабораторна робота № 8

**Тема:** Хімічні властивості пігментів листка. Розподіл пігментів за методом К. Крауса. Одержання хлорфілінів.

- 1. Мета роботи.** Дослідити різну розчинність пластидних пігментів у спирті та бензині, провести реакцію омилення хлорофілу.
- 2. Матеріали, реактиви, обладнання.** Спиртовий екстракт пігментів із листків різних рослин; бензин, 20 %-ий розчин гідроксиду калію або натрію; пробірки в штативах, вода, водяна баня.

### 3. Теоретична частина

*Хлорофіли.* Хлоропласти вищих рослин містять хлорофіл а й хлорофіл б. Вони були ідентифіковані російським вченим М.С. Цветом (1906 р.) за допомогою розробленого ним методу хроматографії. Структурна формула хлорофілу, запропонована Г. Фішером (1939 р.), одержала остаточне підтвердження в 1960 р. у результаті двох незалежно проведених робіт у США й ФРН по штучному синтезу хлорофілу а. Хлорофіл – складний ефір дикарбонової кислоти хлорофіліна, у якій одна карбоксильна група етерифікована залишком метилового спирту (CH<sub>3</sub>OH), а інша - залишком одноатомного неорганічного спирту фітолу (C<sub>20</sub>H<sub>39</sub>OH):



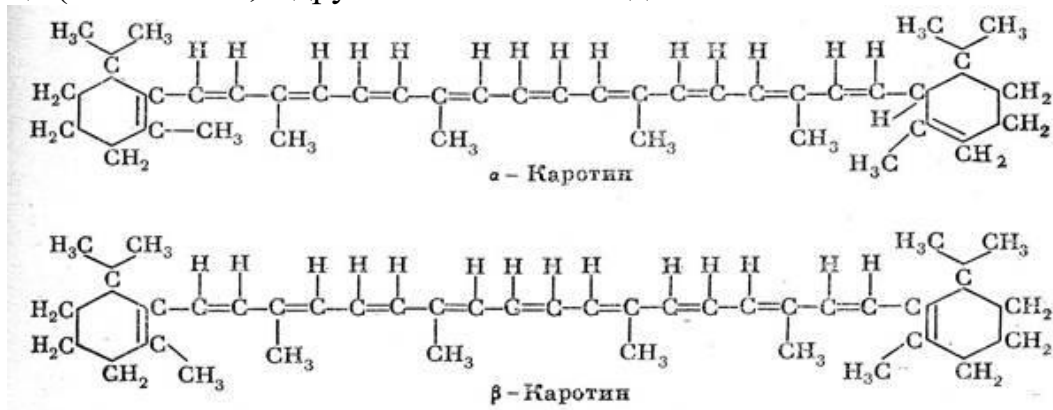
Вище наведена структурна формула хлорофілу а. Чотири пірольних кільця (I—IV) з'єднані між собою метиновими містками, які утворюють порфіринове ядро. Атоми азоту пірольних кілець чотирма координаційними зв'язками взаємодіють із атомом Mg. У структурі порфіринового ядра є також циклопентанове кільце, що містить хімічно активну карбонільну групу. Структура, що складається з тетрапірольного й циклопентанового кілець, одержала назву форбіна. Порфіринове кільце – це система з дев'яти пар подвійних й одинарних, тобто кон'югованих зв'язків, які чергуються з 18 делокалізованими  $\pi$ -електронами. Хлорофіл б відрізняється від хлорофілу а тим, що у третього вуглецю другого пірольного кілець замість метильної знаходиться альдегідна група. Структура хлорофілу, позбавлена фітолу, називається хлорофілідом. При заміщенні атома магнію протонами водню утворюється феофітин.

*Оптичні властивості.* Відмінною рисою всіх пігментів є наявність в їхньому складі системи слабо утримуваних делокалізованих електронів, що порушуються квантами видимої частини сонячного спектра. Це лежить в основі їхньої властивості – вибіркового поглинання світла. Різко виражені максимуми поглинання хлорофілів перебувають у синьо-фіолетовій і червоній частинах спектра. Максимуми поглинання розчину хлорофілу а в етиловому спирті – 428-430 й 660-663 нм відповідно, хлорофілу b – 452-455 й 642-644 нм. Хлорофіли дуже слабо поглинають жовтогарячі й жовті промені й зовсім не поглинають зелені й інфрачервоні. Тому розчин хлорофілу а має зелений або синьо-зелений колір, хлорофілу b – жовто-зелений. Поглинання в синьо-фіолетовій частині спектра обумовлено системою кон'югованих 9 пар одинарних і подвійних зв'язків порфіринового ядра молекули хлорофілу з 18 делокалізованими  $\pi$ -електронами, які збуджуються квантами з енергією  $4,5 \times 10^{-19}$  Дж, що відповідає цим променям. Поглинання в червоній області спектра (енергія кванта  $3 \times 10^{-19}$  Дж) пов'язане з гідруванням подвійного зв'язку у C<sub>7</sub>-C<sub>8</sub> в IV пірольному кільці, присутністю магнію в порфіриновому ядрі й наявністю циклопентанового кільця (V). Саме ці особливості структури сприяють зниженню поглинання в жовтій і зеленій частинах спектра. В хлорофілу b, що відрізняється від хлорофілу а заміною метильної групи на альдегідну, максимуми поглинання світла виявляються більше зближеними за рахунок зсуву синьо-фіолетового в довгохвильову, а червоного – у короткохвильову області. Крім того, хлорофіл b більш повно використовує синьо-фіолетове світло, ніж хлорофіл а; у червоних променях переваги має хлорофіл а. Розчин хлорофілу має яскраву червону-вишнево-червону флуоресценцію – випромінюванням поглинених квантів світла. Відповідно до правила Стокса флуоресценція зсунута в більше довгохвильову частину в порівнянні з поглинанням світла, максимум флуоресценції 650-668 нм. Хлорофіл у живому листі флуоресціює слабо. Це пов'язане з тим, що енергія поглинених квантів в основному перетворюється в хімічну, причому за інтенсивністю флуоресценції листка можна судити про ефективність фотосинтезу. Чим інтенсивніше флуоресценція, тим нижче ККД використання поглиненої енергії.

*Каротиноїди.* Це жиророзчинні пігменти жовтого, яскраво жовтого й червоного кольорів. Вони входять до складу хлоропластів і хромопластів зелених частин рослин (квіток, плодів, коренеплодів). У не зелених листках їхній колір маскується хлорофілом.

Каротиноїди є тетратерпеноїдами (8 залишків ізопрену, C<sub>40</sub>). Каротиноїди можуть бути ациклічними (аліфатичними), моно- і біциклічними. Цикли на кінцях молекул каротиноїдів - похідні іонана. Каротини являють собою вуглеводні з формулою C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>. У хлоропластах вищих рослин містяться  $\alpha$ - і  $\beta$ -каротини.  $\beta$ -каротин має два  $\beta$ -іононових кільця (подвійний зв'язок між C<sub>5</sub> і C<sub>6</sub>). При гідролізі  $\beta$ -каротину по центральному подвійному зв'язку утворюються дві молекули вітаміну А

(ретинолу).  $\alpha$ -каротин відрізняється від  $\beta$ -каротину тим, що в нього одне кільце ( $\beta$ -іононове, а друге  $\varepsilon$ -іононове - подвійний зв'язок між  $C_4$  й  $C_5$ ).



Ксантофіли є кисневмісними похідними каротину. Ксантофіл лютеїн — похідне  $\alpha$ -каротину, а зеаксантин —  $\beta$ -каротину. Вони мають по одній гідроксильній групі в кожному іононовому кільці —  $C_{40}H_{56}O_2$ . Додаткове включення в молекулу зеаксантина двох атомів кисню по подвійних зв'язках  $C_5$ - $C_6$  (епоксидні групи) призводить до утворення віолаксантина ( $C_{40}H_{56}O_4$ ), при включенні епоксидних груп у лютеїн утворюється неоксантин. Синтез каротиноїдів починається з ацетил-SKoa через мевалонову кислоту до лікопіна — ациклічного каротину, що є попередником всіх інших каротиноїдів. Спектри поглинання каротиноїдів характеризується двома смугами у фіолетово-синій і синій частинах спектра від 400 до 500 нм і визначаються системою кон'югованих зв'язків. При збільшенні числа таких зв'язків максимумами поглинання зміщаються в довгохвильову частину спектра. Подібно хлорофілам, каротиноїди нековалентно пов'язані з білками й ліпоїдами мембран і тилакоїдів.

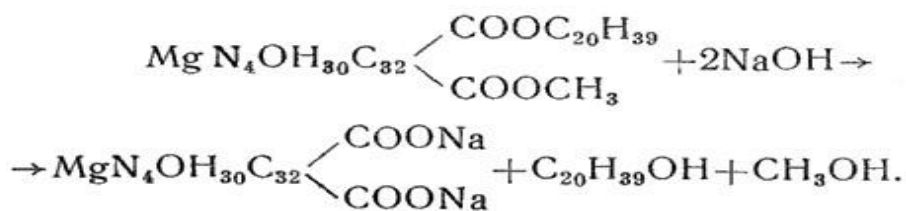
Фізіологічна роль каротиноїдів. Каротиноїди є обов'язковими компонентами пігментних систем. Вони виконують роль додаткових пігментів, які передають енергію поглинутих квантів хлорофілу а для здійснення фотохімічної роботи. Особливо зростає їхнє значення як світловловлюючих систем у синьо-фіолетовій і синій частинах спектра у затінках, тобто коли переважає розсіяна радіація. Є докази, що каротиноїди виконують захисну функцію, запобігаючи фотоокисненню хлорофілу. Висловлюється також припущення про пряму участь каротиноїдів у розщепленні води й кисневому обміні при фотосинтезі.

У верхівках пагонів рослин каротиноїди забезпечують визначення напрямку світла і їхню орієнтацію до світлового потоку за рахунок фототропізму.

У розчинах, одержаних шляхом екстракції розтертих зелених тканин рослин полярними розчинниками, міститься суміш пластидних пігментів, які беруть участь у фотосинтезі. Хлорофіли, яких у листках значно більше, маскують при цьому каротиноїди. Отриманий екстракт пігментів можна розділити за методом Крауса, який ґрунтується на різній розчинності пігментів у спирті та бензині. Ці розчинники у разі зливання не змішуються й утворюють дві фази — верхню бензинову та нижню спиртову, завдяки чому й

відбувається розподіл компонентів суміші. Спорідненість пігментів до полярних (спирт, ацетон) і неполярних (бензин) розчинників визначається рівнем їхньої полярності. Ксантофіли містять дві або більше полярних груп, добре розчинні у спирті, тоді як каротин відрізняється вищою спорідненістю до бензину. Фітольний залишок у молекулі хлорофілу гідрофобний, тому зумовлює можливість взаємодії молекули пігменту з бензином. Відщеплення фітолу під час омилення хлорофілу збільшує спорідненість пігменту до полярних розчинників.

У разі обробки хлорофілу лугами, відбувається реакція омилення в результаті чого відщеплюються спиртові залишки і утворюються метиловий спирт, фітол та хлорофілінова сіль. Реакція омилення відбувається за рівнянням:



Внаслідок реакції утворюється сіль хлорофілінової кислоти, яка зберігає зелене забарвлення й оптичні властивості хлорофілу, але відрізняється більшою гідрофільністю порівняно з незміненим пігментом.

#### 4. Хід роботи.

##### 4.1. Завдання (приготування екстракту):

Листки різних рослин подрібнити ножицями або скальпелем. Подрібнену наважку (0,2-0,5 г) розтерти у ступці, додаючи на кінчику скальпеля  $\text{CaCO}_3$  для нейтралізації кислот клітинного соку. Зволожити матеріал незначною кількістю розчинника, розтерти до гомогенної маси і кількісно перенести на фільтр Шотта, змиваючи багаторазово ступку невеликими порціями ацетону (спирту). Фільтр Шотта вставити в пробірку, що міститься в колбі Бунзена, яку з'єднати із насосом. Розчини відфільтрувати, змиваючи стінки фільтру невеликими порціями розчинника доти, поки відфільтрована рідина не стане безбарвною. Об'єм розчину довести відповідними розчинниками до 10 мл. Вміст у пробірці збовтати.

##### 4.2. Завдання.

1. У пробірку налити 3 мл концентрованого екстракту пігментів, додати 6 мл бензину і 2-3 краплини води.
2. Пробірку закрити скляною пробкою і вміст добре збовтати.

*Примітка.* За 2-3 хв. спостерігають розшарування розчину на зелений (верхній) і жовтий (нижній) шари. У верхньому бензиновому шарі розчинені хлорофіли і каротин (гідрофобні речовини), у нижньому водно-спиртовому – ксантофіл. У нижньому шарі можна визначити спектр поглинання ксантофілу. Показником чистоти отриманого ксантофілу від зелених пігментів є відсутність поглинання в червоній ділянці спектру.

3. Зафіксувати розподіл пластидних пігментів і зробити висновок щодо їхньої розчинності в спирті та бензині.

#### 4.3. Завдання.

1. У пробірку налити 3 мл концентрованого екстракту пігментів, додати 1 мл 20 %-го розчину NaOH, вміст перемішати.
2. Пробірку поставити на киплячу водяну баню.
3. Щойно розчин закипить, пробірку вийняти й вміст охолодити.
4. До охолодженого розчину додати рівний об'єм бензину та декілька краплин води для кращого розподілу суміші.
5. Вміст пробірки різко струсити і залишити для відстоювання.

*Примітка. Спостерігають утворення двох шарів: нижній (спиртовий) – суміш солі хлорофілінової кислоти (продукт омилення хлорофілу) та ксантофілу; верхній (бензиновий) – розчин каротинів. Солі хлорофілінової кислоти, як і хлорофіл, зелені, але характеризуються гідрофільністю і тому перерозподіляються в нижній водно-спиртовий шар. У верхньому шарі можна визначити спектр поглинання каротину.*

### 5. Контрольні запитання та завдання

1. Які зміни структури, складу та властивостей молекули хлорофілу відбуваються під час омилення ?
2. Чим хлорофілінова кислота відрізняється від її солей?
3. Що обумовлює гідрофобність молекули хлорофілу?
4. Звідки походить назва «каротин» ?
5. Який елемент займає центральне положення в молекулі хлорофілу?

## Лабораторна робота № 9

**Тема:** Розділення пігментів хлоропластів хроматографічним методом та визначення їх кількості у листках.

- 1. Мета роботи.** Відокремити каротиноїди від хлорофілів і визначити їхній вміст у зелених листках.
- 2. Матеріали, реактиви, обладнання.** Листки вищих рослин (пеларгонії, примули, плюща), суспензії водоростей; 100 %-ий ацетон, 96 %-ий розчин етилового спирту, петролейний ефір, етиловий ефір, гексан, бензин,  $MgCO_3$  або  $CaCO_3$ ,  $Na_2SO_4$  зневоднений, кварцовий пісок; порцелянові ступки з товчачиками, скальпель, ножиці, пінцет, скляні палички, колба Бунзена, скляний фільтр № 3, мірні пробірки місткістю 10 мл, мірний циліндр місткістю 25 мл, конічні пробірки, центрифужні пробірки, піпетки об'ємом 2 і 5 мл, капіляри, хроматографічна камера з притертою кришкою, силуфольні пластинки, хроматографічний папір, фольга, ваги торсійні та центрифужні, центрифуга, канцелярські скріпки, лінійки, графітні олівці, насос Камовського або компресор, фен для підсушування хроматограм.

### 3. Теоретична частина

Уперше швидкий розподіл окремих компонентів із суміші фотосинтетичних пігментів методом адсорбційної хроматографії на колонках здійснив у 1904 р. М. С. Цвет. Пізніше виявилось, що ефективнішою є розподільна паперова та тонкошарова хроматографія. Основи її становить неоднаковий розподіл компонентів суміші між двома рідкими фазами, що не змішуються між собою. Одна з них рухома, інша, наприклад, хроматографічний папір, силікагель, силуфол – нерухома. Твердий носій утримує на своїй поверхні нерухому фазу розчинника (полярний розчинник). Функцію рухомої фази виконує неполярний розчинник.

Досліджувану суміш сполук наносять на папір або на тонкошарову хроматографічну пластинку. Потім через хроматографу пропускають роздільну суміш розчинників. Унаслідок різниці в розчинності у певному розчиннику та різної адсорбції пігменти рухаються сорбентом з різною швидкістю й розташовуються на сорбенті окремими зонами. Чим більша розчинність пігменту в розчиннику і чим слабше він сорбується даним сорбентом, тим швидше буде він рухатися і тим далі від старту розташовуватиметься на носії його зона.

### 4. Хід роботи

#### 4.1. Отримання екстракту пігментів.

Наважку рослинного матеріалу (100-200 мг) подрібнити ножицями, перенести у порцелянову ступку, на кінчику скальпеля додати  $CaCO_3$ , долити 4-5 мл спирту або ацетону та ретельно розтерти. Отриманий екстракт

перенести на скляний фільтр, вставлений у колбу Бунзена. За допомогою насоса розчин відфільтрувати. Рослинний матеріал повторно залити розчинником, розтерти та перенести на фільтр. Розчин відфільтрувати.

*Примітка.* Цю операцію повторюють доти, доки розчин, який стікає з фільтру, не буде абсолютно безбарвним.

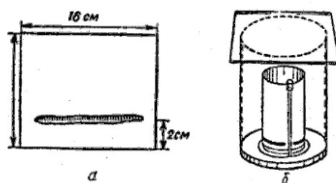
Спиртовий екстракт пігментів перенести до мірної колби чи пробірки, колбу Бунзена промити декілька разів невеликими порціями суміші і довести сумішню об'єм екстракту в мірній колбі до мітки.

*Робота кількісна, не можна втрачати жодної краплі. Отриманий екстракт містить суміш зелених і жовтих пігментів.*

#### **4.2. Хроматографічне розділення пігментів.**

Розділення виконують на хроматографічному папері або силуфолових пластинках розміром 15 x 15 см. Пігменти нанести капіляром по всій ширині пластинки, відступаючи на 2 см від її нижнього краю та 1 см від бічних країв. Об'єм нанесеного екстракту – 0,5-0,8 мл (рис. 1 а).

Хроматографічний папір або пластинку ретельно підсушити у струмені повітря, помістити у хроматографічну камеру, попередньо насичену сумішню розчинників (наприклад, бензин, ацетон, петролейний ефір, гексан в об'ємних співвідношеннях 10:10:3:10; або бензин, петролейний ефір, ацетон в об'ємних співвідношеннях 8,5:3,5:3,5).



**Рис.1.** *Схема нанесення стартової плями на хроматограму та хроматографічна камера:*

*а) хроматографічний папір або силуфольна пластинка з нанесеною смужкою пігментів;*

*б) хроматографічна камера з розчином і папером або пластинкою*

*Примітка.* Для кожного рослинного об'єкта суміш розчинників та їх об'ємне співвідношення добирається експериментально. Розгонку проводять у затемнених чорним папером хроматографічних камерах зі щільно закритою кришкою (рис. 1.б).

Після того, як рівень розчинника підніметься майже до верхнього краю пластинки, хроматограму вийняти та висушити під струменем повітря. Проаналізувати хроматограму: визначити пігментні зони.

*Примітка.* Порядок розташування окремих зон пігментів подано на **рис.1**. На хроматограмі стартова пляма може бути зеленою або рожевою за наявності хлорофілу й антоціанів, хлорофіл *b* – жовто-зеленого кольору, хлорофіл *a* – синьо-зелений, жовті ксантофіли і червоно-жовтий каротин

(рухається разом із фронтом розчинника). Крім того, на хроматограмі часом виявляється бурий феофітин.

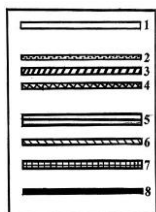
Для розділення лише каротиноїдів треба поставити другу хроматограму в іншу систему розчинників – суміш бензолу і петролейного ефіру (3:1).

*Примітка.* Пігменти розподіляються так: знизу стартова пляма, далі віолаксантин, лютеїн-епоксид, лютеїн, каротин. Між стартовою плямою і жовтими пігментами нерозділеними залишаються хлорофіли.

Для виявлення неоксантину поставити ще одну хроматографу в роздільну суміш етиловий спирт – петролейний ефір (1:20).

*Примітка.* Пігменти на хроматограмі розміщуються в такому порядку: зверху каротин, нижче хлорофіл а, суміш ксантофілів, хлорофіл b, неоксантин рис. 3.4).

7. Хроматограми розшифрувати, в звіті відмітити розташування та колір розподілених пігментів.



1 - Рис.2. Розподіл пігментів на хроматограмі: каротин; 2 – феофітин; 3. – хлорофіл а; 4 – хлорофіл b; 5– лютеїн + зеаксантин; 6– віолаксантин; 7 – неоксантин; 8– хроматографічна суміш.

### **4.3. Визначення концентрації хлорофілів і каротиноїдів.**

Забарвлені зони на хроматограмах, що відповідають каротину та ксантофілам (неоксантин, віолаксантин, антероксантин, лютеїн+зеаксантин), зняти скальпелем із 2-3 хроматограм. Зони однойменних пігментів об'єднати і помістити у пробірки з притертими корками.

Проводять елюцію пігментів такими розчинниками: каротин – петролейним ефіром, ксантофіли – етанолом.

*Примітка.* Елюцію виконують під час струшуванні проб.

Елюат відфільтрувати через паперовий фільтр у мірні пробірки з притертим корком, фільтр кілька разів промити відповідним розчинником і довести об'єм до 3 мл.

Оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі: каротин– за 452 нм, лютеїн – за 445, віолаксантин – за 442, неоксантин – за 438, хлорофіли а і b – у сірчаному ефірі за довжини хвилі відповідно 662 та 642 нм.

*Таблиця 3*

Питомі коефіцієнти екстинкції для основних пігментів фотосинтезу



Пігмент	Максимум поглинання, нм	Розчинник	Питомий коефіцієнт екстинкції
β-Каротин	464	Хлороформ	220
Каротини	452	Петролейний ефір	260
α-Каротин	456	Хлороформ або гексан	242
Лютеїн	445	Етанол	258
Віолаксантин	442	- " -	225
Зеаксантин	451	- " -	248
Неоксантин	438	- " -	227
Антераксантин	446	- " -	235
Хлорофіл <i>a</i>	662	Сірчаний ефір	9,81
Хлорофіл <i>b</i>	642	- " -	17,6

Примітка. Ці дані співставленні з питомими коефіцієнтами екстинкції (табл. 3).

Концентрацію пігментів ( $C$ , г/л) обчислити за формулою:

$$C = \frac{D}{A \cdot L},$$

де  $D$  – оптична густина за відповідної довжини хвилі, ум.од.;  $A$  – питомий коефіцієнт погашення, л/(г·см) (для каротину – 260, лютеїну – 258, віолаксантину – 225, неоксантину – 227),  $L$  – товщина шару розчину, см.

Вміст каротиноїдів в 1 г маси сирової речовини ( $A$ , мг/г) обчислити за формулою:

$$A = \frac{C \cdot V \cdot K}{H},$$

де  $C$  – концентрація пігментів, г/л;  $V$  – об'єм екстракту, мл;  $K$  – відношення об'єму елюату до загального об'єму екстракту, нанесеного на хроматограмі;  $H$  – наважка рослинного матеріалу, г.

## 5. Контрольні запитання та завдання

1. Назвіть види хроматографічного аналізу. В чому полягає його суть?
2. Назвіть основні правила нанесення екстракту пігментів на хроматограму.
3. Якщо стартова пляма залишається зеленою, які пігменти містяться в ній?
4. Які пігментів беруть участь у фотосинтезі?
5. Яка функція каротиноїдів у рослинах?
6. Які розчинники застосовують для екстрагування пігментів?

## Лабораторна робота № 10

**Тема:** Кількісне визначення вмісту Феруму, Магнію і Кальцію у біоматеріалах.

**1. Мета:** Освоїти методику визначення вмісту Ca, Mg, Fe в тканинах тварин. Поглибити знання про роль мінеральних елементів у життєдіяльності організмів.

**2. Обладнання та реактиви.** Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Сушильна шафа. Мікрохвильова чи муфельна піч. Плитка. Фарфорова чашка. Фарфоровий тигель. Фільтр. Конічна колба на 50 см<sup>3</sup>. Годинникове скло або лійка, отвір якої закритий зволоженою ватою. Мікробюретка. Мірна колба на 100 см<sup>3</sup>. Щільний фільтр. Скляна паличка. Штатив із пробірками. М'язева тканина тварин. Розчин хлоридної кислоти (1:1). Фосфатно-щавлево-сульфосаліциловий реактив. Концентрований розчин амоніаку. Дистильована вода. Стандартний розчин NH<sub>4</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, що містить 0,2 мг Fe<sup>3+</sup> в 1 см<sup>3</sup> розчину. Аргентум нітрат (ω=1%). Нітратна кислот. Сульфатна кислота (с(1/2)=0,1 моль/дм<sup>3</sup>). Змішаний індикатор. Натрій гідроксид (с=0,1 моль/дм<sup>3</sup>). Розчин калій перманганату (с(1/5)=0,05 моль/дм<sup>3</sup>).

- **Фосфатно-оксалатно-сульфосаліциловий реактив.** Оксалатну кислоту масою 30 г, амонійдигідрофосфат масою 30 г, сульфосаліцилову кислоту масою 30 г разом розчиняють у воді та доводять водою об'єм розчину до 1 дм<sup>3</sup>.
- **Водний розчин метилового червоного.** Метилрот масою 0,1 г розтертий у ступці з 7,5 см<sup>3</sup> розчину натрій гідроксиду (с=0,05 моль/дм<sup>3</sup>), отриманий розчин доводять дистильованою водою до 50 см<sup>3</sup>. Для приготування змішаного індикатора додають 0,05 г метиленового синього.

### 3. Теоретична частина

У м'язах риб у великих кількостях містяться Фосфор, Кальцій, Магній, Натрій, Сульфур, Хлор та ін. Ще містяться в невеликих кількостях Ферум, Купрум, Манган, Кобальт, Бром, Йод. На відміну від теплокровних тварин, в м'язах риб відносно високий вміст Кальцію, Магнію, Йоду, Феруму.

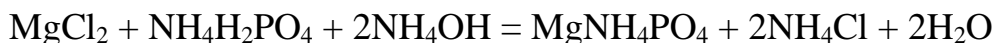
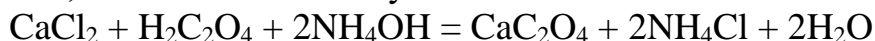
Таблиця 1

Мінеральний склад м'язевих тканин (мг, %)

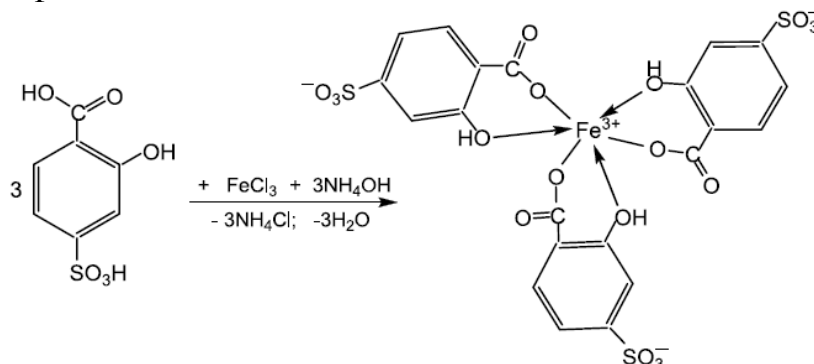
Об'єкт	Ca	Mg	P	K	S	I	Co	Fe
Велика рогата худоба	17	23	211	344	160	0,002	0,003	1,8
Свині	8	27	170	316	220	0,006	0,008	1,9
Прісноводні риби	47	77	193	264	200	0,011	0,002	2,0
Морські риби	46	62	226	273	197	0,137	0,002	3,5

**Принцип методу.** Досліджуваний матеріал висушують, а потім спалюють у мікрохвильовій чи муфельній печі. Отриманий мінеральний залишок розчиняють у хлоридній кислоті. Далі Ca<sup>2+</sup> осаджують у вигляді

кальцій оксалату, а  $Mg^{2+}$  – і вигляді магній-амоній фосфату. Розчинність кальцій оксалату менша, ніж кальцій фосфату, а розчинність магній-амоній фосфату менша, ніж магній оксалату.

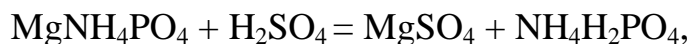


Ферум залишається у розчині у вигляді водорозчинної комплексної сполуки з сульфосаліциловою кислотою:



Осади кальцій оксалату і магній-амоній фосфату відділяють фільтруванням і відмивають від домішок. Фільтрат збирають у мірну колбу, доводять до певного об'єму і фотометрують або колориметрують з світлофільтром при довжині хвилі 440 нм.

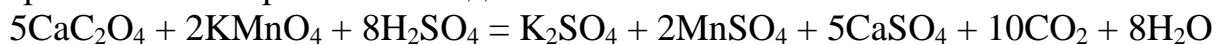
Осад переносять у колбу для титрування, нагрівають для видалення надлишку амоніаку і визначають  $Mg^{2+}$ , а потім -  $Ca^{2+}$  об'ємним методом. Для визначення  $Mg^{2+}$  осад розчиняють, додаючи відомий об'єм титрованого розчину сульфатної кислоти:



Надлишок сульфатної кислоти відтитровують розчином натрій гідроксиду в присутності комбінованого індикатора, що є сумішшю метилового червоного з метиленою синьою.

*Розчин індикатора готують на дистильованій воді без спирту, оскільки останній буде заважати визначенню  $Ca^{2+}$ , взаємодіючи з калій перманганатом.*

Після визначення  $Mg^{2+}$  у цьому ж розчині визначають  $Ca^{2+}$  перманганатометричним методом:



Температура розчину, який титрують, повинна бути 60-70°C.

#### 4. Хід роботи.

##### 4.1. Визначення Феруму

В досліджуваній пробі повинно міститися від 2 до 15 мг  $Mg^{2+}$  і від 3 до 25 мг  $Ca^{2+}$ . М'язи тварин (м'ясо птиці чи риби) масою 20-25 г ретельно подрібнюють і висушують у фарфоровій чашці в сушильній шафі при 100 °С. Висушений матеріал подрібнюють ще раз, переносять у фарфоровий тигель, поміщають у мікрохвильову чи муфельну піч і спалюють пробу при 450-500° С. Після спалювання до залишку в тиглі додають 1 см<sup>3</sup> дистильованої води, висушують і знову прожарюють 15-20 хв. до повного згоряння. У залишку не повинно бути чорних частинок вугілля. Якщо ж вони є, то знову додають

воду, висушують і прожарюють. Коли відбулась повна мінералізація, тигель охолоджують, додають сюди 1 см<sup>3</sup> дистильованої води і 2 см<sup>3</sup> розчину хлоридної кислоти (1:1), перемішують, фільтрують у конічну колбу на 50 см<sup>3</sup>, промивають фільтр невеликою кількістю дистильованої води. У фільтраті визначають Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>. Для цього до нього додають 10 см<sup>3</sup> фосфатно-оксалатно-сульфосаліцилового реактиву, нагрівають до 70-80<sup>0</sup> С, знімають з плитки і повільно перемішуючи нейтралізують кислоту краплинами концентрованого розчину амоніаку до помутніння розчину. Потім вміст колби нагрівають протягом 5 хв., додають краплинами ще 1 см<sup>3</sup> концентрованого розчину амоніаку і залишають до тих пір, поки температура знизиться приблизно до 40<sup>0</sup> С. Потім знову додають 5 см<sup>3</sup> концентрованого розчину амоніаку, колбу закривають годинниковим склом чи лійкою, отвір якої закритий зволоженою ватою, і залишають на 10 годин для повного осадження Mg<sup>2+</sup>.

Вміст колби фільтрують у мірну колбу на 100 см<sup>3</sup> через щільний фільтр і промивають фільтр розчином амоніаку (1:10) до тих пір, доки колба не наповниться майже до риски. Далі розчин у колбі доводять дистильованою водою до мітки, перемішують. У розчині знаходиться комплексна сполука Феруму з сульфосаліциловою кислотою. Отриманий розчин спектрофотометрують (колориметрують) світлофільтром при довжині хвилі 440 нм порівнюючи з водою. На основі отриманого значення оптичної густини за калібрувальним графіком визначають вміст Феруму в пробі і перераховують його вміст в м'язах, в мг.

У мірні колби на 100 см<sup>3</sup> вносять послідовно 1, 2, 3, 5, 7, 10 см<sup>3</sup> стандартного розчину залізо-амонійного галуни NH<sub>4</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, що містить 0,2 мг Fe<sup>3+</sup> в 1 см<sup>3</sup> розчину. Потім у кожну колбу додають 10 см<sup>3</sup> фосфатно-оксалатно-сульфосаліцилового реактиву, 6 см<sup>3</sup> концентрованого розчину амоніаку, доводять дистильованою водою до мітки і вимірюють оптичну густину як і в попередньому досліді. Будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис вміст Fe<sup>3+</sup> в пробі, а на осі ординат – оптичну густину розчину.

Чутливість методу – 1,5–15 мкг/см<sup>3</sup> Fe<sup>3+</sup>.

#### **4.2. Визначення Магнію**

Осади магній-амоній фосфату і кальцій оксалату, що знаходяться на фільтрі, промивають розчином амоніаку (1:10) до тих пір, доки у фільтраті не будуть виявлятися йони Cl<sup>-</sup>. Для перевірки на повноту промивання збирають у пробірку 5 см<sup>3</sup> фільтрату, підкислюють нітратною кислотою і додають 1 краплину аргентум нітрату (ω=1%). При цьому фільтрат не повинен помутніти. Після цього фільтр з осадом виймають із лійки, розривають на частини, поміщають у конічну колбу, в якій проводилось осадження, і сушать до повного видалення вологи і амоніаку. Потім у колбу вносять 20 см<sup>3</sup> дистильованої води, 20 см<sup>3</sup> титрованого розчину сульфатної кислоти (с(1/2)=0,1 моль/дм<sup>3</sup>) і нагрівають до кипіння, перемішуючи і розминаючи крупинки осаду скляною паличкою. Після охолодження паличку виймають, ополіскують її водою, вносять у колбу дві краплини розчину змішаного

індикатора і надлишок сульфатної кислоти титрують розчином натрій гідроксиду ( $c=0,1$  моль/дм<sup>3</sup>) до синього забарвлення розчину. Окремо титрують 20 см<sup>3</sup> розчину сульфатної кислоти ( $c(1/2)=0,1$  моль/дм<sup>3</sup>) розчином натрій гідроксиду ( $c=0,1$  моль/дм<sup>3</sup>) і визначають об'єм розчину лугу, що було затрачено на титрування даного об'єму сульфатної кислоти. Із отриманих даних розраховують вміст Mg<sup>2+</sup> в досліджуваному матеріалі за формулою:

$$X = \frac{M \cdot C \cdot (V_1 - V_2) \cdot 100}{m}$$

де  $X$  – вміст Mg<sup>2+</sup> у досліджуваному об'єкті, мг %

$C$  – молярна концентрація еквівалента розчину NaOH, моль/дм<sup>3</sup>;

$V_1$  – об'єм розчину NaOH ( $c = 0,1$  моль/дм<sup>3</sup>), витрачений на титрування 20 см<sup>3</sup> розчину H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ( $c(1/2) = 0,1$  моль/дм<sup>3</sup>), см<sup>3</sup>;

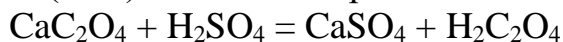
$V_2$  – об'єм розчину NaOH ( $c=0,1$  моль/дм<sup>3</sup>), витрачений на титрування сульфатної кислоти, що залишилась в досліджуваному розчині після взаємодії з MgNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub>, см<sup>3</sup>;

$m$  – маса досліджуваної тканини риби, г;

$M$  – молярна маса еквіваленту Mg<sup>2+</sup> – 12,15 г/моль.

#### 4.3. Визначення Кальцію:

Після визначення Mg<sup>2+</sup> в той же розчин, який титрували, вносять ще 5 см<sup>3</sup> сульфатної кислоти (1:9) для повного розчинення CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>:



Розчин нагрівають до 70-75<sup>0</sup> С і відтитровують оксалатну кислоту розчином калій перманганату ( $c(1/5)=0,05$  моль/дм<sup>3</sup>) із мікробюретки до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 10 секунд.

Вміст Ca<sup>2+</sup> у досліджуваному матеріалі розраховують за формулою:

$$X = \frac{M \cdot C \cdot V \cdot 100}{m}$$

де  $X$  - вміст Ca<sup>2+</sup> в досліджуваному матеріалі, %;

$C$  – молярна концентрація еквіваленту розчину KMnO<sub>4</sub>, моль/дм<sup>3</sup>;

$V$  – об'єм титрованого розчину KMnO<sub>4</sub>, затрачений на титрування оксалатної кислоти, см<sup>3</sup>.

### Контрольні запитання та завдання

1. Охарактеризуйте роль Магнію в живих системах. Джерела поповнення магній-йонами.
2. Наведіть приклади хімічних реакцій для якісного визначення йонів Fe<sup>3+</sup>. Суть методики аналізу, що запропонована в роботі.
3. Приведіть способи якісного і кількісного визначення Ca<sup>2+</sup>.
4. Опишіть методику комплексонометричного визначення Ca<sup>2+</sup> та Mg<sup>2+</sup> за спільної присутності їх у аналізованій системі.