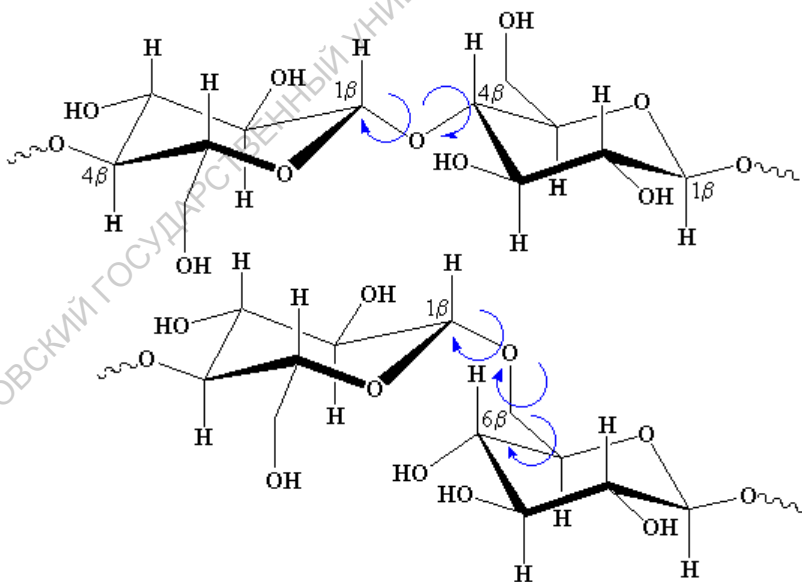


ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный
университет имени Н.Г. Чернышевского»

А.Б. Шиповская

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ



УДК 547.458:[54.05+ 54.058](075.8)
ББК 24.73я73
Ш 69

Шиповская А.Б.

Ш 69 Методы выделения и физико-химические свойства природных полисахаридов: Учебно-методич. пособие. – Саратов: Саратовск. госуниверситет, 2015. – 64 с.: ил.

В пособии приведена классификация и номенклатура природных полисахаридов. Рассмотрены общие методы выделения и очистки: экстракция, фракционное осаждение, ультрафильтрация, диализ, электрофорез, ионообменная хроматография, гель-фильтрация, ультрацентрифугирование, ферментативная очистка. Описаны основные физико-химические свойства, при этом сделан акцент на оптической активности природных полисахаридов.

В практической части приведены лабораторные работы, описывающие экспериментальные методики определения фракционного состава полисахаридсодержащего сырья, выделения полисахаридов из растительного и животного сырья, изучения оптической активности растворов полисахаридов.

Учебно-методическое пособие рекомендовано учебно-методической комиссией Института химии Саратовского государственного университета для бакалавров, магистрантов и аспирантов, обучающихся по направлению подготовки «Химия»

Саратов 2015

ВВЕДЕНИЕ

Среди большого многообразия соединений природного происхождения особое место занимают углеводы и их производные. Они построены, в основном, из атомов С, Н, О и составляют основную массу органических веществ на Земле.

Углеводы делятся на три больших класса: моносахариды, олигосахариды и полисахариды. Природные полисахариды – высокомолекулярные углеводы (продукты биосинтеза моносахаридов), макромолекулы которых построены из моносахаридных звеньев, связанных друг с другом гликозидными (ацетальными) связями.

Разнообразие структур макромолекул полисахаридов настолько велико, что даже простое их перечисление представляет сложную задачу. Они выполняют в живых организмах четыре важнейших типа биологических функций, выступая в роли энергетического резерва, структурных компонентов клеток и тканей, защитных веществ, а также специфических молекул–маркеров.

Структурные полисахариды (целлюлоза, арабиногалактаны, хитин, пектины, альгинаты, каррагинаны, хондроитинсульфаты, полиуроновые кислоты и др.) придают клеткам, органам и целым организмам механическую прочность. Нерастворимые в воде структурные полисахариды образуют волокнистые структуры и служат армирующим материалом клеточной стенки, водорастворимые – предохраняют клетки и ткани от высыхания. Гелеобразующие водорастворимые полисахариды обеспечивают эластичность клеточных стенок (выстилают трущиеся поверхности: кости в суставах, стенки кровеносных сосудов и т.п.) и адгезию клеток в тканях.

Резервные полисахариды (амилоза, амилопектин, гликоген, декстран, ксантан, гепарин и др.) являются энергетическим ресурсом и накапливаются в клетках в больших количествах. При их распаде образуются низкомолекулярные углеводы (моно-, ди- и олигосахариды), обеспечивающие организм энергией (так называемое «клеточное топливо»), регулирующие процессы иммунитета и др.

Защитную функцию полисахариды проявляют в ответ на повреждение тканей, образуя защитную капсулу или модифицируя свойства среды обитания клеток. К защитным полисахаридам относят

камеди и слизи (смесь полисахаридов сложного состава и строения) растений, животных и микроорганизмов.

Особое значение имеет специфическая функция полисахаридов – участие в образовании комплексных макромолекул, а именно гликопротеинов и гликолипидов. Так гликопротеины служат маркерами в процессах узнавания молекулами и клетками друг друга, определяют антигенную специфичность, обуславливают различия групп крови, выполняют рецепторную, каталитическую и др. функции.

Большинство полисахаридов обладает многоплановой физиологической активностью и относится к группе так называемых модификаторов биологического ответа – иммуномодуляторов. Иммуномодуляторы подразделяют на три группы иммунологически активных соединений: иммуностимуляторы, обуславливающие усиление иммунного ответа; иммуoadъюванты, усиливающие действие иммуногенов, антигенов и вакцин на иммунную систему человека и животных; а также иммунодепрессанты, обеспечивающие подавление иммунного ответа. Иммуномодуляторы находят широкое применение в лечении самых различных заболеваний, включая онкозаболевания (полисахариды фукоидан, лентинан, склероглюкан).

Области применения полисахаридов и их производных весьма разнообразны. Производство многих из них (целлюлоза и ее производные, крахмал, хитин-хитозан, альгиновые кислоты, пектины, агар и др.) является крупнотоннажным. Полисахариды используют для формирования волокон и пленок, получения разнообразных композиционных материалов, в том числе медико-биологического назначения (сорбентов и флокулянтов биологически активных веществ, трансурановых элементов и тяжелых металлов; трансдермальных систем и др.). Применяют в бродильной, пищевой, косметической, фармацевтической промышленности (вспомогательные материалы для создания различных лекарственных форм, покрытия таблеток, оболочки микрокапсул). Физиологически активные полисахариды используют в биотехнологии и медицине в качестве биоразлагаемых пластиков и шовных материалов, носителей лекарственных средств и т.д., а в последние годы – в качестве фармацевтических препаратов. Полисахариды как растительного, так и животного происхождения обладают антибиотической, противовирусной, противоопухолевой, противоядной, антилипемической, антисклеротической и др. активностью.

1. КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Согласно общей классификации полимеров (рис.1) полисахариды относятся к классу природных органических высокомолекулярных соединений.

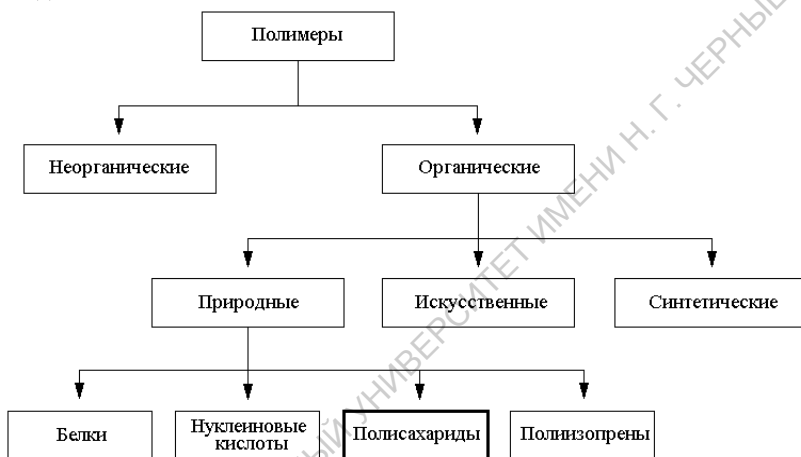


Рис.1. Классификация высокомолекулярных соединений (полимеров).

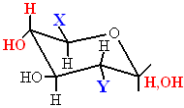
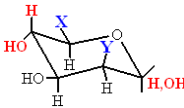
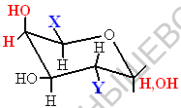
Основные группы моносахаридных компонентов, из которых построены макромолекулы полисахаридов, приведены в таблице 1. В составе природных полисахаридов обнаружено свыше 20 различных моносахаридов, наиболее распространенными из которых являются гексозы (глюкоза, галактоза, манноза, фруктоза) и пентозы (ксилоза и арабиноза). Часто встречаются также дезоксисахара (рамноза, фукоза), аminosахара (глюкозамин, галактозамин), уроновые кислоты (глюкуроновая, галактуроновая, маннуроновая, идуроновая).

Большая часть моносахаридных компонентов, входящих в состав макроцепей полисахаридов, в соответствии с конфигурацией их циклической формы делится на три группы альдогексоз: *D*-глюкозы, *D*-маннозы, *D*-галактозы и их производные (см. табл.1). Остальные известные типы альдогексоз и их производных в составе природных полисахаридов почти не встречаются. Что касается кетогексоз, то

наибольшее распространение имеют *D*-фруктозы (в табл.1 не приведены).

Таблица 1

Группы моносахаридных компонентов альдогексоз, входящих в состав макромолекул полисахаридов

Заместители в моносахаридном компоненте			
X = -CH ₂ OH Y = -OH	<i>D</i> -глюкоза	<i>D</i> -манноза	<i>D</i> -галактоза
X = -COOH Y = -OH	<i>D</i> -глюкуроновая кислота	<i>D</i> -маннуроновая кислота	<i>D</i> -галактуроновая кислота
X = -H Y = -OH	<i>D</i> -ксилоза	<i>D</i> -ликоза (не обнаружена)	<i>L</i> -арабиноза
X = -CH ₂ OH Y = -NH-CO-CH ₃	<i>N</i> -ацетил- <i>D</i> -глюкозамин	<i>N</i> -ацетил- <i>D</i> -маннозамин	<i>N</i> -ацетил- <i>D</i> -галактозамин
X = -CH(OH)-CH ₂ OH Y = -OH	<i>D</i> -глицеро- и <i>L</i> -глицеро- <i>D</i> -глюкогептоза	<i>L</i> -глицеро- <i>D</i> -манногептоза, <i>D</i> -глицеро- <i>D</i> -манногептоза	<i>D</i> -глицеро- <i>D</i> -галактогептоза

Важной характеристикой строения макромолекулярной цепи природных полисахаридов является конфигурация гликозидной связи. В зависимости от конфигурации полуацетального гидроксильного остатка моносахарида связи между элементарными звеньями могут быть α - или β -гликозидными. При β -гликозидной связи конфигурация асимметричных углеродных атомов в двух соседних мономерных звеньях (пиранозных или фуранозных) имеет противоположную пространственную ориентацию, а при α -конфигурации – наоборот.

Классификация полисахаридов по химическому составу макромолекулы

В зависимости от моносахаридного состава полисахариды делят на две группы: гомо- и гетерополисахариды.

Гомополисахариды – полимеры, состоящие из остатков только одного типа моносахарида. Например, из звеньев остатков глюкозы построены целлюлоза, крахмал, гликоген, декстран, ламинаран, из остатков маннозы – маннаны, галактозы – галактаны, фруктозы – фруктаны. Типы гликозидных связей между звеньями остатков моносахаридов могут быть как одинаковыми, так различными.

Гетерополисахариды – полимеры, в состав которых входят звенья остатков двух и более различных моносахаридов. Например, из звеньев остатков глюкозы и маннозы построен глюкоманнан, галактозы и маннозы – галактоманнан, арабинозы и галактозы – арабиногалактан, рамнозы и галактуроновой кислоты – пектины. Из двух и более типов моносахаридных звеньев построены макромолекулы камедей и слизей. Таким образом, гетерополисахариды являются сополимерами, характеризующимися как нерегулярным, так регулярным распределением различного типа мономерных звеньев в составе макромолекулы. Некоторые гетерополисахариды имеют блочное строение.

Классификация полисахаридов по конфигурации макроцепи

Макромолекулы природных полисахаридов могут иметь линейную, разветвленную и сверхразветвленную конфигурацию (рис.2).

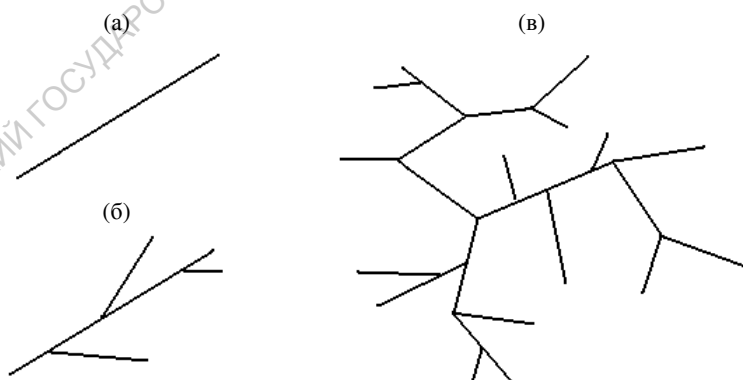


Рис.2. Конфигурация макромолекул полисахаридов: линейная (а), разветвленная (б) и сверхразветвленная (в).

Систематическая номенклатура полисахаридов

Систематическая номенклатура полисахаридов (по аналогии с систематической номенклатурой органических полимеров) предусматривает указание в названии на составные компоненты полимерной цепи. Например, названия гомополисахаридов слагаются из названий входящих в их состав звеньев остатков редуцирующих моносахаридов, в которых суффикс -оза меняется на суффикс -ан (маннан, арабан и т.д.). Гетерополисахарид, в основной цепи которого присутствуют звенья остатков маннозы и глюкозы, называют глюкоманнаном. Разветвленный гетерополисахарид, в основной цепи которого присутствуют звенья остатков глюкозы, а в боковой – остатков маннозы, называют манноглюканом, а в случае обратного распределения моноз – глюкоманнаном.

Тривиальная номенклатура полисахаридов

Систематическая номенклатура применяется сравнительно редко, так как полисахариды различных природных источников, построенные из остатков одного и того же моносахарида, могут быть идентичны по химическому составу мономерного звена, но иметь при этом уникальные структуру, свойства и биологические функции. Например, некоторые микробные полисахариды, макромолекулы которых построены из остатков глюкозы (пуллулан) идентичны по химическому составу полисахаридам растений (амилоза, амилопектин) или животных (гликоген), но имеют при этом пространственную структуру, специфичную только для конкретного вида.

В связи с этим многие полисахариды имеют общепринятые тривиальные названия. Наименование одних происходит от названия ферментов, расщепляющих гликозидные связи макромолекул данного полисахарида (например, амилоза – амилазы, целлюлоза – целлюлазы, инулин – инулазы и др.). Другие названы по преимущественной локализации в природном объекте (гепарин – печень (*hyper*), хондроитинсульфаты – клетки *hondrocyte*, ламинаран – водоросли *Laminaria* и др.). Иногда полисахариды называют по наименованию продуцента, сохраняя суффикс -ан, например ксантан (продуцент – микроорганизмы вида *Xanthomonas Campestris*).

2. ОБЩИЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Природные полисахариды присутствуют в составе растительных и животных тканей в виде сложно-построенных систем. Классические методы выделения и очистки низкомолекулярных органических соединений, такие как осаждение осадителями, перекристаллизация, перегонка и т.д., для выделения полисахаридов не применимы. При перегонке макромолекулы разрушаются, а при осаждении могут изменять конфигурацию, даже если процесс проводят в сравнительно мягких условиях (комнатной температуре, нормальном атмосферном давлении). Разрушение и деструкция макромолекулярных структур происходит даже при измельчении или размалывании исходного сырья.

Хотя методы выделения полисахаридов из природного сырья чрезвычайно разнообразны, и невозможно описать стандартную процедуру, существует ряд общих требований и подходов.

Выбранный способ выделения должен удовлетворять двум основным требованиям. Во-первых, процесс должен быть максимально эффективным, сопровождаться незначительными потерями на всех этапах получения. Во-вторых, в процессе выделения полисахарид должен подвергаться возможно меньшим изменениям. При этом необходимо учитывать как деструкцию под действием применяемых химических реагентов, так и возможное воздействие ферментов, присутствующих в источнике.

При выделении природных полисахаридов необходимо решать три задачи различной степени сложности: наиболее простая – отделение низкомолекулярных веществ; отделение биополимеров неуглеводной природы; наиболее сложная – разделение смесей полисахаридов. Эти три задачи редко являются последовательными этапами выделения. Чаще применяемый метод выделения позволяет решить сразу две, а иногда и все три задачи.

Рассмотрим методы и приемы, используемые обычно при выделении полисахаридов и разделении их смесей.

2.1. Фракционное осаждение и экстракция

Эти методы применяются для выделения и очистки практически всех природных полисахаридов.

Экстракция является первоначальной стадией почти каждого процесса выделения. Экстракция используется для:

– растворения полисахарида и ряда сопутствующих веществ (многочисленные примеси остаются нерастворенными в исходном сырье);

– удаления сопутствующих веществ (извлекаемый полисахарид представляет собой остаток после экстракции).

Последним способом получают, например, целлюлозу из растительного материала и хитин из панцирей ракообразных.

Растворителем, применяемым для экстракции выделяемого полисахарида прямым растворением, в подавляющем большинстве случаев является вода. Повышение растворимости может быть достигнуто повышением температуры, изменением pH среды. Так, многие кислые полисахариды (т.е. имеющие в составе макромолекулы кислотные функциональные группы), находящиеся в природном сырье в солевой форме, хорошо растворяются в разбавленных минеральных кислотах. Растворимость нейтральных полисахаридов, наоборот, повышается в щелочной среде. Иногда при экстракции полисахаридов используют растворы солей, например растворы тиоцианата лития, или растворы комплексообразователей, например солей борной кислоты. В специальных случаях полисахариды извлекают другими растворителями – водным спиртом, диметилсульфоксидом, диметилформамидом. С помощью этих растворителей часто удается избирательно экстрагировать полисахариды со сравнительно невысокой молекулярной массой или с большим количеством малополярных заместителей, например ацетатных групп.

Экстракция полисахарида сопровождается растворением полярных низкомолекулярных соединений – неорганических солей, сахаров, гликозидов, а также ряда белков, нуклеиновых кислот и т.д. Поэтому дальнейшая обработка экстракта проводится с целью удаления этих сопутствующих веществ.

Осаждение. Некоторые полисахариды растворимы в горячей воде значительно лучше, чем в холодной, и их отделяют после охлаждения экстрактов. Дальнейшая очистка таких полисахаридов аналогична перекристаллизации.

Другим приемом выделения полисахаридов из водных растворов является осаждение смешивающимся с водой органическим растворителем, например этиловым спиртом. В 80%-ном спирте растворимы многие низкомолекулярные вещества, экстрагируемые из биологических объектов вместе с полисахаридами, например, моно- и олигосахариды. Полисахариды при такой концентрации спирта, как правило, выпадают в осадок. В качестве осадителей применяют также метанол, ацетон, уксусную кислоту и некоторые другие.

Простое осаждение не приводит к разделению смесей полисахаридов. Чтобы отделить полисахариды друг от друга, проводят **фракционное осаждение**, т.е. получают серию фракций осаждаемых веществ, соответствующих разным концентрациям осадителя в растворе, и исследуют их состав или свойства.

При фракционном осаждении полисахаридов используются следующие осадители: неорганические соли (соли аммония, кальция, бария, калия, рубидия, цезия), кислоты, щелочи, органические спирты (этанол, *n*-бутанол), кетоны (ацетон) и др. Осадитель медленно добавляют в разбавленный раствор полимера при перемешивании. При недостаточной степени очистки проводят повторное растворение полисахарида и переосаждение.

Так, кислые полисахариды могут быть выделены из растворов и отделены от нейтральных полисахаридов в виде нерастворимых солей. Например, для осаждения альгиновой и пектовой кислот используют кальциевые или бариевые соли. Аналогичным приемом разделяют на компоненты каррагинан – сульфатированный полисахарид красных водорослей. Соли аммония, калия, рубидия и цезия избирательно осаждают χ -каррагинан, в то время как λ -каррагинан остается в растворе.

Вместо фракционного осаждения можно использовать также обратный прием – фракционное растворение осадка.

Для осаждения и фракционирования полисахаридов используют также низко- и высокомолекулярные комплексообразователи. Вот несколько примеров. Осаждение амилозы в виде комплекса с *n*-бутанолом – обычный прием разделения крахмала на амилозу и амилопектин. Конканавалин-А (белок) осаждаёт гликоген и некоторые другие высоковетвленные полисахариды.

Наконец, для разделения смесей полисахаридов часто применяется фракционное осаждение их производных, например, полностью ацелированных или метилированных эфиров. В качестве растворителей в этом случае используют ацетон, хлороформ, осадителей – эфир, петролейный эфир. Исходные полисахариды получают после разделения смесей ацетатов (ацелированных производных) омылением ацетатных групп под действием щелочи. Аналогично ацетатам фракционируют метилированные полисахариды.

2.2. Фильтрация, ультрафильтрация, диализ

Фильтрация – механическое просеивание раствора полисахарида через фильтр для удаления грубодисперсных частиц (размером более ~1 мк). Для фильтрации используют бумажную

ткань, фильтровальную бумагу, стеклянную вату, туфовые стеклянные фильтры.

Первичные экстракты полисахаридов, как правило, загрязнены неуглеводными примесями: неорганическими солями, белком и др. Для их удаления применяют ультрафильтрацию, диализ и аналогичные методы.

Ультрафильтрация – фильтрация растворов через полупроницаемые мембраны с известной величиной пор (0.01-1 мк). Традиционными материалами для ультрафильтрации являются целлофан и нитроцеллюлоза. Пример промышленного аппарата для ультрафильтрации приведен на рис.3.



Рис.3. Аппарат для ультрафильтрации (поставляется фирмой Amicon Inc, Beverly, MA). Под давлением азота из баллона раствор полисахарида фильтруется через мембрану. Небольшие молекулы проходят через мембрану и собираются на выходе. Крупные молекулы остаются в камере.

Ультрафильтрация позволяет удалить низкомолекулярные примеси, сконцентрировать раствор полимера, а в отдельных случаях получить фракции полисахаридов, различающиеся молекулярной массой. Ультрафильтрация является исключительно эффективным способом подготовки образцов для дальнейших исследований, например, для последующей хроматографии.

Диализ применяется для отделения низкомолекулярных примесей: электролитов (ионов натрия, сульфата, аммония, хлорида и др.) и низкомолекулярных неэлектролитов (сахара, мочевины, спирта и др.). Для изготовления диализных полупроницаемых мембран используют целлофан. Растворы полисахаридов, требующие очистки,

помещают в целлофановые сосуды, которые погружают в воду. При этом низкомолекулярные примеси диффундируют через поры целлофановой мембраны в водную среду. Процесс диффузии ускоряется при перемешивании диализуемого раствора и диализе против проточной воды. Для удаления катионов из растворов кислых полисахаридов диализ проводят в подкисленных растворах.

Для быстрого удаления электролитов может быть применен **электродиализ**, при котором диффузия ионов ускоряется под действием электрического поля (рис.4).

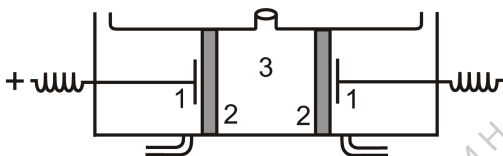


Рис.4. Электродиализер: электроды (1); мембрана (2); отделение, содержащее очищаемый раствор полисахарида (3).

Постоянный ток пропускают через раствор полисахарида, отделенный от воды полупроницаемой мембраной.

2.3. Ферментативная очистка

Высокомолекулярные примеси, неудаляемые диализом, обычно осаждаются впоследствии вместе с выделяемым полисахаридом. В ряде случаев можно провести их предварительное разрушение действием соответствующих ферментов. Так, для отделения белка широко применяют протеолиз. Удаление нуклеиновых кислот достигают обработкой соответствующими нуклеазами. Многочисленные препараты полисахаридов очищают от примесей крахмала или гликогена действием амилаз. Однако при ферментативных воздействиях всегда приходится учитывать, что препарат фермента может обладать неизвестной активностью, способной изменить структуру и, соответственно, свойства выделяемого полисахарида. Удаление белка после ферментативной обработки достигается обычно одним из методов денатурирования. К ним относятся нагревание, обработка щелочью, хлороформом с амиловым спиртом, трифтортрихлорэтаном, трихлоруксусной или фосфовольфрамовой кислотой и др. Можно использовать также избирательную сорбцию белков на геле фосфата кальция, бентоните или каолине. Эти же методы, конечно, могут применяться и для удаления неферментных белков, загрязняющих растворы полисахаридов.

2.4. Хроматографические методы

Современная химия, и в первую очередь химия природных соединений, обязана своими достижениями прежде всего применению хроматографических методов разделения. Однако хроматография полимеров представляет собой специфическую область, развитие которой связано с определенными трудностями. С одной стороны, даже молекулы однородного полимера, различающиеся молекулярной массой, могут обладать разной хроматографической подвижностью. С другой стороны, различие в растворимости или способности сорбироваться на используемом носителе между разными полимерами может быть недостаточным для хроматографического разделения.

Поэтому до настоящего времени не нашли широкого распространения в области полисахаридов такие виды хроматографии, как распределительная, адсорбционная и аффинная. Более успешным оказалось применение ионообменной и размерно-эксклюзионной (гель фильтрация) хроматографии.

Ионообменная хроматография. Вследствие своей превосходной разрешающей способности ионообменная хроматография является, пожалуй, наиболее важным типом хроматографических методов выделения и очистки препаратов природных полисахаридов.

В ионообменной хроматографии неподвижная твердая фаза обычно состоит из сорбента («смоль») с ковалентно связанными анионами или катионами. Противоположно заряженные ионы растворенного вещества в жидкой подвижной фазе электростатическими силами притягиваются к ионам сорбента. Адсорбированные компоненты образца затем элюируют с применением растворов солей или буферных растворов разной концентрации, которые постепенно десорбируют молекулы образца в порядке увеличения электростатического взаимодействия с ионами в колонке.

На рис.5 приведен пример проведения ионообменной хроматографии. На *а-в* проиллюстрирован процесс загрузки колонки: подвижные анионы (или катионы) удерживаются около катионов (или анионов), которые ковалентно присоединены к сорбенту (неподвижная фаза); на *г-е* показан процесс элюции колонки солевым градиентом: ионы соли ослабляют электростатическое взаимодействие между ионами образца и ионами сорбента (молекулы образца с различными электростатическими свойствами элюируются при различных концентрациях соли); на *ж* показано взаимодействие молекул образца с ионами, присоединенными к сорбенту: при определенном рН и низкой концентрации соли большинство биомолекул трех типов, подлежащих разделению в данном примере, связываются обратимо с ионами подвижной фазы.

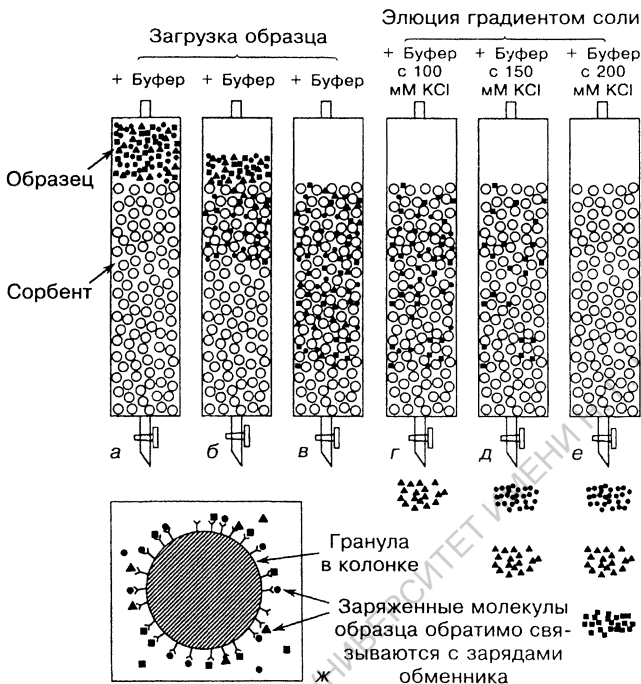
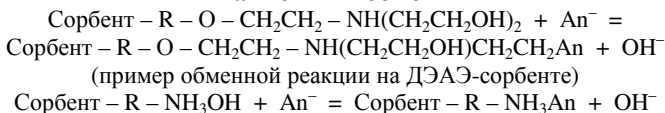


Рис.5. Пример ионообменной хроматографии.

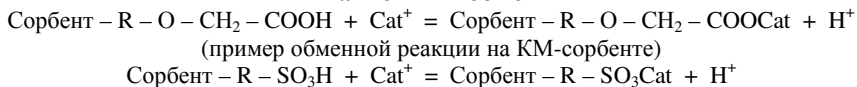
Наиболее часто используемым анионообменником является диэтиламиноэтил (ДЭАЭ, $pK_a = 9.5$), катионообменником – карбоксиметил (КМ, $pK_a = 4.0$). Положительные заряды ДЭАЭ-сорбента (например, ДЭАЭ-целлюлозы) притягивают отрицательно заряженные макромолекулы, КМ-сорбента – положительно заряженные макромолекулы.

Ниже приведены примеры обменных реакций, протекающих на активных участках ионообменной смолы:

анионный обмен



катионный обмен



Методом ионообменной хроматографии с применением анионообменной смолы разделяют смеси кислых и нейтральных полисахаридов, например, пектиновую кислоту от сопутствующего арабинана или сульфированные полисахариды водорослей от крахмалоподобных примесей. В ряде случаев при таком способе разделения удается освободиться от примесей белка. Нейтральные полисахариды можно также разделить, используя ДЭАЭ-целлюлозу в боратной форме и при вымывании боратным буфером.

Адсорбирующая способность сорбента зависит от pH и рI разделяемых растворов (табл. 2), качества сорбента, прикладываемого давления и от числа прогонов колонки. Для увеличения срока службы сорбента, его следует тщательно промывать, хранить в подходящем растворителе и не применять pH и давление вне предписанных допустимых пределов.

Таблица 2

Свойства некоторых ионообменников

Функциональная группа	Тип обменника	Интервал pH
$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{N}^+ \\ \diagdown \end{array} \text{— CH}_3$	Четвертичный амин (сильный анион)	1-11
— NH_2	Первичный амин (слабый анион)	1-8
$\begin{array}{c} \diagdown \\ \text{NH} \\ \diagup \end{array}$	Вторичный амин (слабый анион)	1-7
$\begin{array}{c} \diagdown \\ \text{N} \\ \diagup \end{array}$	Третичный амин (слабый анион)	1-6
— COO^-	Угольная кислота (слабый катион)	6-14
— SO_3^-	Сульфокислота (сильный катион)	1-14

Разрешающая способность хроматографического разделения и очистки зависит преимущественно от типа исследуемых макромолекулярных систем, типа и качества сорбента, ионной силы солевого градиента при элюции, температуры и геометрии колонки.

Типичная установка ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖК) приведена на рис.6.

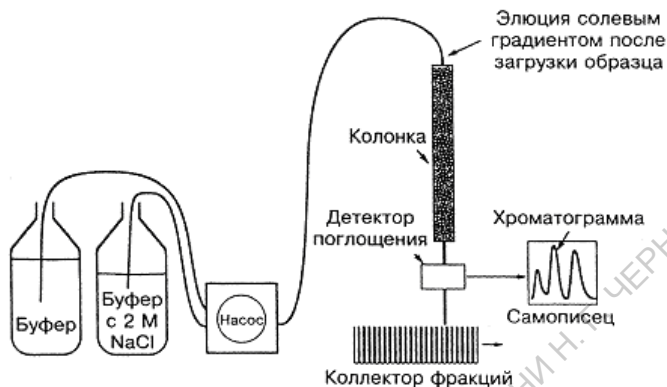


Рис.6. Типичная установка ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖК) для очистки полисахаридов. После загрузки образца (с помощью шприца) насос создает солевой градиент для элюции очищенного образца полимера.

Экспериментальная установка обычно состоит из бутылки с буферным раствором, бутылки с раствором соли в буферном растворе, программируемой помпы (перистальтического насоса), детектора поглощения, самописца и коллектора фракций. Если условия для очистки неизвестны, то их подбирают, предварительно анализируя небольшие порции образца. При предварительных испытаниях необходимо иметь в виду, чтобы колонка не была перегружена, иначе это может сместить положение пиков и привести к значительным потерям анализируемого продукта.

Гель-фильтрация. Этот тип хроматографии является вариантом размерно-экслюзионной хроматографии (или молекулярной эксклюзионной хроматографии, т.е. основанной на исключении по размеру) и известен так же под названием гелепроникающей (молекулярно-ситовой) хроматографии. В ней отсутствует притяжение между неподвижной фазой (гелем) и растворенным веществом. При прохождении раствора образца сквозь пористый гель разделение молекул происходит по их размеру. Чем молекулы меньше, тем легче они проникают через поры внутрь гранул геля и поэтому дольше задерживаются там. Путь прохождения ими через колонку получается более длинным, чем у более крупных молекул. Крупные макромолекулы не могут проходить в поры геля и, соответственно, не

задерживаются в гранулах, а протекают между ними. Путь и время прохождения через колонку большими молекулами гораздо короче (рис.7).

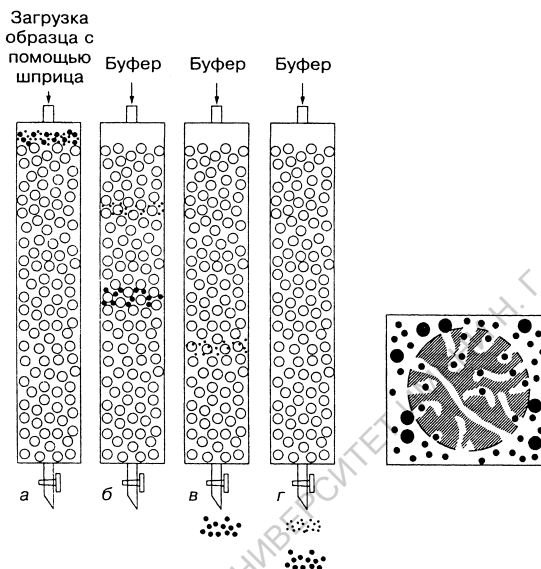


Рис.7. Гель-фильтрационная хроматография. Малые молекулы в образце могут проникать внутрь гранул, вследствие этого они протекают через колонку медленнее. Крупные молекулы, которые не могут проникнуть в гранулы через поры, проходят сквозь колонку быстрее, чем более мелкие. Правильный размер пор и свойства растворителя являются решающими для хорошего разделения.

Эффективность гель-фильтрации зависит от размера (длины и диаметра) колонки. Слишком длинные колонки не улучшают очистку образца, а вызывают его разбавление. В колонках оптимальной длины, но слишком большого диаметра так же может проходить значительное разбавление образца. В колонках большого диаметра возможна контаминация продуктов вследствие неоднородной загрузки исходного раствора.

Наиболее широкое распространение имеет гель-фильтрация на сефадексах. Сефадекс представляет собой полусинтетический сорбент полисахаридной природы, гранулы которого обладают порами определенного размера, так что диффузия внутрь этих гранул возможна только для молекул, величина которых не превышает

величину пор. Поэтому сефадекс работает как своего рода «молекулярное сито», задерживающее проникающие внутрь гранул низкомолекулярные вещества и не задерживающее полимеры. Существует набор сефадексов, различающихся величиной пор.

Перспективно использование сефадексов для разделения высоко- и низкомолекулярных осколков, образующихся при расщеплении макромолекул различными реагентами, а также для выделения полисахаридов из различных природных источников. Хроматография на модифицированных сефадексах, обладающих ионообменными свойствами, например на ДЭАЭ-сефадексе, может служить эффективным приемом фракционирования полисахаридов.

Гель фильтрационная хроматография является так же вспомогательным методом оценки молекулярной массы молекул (рис.8).

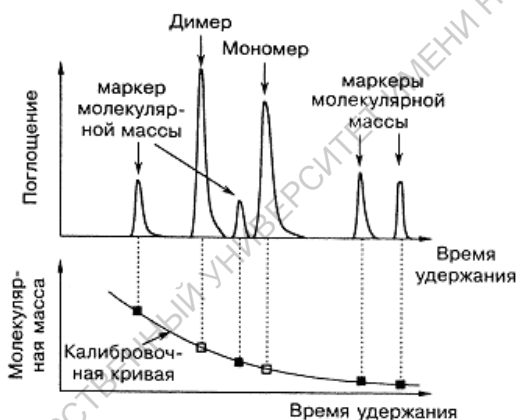


Рис.8. Использование гель-фильтрации для определения молекулярной массы молекул. Молекулы с известной молекулярной массой дают возможность оценить молекулярную массу неизвестной молекулы. В данном примере для исследуемой молекулы наблюдаются два пика, что указывает на равновесие мономер-димер.

Несмотря на то, что для определения молекулярной массы полимеров существуют гораздо более точные методы, например масс-спектропия, гель-фильтрация оказывается чрезвычайно информативной для определения молекулярной массы и молекулярно-массового распределения олиго- и полисахаридов, а также полезной для измерения равновесий мономер-димер при микромолекулярных (мкМ) концентрациях биомолекул.

2.5. Электрофорез

Электрофорез является важным методом разделения смесей полисахаридов, хотя широкому его использованию препятствует трудность подбора условий эффективного разделения.

Для анализа смесей кислых полисахаридов применяется электрофорез в аппарате Тизелиуса. Таким путем, например, отделяют сульфатированные полисахариды водорослей от полиуронидов. Разделение нейтральных полисахаридов проводят в боратном буфере в условиях, при которых полисахариды различаются способностью образовывать комплексы с борной кислотой. Таким способом удалось отделить маннан от глюкана в водорастворимой фракции полисахаридов *Candida albicans*.

Боратный буфер используют и для электрофореза полисахаридов на бумаге. Однако в этом случае возникают трудности, связанные с обнаружением полисахаридов и их взаимодействием с целлюлозой. Для преодоления этих трудностей в качестве носителя может быть использована бумага из стекловолокна. В качестве электролита в данном случае используют 2 Н раствор едкого натра. Для обнаружения полисахаридов используют реактив Молиша или щелочной раствор перманганата калия. Данным методом была установлена гетерогенность многих препаратов полисахаридов, например, ряда галакто- и глюкоманнанов, пентозанов. Препаративный вариант этого метода был успешно использован при выделении сложного гетерополисахарида из одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa*.

2.6. Ультрацентрифугирование

Как и электрофорез, ультрацентрифугирование сравнительно редко используется для препаративного выделения индивидуальных полисахаридов.

Наиболее часто используют аналитический вариант ультрацентрифугирования. Седиментационная кривая для смеси полимеров в общем случае представляет собой серию пиков, каждый из которых соответствует концентрационному скачку в центрифужной ячейке, т. е. границе оседания присутствующего вещества. По числу пиков судят о числе компонентов исследуемой смеси. В случае одного пика его несимметричность может указывать на наличие примесей; ширина пика определяется степенью полидисперсности вещества. Данные ультрацентрифугирования могут использоваться не только для оценки гомогенности исследуемого препарата, но и для определения молекулярной массы полимера.

2.7. Критерии индивидуальности и нативности полисахарида

При выборе оптимальных условий для выделения полисахарида необходимо учитывать лабильность макромолекул, содержащих гликозидные связи фураноз, 3,6-ангидрогексоз и др., в кислых средах, а содержащих сложноэфирные группировки, гликозиды β -окси- α -аминокислот, восстанавливающие концевые моносахариды с заместителем в положении C₃ и др., в щелочных средах. В щелочной среде может также происходить деструкция макроцепи вследствие окисления кислородом воздуха. Расщепление химических связей возможно и при некоторых методах очистки, связанных с превращением полисахаридов в их производные.

Реальную опасность при выделении полисахаридов представляет деструкция под действием ферментов. Ферменты, содержащиеся в источнике, из которого выделяют полисахарид, обычно инактивируют нагреванием, кипячением с метанолом, замораживанием и т.п. Растворы полисахаридов могут служить средой для роста микроорганизмов, попадающих туда из воздуха лаборатории. Для предотвращения расщепления полисахаридов ферментами микроорганизмов к растворам прибавляют толуол, тимол или хранят их при низкой температуре.

Современные методы установления строения полисахаридов применимы лишь к индивидуальным веществам. Работа с неочищенными полисахаридными препаратами может привести к выводам о строении, весьма далеким от истины. В то же время не существует вполне строгих критериев индивидуальности выделенного полисахарида, так же как нет употребительных для всех случаев методов контроля за процессом выделения. Полисахарид обычно считается индивидуальным, если не менее двух разных способов очистки не изменяют его мономерный состав и физико-химические свойства (например, удельное оптическое вращение растворов, среднее значение молекулярной массы), а общепринятые аналитические методы не выявляют наличия примесей (гомогенность по данным хроматографии, электрофореза, ультрацентрифугирования и др.).

Еще сложнее решить вопрос о нативности выделенного полисахарида. Только в случае биологически активных полисахаридов, например, обладающих антигенными, антибактериальными и др. свойствами, можно в какой-то мере контролировать нативность реакциями с соответствующими специфическими антисыворотками, бактериями и т.д.

Поэтому выделение остается одной из сложнейших проблем, специфичной для каждого полисахарида и каждого биологического источника.

3. ОПТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДОВ

Природные полисахариды относятся к классу **оптически активных полимеров**, т.е. обладают способностью поворачивать плоскость поляризации поляризованного света, проходящего через их растворы или прозрачные пленки.

Оптическая активность полисахаридов обусловлена наличием асимметричных (хиральных) структур в макромолекулах: асимметрично замещенных атомов углерода или участков макромолекул со спиральной конформацией. Первый тип структур локализован в элементарном звене макромолекулы (в основной цепи или в боковых ветвях) и характеризуются конфигурацией звеньев полимера – его первичной структурой. Второй тип связан со вторичной структурой макромолекулы – ее конформацией, которая зависит как от строения элементарного звена, так и от природы и силы межмолекулярных взаимодействий. При наличии обоих типов хиральных структур их вклады в оптическую активность полисахарида суммируются.

Чтобы понять смысл явления оптической активности вещества, кратко рассмотрим природу плоскополяризованного света и причины оптического вращения.

Электромагнитное излучение – это распространение электромагнитных волн. Векторы электрических и магнитных полей обычного луча света колеблются во всех направлениях во взаимно перпендикулярных плоскостях и перпендикулярно направлению распространения луча. В плоскополяризованном свете компонента электрического поля колеблется перпендикулярно направлению распространения луча, но колебания лежат в одной определенной плоскости. Магнитная компонента поля также колеблется только в одной плоскости, причем обе эти плоскости взаимно перпендикулярны. Таким образом, плоскополяризованный свет можно рассматривать как суперпозицию двух циркулярно поляризованных лучей, равных по амплитуде и одинаковых по фазе, но противоположных по направлению. Плоскость, перпендикулярная к плоскости электрических колебаний поляризованного луча (и также проходящая через луч), называется **плоскостью поляризации**. При прохождении через оптически активную среду циркулярно поляризованные лучи имеют разные скорости, что обусловлено

различием показателей преломления. Это в свою очередь вызывает появление разности фаз между этими двумя компонентами, и, соответственно, плоскость поляризации света при прохождении через оптически активную среду поворачивается.

Для наглядности рассмотрим рис.9. Пусть в луче плоскополяризованного света XY вектор электрического поля колеблется в плоскости ABCD. В точке O колебание направлено по линии ОК. Оптическая активность вещества заключается в том, что при пропускании через него плоско поляризованного луча в точке O вектор электрического поля повернется на угол α и займет положение ОК' в плоскости CEFD.

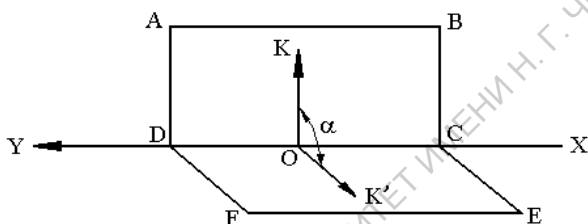


Рис.9. Схематическое изображение электрической компоненты плоско поляризованного света.

Величину отклонения плоскости поляризации от начального положения, выраженную в угловых градусах, называют углом вращения и обозначают греческой буквой α . Величина угла вращения зависит от природы оптически активного вещества, длины пути поляризованного света в оптически активной среде, длины волны света, температуры. Для растворов величина угла вращения зависит от природы растворителя и концентрации оптически активного вещества. Величина угла вращения прямо пропорциональна толщине слоя раствора оптически активного вещества.

Количественной мерой оптической активности полимера является значение **удельного оптического вращения** $[\alpha]$. Удельное оптическое вращение $[\alpha]$ раствора полимера определяют как угол поворота плоскости поляризации монохроматического света на пути в 1 дм, при условном приведении концентрации анализируемого вещества к значению, равному 1 г/мл:

$$[\alpha]_{D, \text{нм}}^{T, \text{°C}} = \frac{\alpha \cdot 100}{\ell \cdot C} \quad (1)$$

где α – измеряемый угол вращения (градусы), ℓ – толщина оптического пути (дм), C – концентрация раствора (г/100 мл).

Определение оптического вращения проводят, как правило, при температуре 20°C и длине волны линии D спектра натрия (589 нм).

Поскольку величина $[\alpha]$ зависит от природы растворителя (замена растворителя может привести к изменению не только величины $[\alpha]$, но и знака вращения) и концентрации вещества, приводя величину удельного вращения, надо указывать растворитель и концентрацию исследуемого раствора.

Величину оптической активности измеряют приборами, называемыми поляриметрами (рис.10). Существенными его частями являются поляризаторы (3, 4) и анализатор (6). Поляризатором и анализатором служат призмы Николя (николи), которые лучше всего пропускают свет, поляризованный в плоскости, перпендикулярной плоскости главного сечения призмы, и не пропускают свет, поляризованный в плоскости главного сечения. (Плоскость главного сечения проводят через оптическую ось кристалла и падающий луч; оптическая ось – любая ось, параллельная кристаллографической.)

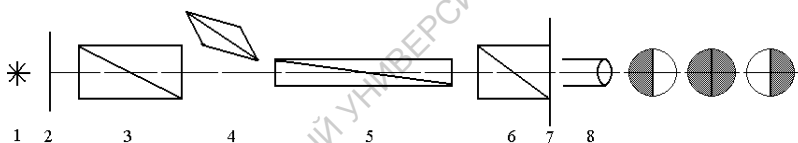


Рис.10. Схема поляриметра: 1 – источник света, 2 – светофильтр, 3 и 4 – поляризаторы, 5 – кювета с исследуемым веществом (раствором), 6 – анализатор, 7 – шкала, 8 – окуляр.

Если главные сечения в призмах поляризатора и анализатора установлены параллельно (николи параллельны), то свет, поляризованный поляризатором, пройдет через анализатор. Если главные сечения перпендикулярны (николи скрещены), то свет погасится анализатором. При других взаимных расположениях главных сечений интенсивность света меняется от нуля до максимума.

Обычно поляризатор составляют их двух призм Николя. Одна из них (рис.10, 3) покрывает все поле зрения, наблюдаемое через окуляр (8), а вторая (4) – его половину. Главное сечение этой призмы установлено под малым углом ($< 3^\circ$) по отношению к главному сечению большой призмы. Призма анализатора может вращаться вокруг оптической оси прибора. При ее вращении изменяется освещенность поля зрения.

Если установить главное сечение призмы анализатора перпендикулярно главному сечению большой призмы поляризатора, то половина поля (отвечающая скрещенным призмам) становится темной. Другая половина будет светлой, так как наличие малой призмы препятствует скрещению. Если вращать анализатор до затемнения противоположной стороны поля, то осветится первая половина. Можно добиться и промежуточной одинаковой освещенности обоих полей. В этом случае установку считают нулевой: небольшой поворот анализатора в ту или иную сторону образует в поле зрения полутень.

Если после установки нулевого положения поместить между поляризатором и анализатором кювету (рис.10, 5) с раствором оптически активного вещества, вращающим на угол α , то появится полутень. Чтобы вернуться к нулевому положению, следует повернуть анализатор на такой же угол α . Источник света (1) должен быть монохроматическим. При пользовании белым светом используют светофильтр (2).

Существуют и другие типы поляриметров: в них поле зрения состоит из трех частей. Устройство таких поляриметров принципиально не отличается от описанного выше.

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа №1. Получение и свойства полисахаридов животного происхождения

Цель работы: выделение хитина из панцирей ракообразных, проведение реакции полимераналогичного превращения хитин \rightarrow хитозан, определение молекулярной массы и степени ацетилирования хитозана, сравнительный анализ растворимости хитина и хитозана.

Сырье и реактивы: панцири речного рака, водные растворы соляной кислоты концентрации $C=0.1\text{ N}$, $C=2\%$ и $6-7\%$, раствор NaOH $C=0.03\text{ N}$, $C=6-7\%$ и 50% , дистиллированная вода, этиловый спирт $C=90\%$ и 95% , додецилсульфат натрия (ДДС-Na) $C=3-4\%$, водные растворы уксусной кислоты $C=0.33\text{ M}$ и 0.66 M , водный раствор уксуснокислого натрия $C=0.4\text{ M}$, диметилацетамид (ДМАА), диметилсульфоксид (ДМСО).

Приборы и посуда: весы аналитические, универсальный иономер ЭВ-74, вискозиметр Уббелоде ($d_k=0.56\text{ мм}$), мельница или керамическая ступка с керамическим пестиком, водяная баня, песчаная баня, электрическая плитка, термометр, магнитная мешалка, колбы на 50 мл (2 шт), колбы на 100 мл (2 шт), колбы на 250 мл (2 шт), колбы на 500 мл (2 шт), фарфоровый стакан на 250 мл , мерные цилиндры на 50 мл и 100 мл , фильтр Шотта №160, капроновая ткань, фильтровальная бумага, индикаторная бумага, стеклянная палочка, чашка Петри, 4 бюкса на 25 мл (или 50 мл), стеклянный стаканчик, бюретка, пробирки (8 шт).

Задание 1. Выделение хитина из панцирей речного рака.

Сырье и реактивы: панцири речного рака, водный раствор соляной кислоты $C=6-7\%$, раствор NaOH $C=6-7\%$, дистиллированная вода, этиловый спирт.

Методика работы

1.1 Пробоподготовка

Панцири речного рака механически очистить от загрязнений, промыть дистиллированной водой и высушить. Очищенное сырье измельчить механически: руками или керамическим пестиком в

керамической ступке до частиц размером не более 1-2 мм (не рекомендуется измельчать до порошкообразной формы).

1.2. Получение хитина

Работа выполняется в вытяжном шкафу.

Стадия деминерализации. Взвесить на аналитических весах 20 г исходного сырья (с точностью до 0.01 г), поместить в колбу на 500 мл и залить раствором соляной кислоты ($C=6-7\%$), соблюдая модуль ванны не менее 1:10 (из расчета на 1 г сырья – ~10 мл раствора реагента). Тщательно перемешать содержимое колбы стеклянной палочкой. Поместить колбу в водяную баню, предварительно нагретую до температуры $T=70-80^{\circ}\text{C}$. Выдержать реакционную смесь при этой температуре в течение 1 часа, периодически перемешивая содержимое плавным покачиванием колбы. Охладить колбу с реакционной средой до комнатной температуры, добавить ~250 мл дистиллированной воды, перемешать и оставить до полного оседания твердой фазы. Затем удалить промывную воду декантацией и повторить процедуру промывания твердой фазы еще 2 раза. На заключительном этапе деминерализованное сырье профильтровать через фильтр Шотта №160. Тщательно несколько раз промыть остаток на фильтре дистиллированной водой (до нейтральной pH). При необходимости, если полученный препарат имеет темно коричневое окрашивание, стадию деминерализации можно повторить (для получения хитина с минимальным содержанием золы).

Стадия депротеинирования. Деминерализованное хитинсодержащее сырье с фильтра Шотта количественно перенести в колбу на 500 мл, залить раствором NaOH ($C=6-7\%$, модуль ванны 1:10) и перемешать стеклянной палочкой. Поместить колбу в водяную баню, предварительно нагретую до $T=70-80^{\circ}\text{C}$. Выдержать реакционную смесь при этой температуре в течение 1 часа, периодически перемешивая содержимое плавным покачиванием колбы. Охладить колбу с реакционной средой до комнатной температуры, провести 3-х кратную промывку осадка (см. стадию деминерализации, промывные воды удалять декантацией) и профильтровать через фильтр Шотта №160. Тщательно несколько раз промыть остаток на фильтре дистиллированной водой (до нейтральной pH). При необходимости (для получения хитина с минимальным содержанием белка) стадию депротеинирования можно повторить.

Стадия депигментирования и делипофизации (проводится до получения препарата светло бежевого цвета). Деминерализованное и депротеинированное хитинсодержащее сырье количественно

перенести в колбу на 250 мл, залить 90%-ным этиловым спиртом (модуль ванны 1:10) и перемешать стеклянной палочкой. Поместить колбу в водяную баню, предварительно нагретую до $T=70-80^{\circ}\text{C}$. Выдержать реагенты при этой температуре в течение ~ 0.5 часа, периодически перемешивая содержимое плавным покачиванием колбы, до приобретения сырьем бежевого окрашивания. Охладить колбу с реакционной средой до комнатной температуры и профильтровать через фильтр Шотта №160. Тщательно 1-2 раза промыть остаток на фильтре дистиллированной водой (до нейтральной рН).

Стадию *депигментирования и делипофиллизации* целесообразно совместить со стадией *депротеинирования*, обрабатывая хитинсодержащее сырье раствором щелочи с добавкой ПАВ анионного типа, например, ДДС-На. Добавка ПАВ позволяет снизить концентрацию щелочи и наряду с эффективным удалением белка экстрагировать пигменты и липиды. Например, деминерализованное хитинсодержащее сырье количественно перенести в колбу на 500 мл, залить раствором NaOH ($C=6-7\%$), содержащим 3-4% ДДС-На.

Полученный (очищенный от минеральных и белковых примесей, пигментов и липидов) хитин перенести в чашку Петри, высушить на воздухе и взвесить.

1.3. Определение влажности хитина

Два пронумерованных открытых бюкса на 25 мл (или 15 мл) вместе с крышками поместить в сушильный шкаф и выдержать при температуре 105°C в течение 4 часов. Затем бюксы перенести в эксикатор с хлористым кальцием и оставить на 40 минут. Далее взвесить массу высушенных бюксов на аналитических весах. Затем вновь сушить бюксы в течение 1 часа, дать остыть и взвесить. Повторять всю процедуру до тех пор, пока масса бюксов перестанет изменяться (точность ± 0.0003 г).

В доведенные до постоянной массы бюксы поместить навеску хитина ($\sim 0.4-0.5$ г) и взвесить на аналитических весах. Открытые бюксы с навесками поместить в сушильный шкаф и оставить сушиться в течение двух часов при $T=105^{\circ}\text{C}$. Затем бюксы с навесками закрыть крышками, перенести в эксикатор с хлористым кальцием, оставить охлаждаться до комнатной температуры на 40 минут и взвесить. Повторить эксперимент, высушивая образец полимера до постоянного веса (с точностью до ± 0.0001 г). Содержание влаги W (в %) рассчитать по следующему соотношению:

$$W = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m} \cdot 100\% , \quad (2)$$

где m_1 – масса бюкса с хитином до высушивания (г), m_2 – масса бюкса с хитином после высушивания (г), m – масса доведенного до постоянного веса бюкса (г).

Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0.2%. За окончательный результат взять среднее арифметическое, округленное до 0.1%.

1.4. Определение выхода готового продукта

Рассчитать выход хитина (в мас.% от веса исходного сырья) с учетом влажности готового продукта, определенной в п.1.3.

Задание 2. Проведение химической реакции полимераналогичного превращения хитин → хитозан.

Реактивы: хитин (полученный в задании 1), раствор NaOH $C=0.03$ N и $C=50\%$, дистиллированная вода, водный раствор уксусной кислоты $C=0.66$ M, водный раствор уксуснокислого натрия $C=0.4$ M, водный раствор соляной кислоты $C=0.1$ N.

Методика работы

2.1. Получение хитозана

Работа выполняется в вытяжном шкафу.

Взвесить на аналитических весах 4 г полученного в задании 1 хитина (с точностью до 0.01 г), поместить в фарфоровый стакан на 250 мл и залить 80 мл 50%-ного раствора NaOH, соблюдая модуль ванны 1:20. Поместить стакан на песчаную баню и кипятить содержимое при температуре $T \sim 130^\circ\text{C}$ в течение 1 часа, периодически перемешивая содержимое плавным покачиванием колбы. Охладить стакан с реакционной средой до комнатной температуры, добавить 200 мл дистиллированной воды, перемешать, дождаться полного оседания твердой фазы, удалить промывную воду декантацией, провести 3-х кратную промывку осадка (см. стадию деминерализации задания 1, промывные воды удалять декантацией) и профильтровать через фильтр Шотта №160. Тщательно несколько раз промыть остаток на фильтре дистиллированной водой до нейтрального значения pH.

Полученный хитозан перенести в чашку Петри и высушить на воздухе.

2.2. Определение влажности хитозана (см. задание 1.3)

2.3. Определение выхода хитозана (см. задание 1.4)

2.4. Определение молекулярной массы хитозана

Приготовить 50 мл раствора хитозана в ацетатном буфере (0.33 М CH_3COOH + 0.2 М CH_3COONa) концентрации 0.4 г/дл. Для этого взвесить на аналитических весах навеску 0.2 г хитозана (с точностью до 0.001 г), в цилиндр налить рассчитанные равные объемы (по 25 мл) 0.66 М CH_3COOH и 0.4 М CH_3COONa . В колбу на 50 мл (или 100 мл) налить из мерного цилиндра $\approx 1/2$ часть исходного объема (50 мл) ацетатного буфера, затем высыпать (количественно) полимер и вылить оставшейся растворитель. Полное растворение хитозана должно произойти через ~ 1 час. Полученный раствор профильтровать через фильтр Шотта.

Молекулярную массу хитозана определить вискозиметрически в вискозиметре Уббелоде (см. ссылку [6] списка литературы).

Чистый вискозиметр поместить в термостат и закрепить в штативе. Пипеткой внести 20 мл ацетатного буфера, термостатировать 15 минут при температуре $T=25^\circ\text{C}$ и измерить время истечения (t_0). Время истечения растворителя определять не менее трех раз и для дальнейших расчетов взять среднее значение, причем отсчеты по секундомеру не должны расходиться более, чем на 0.4 сек. Вылить растворитель из вискозиметра, промыть последний дистиллированной водой и высушить.

Чистый вискозиметр вновь поместить в термостат и закрепить в штативе. Пипеткой внести 20 мл раствора хитозана исходной концентрации, термостатировать 15 минут при $T=25^\circ\text{C}$ и измерить время истечения (t). Затем измерить времена истечения растворов хитозана меньшей концентрации. Разбавление исходного раствора проводить непосредственно в вискозиметре, последовательно добавляя в него пипеткой 3, 5, 8 и 10 мл ацетатного буфера, получая, таким образом, каждый раз раствор меньшей концентрации. После каждого разбавления раствор тщательно перемешать, продавливая воздух при помощи груши через боковую трубку. Перед измерением времени истечения после очередного разбавления раствор термостатировать 15 минут.

После окончания измерений раствор вылить из вискозиметра, промыть его дистиллированной водой, прополаскивая несколько раз капилляр и измерительный резервуар, и высушить.

Рассчитать относительную ($\eta_{\text{отн}}$), удельную ($\eta_{\text{уд}}$) и приведенную удельную ($\eta_{\text{уд}}/C$) вязкости растворов хитозана. Результаты измерений

оформить в форме таблицы 3. Уточненную концентрацию исходного раствора хитозана рассчитать с учетом влажности полимера.

Таблица 3

Протокол выполнения задания 2.4

№	Концентрация раствора хитозана C , г/дл	Время истечения смешанного растворителя t_0 , с	Время истечения раствора хитозана t , с	$\eta_{\text{омн}} = \frac{t}{t_0}$	$\eta_{\text{вс}} = \eta_{\text{омн}} - 1$	$\frac{\eta_{\text{вс}}}{C}$, дл/г
1						
2						
3						
4						
5						

Построить графическую зависимость $\eta_{\text{вс}}/C = f(C)$. Экстраполяцией $\eta_{\text{вс}}/C = f(C)$ к нулевой концентрации определить предельное число вязкости $[\eta]$ раствора хитозана.

Рассчитать средневязкостную молекулярную массу \bar{M}_η полученного образца хитозана по уравнению Марка-Куна-Хаувинка:

$$[\eta] = 1.38 \cdot 10^{-4} \cdot \bar{M}_\eta^{0.85} \quad (3)$$

2.5. Определение степени деацетилирования хитозана

Степень деацетилирования хитозана определить методом потенциометрического титрования на универсальном ионметре ЭВ-74. В приборе используется система с основным (стеклянным) и вспомогательным (хлорсеребряным) электродом, точность измерения ± 0.01 .

Приготовить 20 мл раствора хитозана в соляной кислоте ($C=0.1$ N) концентрации 1 г/дл (порядок смешения реагентов см. в задании 2.4). Для этого взвесить на аналитических весах 0.2 г (с точностью до 0.001 г) хитозана и растворить при перемешивании на магнитной мешалке в 20 мл 0.1 N HCl. Полученный раствор профильтровать через фильтр Шотта в стеклянный стаканчик и титровать потенциометрически 0.03 N раствором едкого натра до pH ~ 11 .

По полученным данным построить графическую зависимость $\text{pH}=f(V)$, где V – объем расходуемого в процессе титрования раствора NaOH (рис.11). Первый перегиб кривой титрования соответствует избыточному количеству соляной кислоты, второй – концентрации аминокрупп в навеске хитозана.

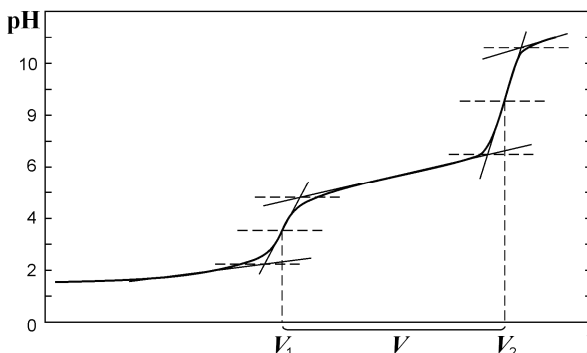


Рис.11. Изменение рН системы в процессе титрования раствора хитозана раствором едкого натра.

Степень деацетилирования (СД) хитозана определить по формуле:

$$\text{СД} = \frac{203 \cdot m}{G - 161 \cdot m + 203 \cdot m} \cdot 100\% = \frac{203m}{G + 42m} \cdot 100\% , \quad (4)$$

где G – навеска хитозана (г); 161 – молекулярный вес элементарного звена хитозана; 203 – молекулярный вес ацетилированного звена хитозана; m – количество молей аминоксодержащих звеньев в навеске хитозана, $m = V \cdot T$; V – объем раствора NaOH (мл), соответствующий нейтрализации кватернизованной формы аминогрупп хитозана (V определяется как разность объемов ($V_2 - V_1$), найденных из второго и первого перегибов на кривой потенциметрического титрования рис.11); T – титр раствора NaOH (моль/мл), определяемый в холостой пробе (в холостом титровании 0.1 N раствора HCl, рис.12).

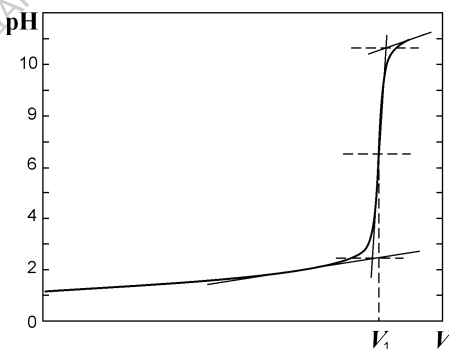


Рис.12. Изменение рН системы в процессе холостого титрования 0.1 N раствора соляной кислоты раствором едкого натра.

Задание 3. Сравнительный анализ растворимости образцов хитина и хитозана в различных средах.

Реактивы: хитин (полученный в задании 1), хитозан (полученный в задании 2), водный раствор уксусной кислоты $C=0.33$ М, водный раствор соляной кислоты $C=0.1$ N, диметилацетамид (ДМАА), диметилсульфоксид (ДМСО).

Методика работы

Работа выполняется в вытяжном шкафу.

В две пробирки налить по 20 мл ДМАА. В одну пробирку поместить ~ 0.1 г хитина, в другую – ~ 0.1 г хитозана и визуально наблюдать растворение образцов, периодически перемешивая содержимое стеклянной палочкой. Повторить аналогичную процедуру для систем хитин/хитозан – ДМСО, хитин/хитозан – CH_3COOH ($C=0.33$ М) и хитин – HCl ($C=0.1$ N), данные для системы хитозан – HCl ($C=0.1$ N) взять из выполненного задания 2.5. Оценить растворимость (р – растворим, нр – нерастворим) образцов хитина и хитозана в данных средах.

Заключение. Полученные в заданиях 1-3 результаты оформить в виде таблицы 4.

Таблица 4

Протокол выполнения задания 3

Полимер	Влажность W , мас. %	Растворимость			Молекулярная масса \overline{M}_η	Степень деацети- лирования СД, %
		ДМАА	ДМСО	HCl $C=0.1$ N		
Хитин						
Хитозан					—	—

При оформлении результатов работы написать структурные формулы хитина и хитозана, уксуснокислой и солянокислой соли хитозана, уравнение химической реакции полимераналогичного превращения хитин \rightarrow хитозан.

Работа №2: Получение и свойства полисахаридов растительного происхождения

Цель работы: выделение пектиновых веществ из кожуры цитрусовых и из мякоти тыквы, сравнительный анализ гелеобразующей способности пектина цитрусовых с тыквенным пектином.

Сырье и реактивы: кожура цитрусовых и/или мякоть тыквы, водные растворы соляной кислоты концентрации $C=0.3\text{ N}$ и 0.1 N , уксусной кислоты $C=1\text{ N}$, лимоннокислого аммония $C=1\%$, едкого натра $C=0.4\%$, хлористого кальция $C=0.5\%$ и 11.1% , AgNO_3 $C=2\%$, дистиллированная вода, ацетон, этиловый спирт ($C\sim 95\%$).

Приборы и посуда: весы аналитические, сушильный шкаф, водяная баня, электрическая плитка, эксикатор с хлористым кальцием, термометр, обратный холодильник, керамическая ступка с керамическим пестиком и мелкоизмельченное стекло, ножницы, терка-рашпиль с мелкими зубцами, мерные колбы на 250 и 500 мл, конические термостойкие колбы на 250 мл (4 шт), термостойкие колбы на 1000 мл (2 шт), цилиндр на 100 мл, бюксы на 25 мл (4 шт), хлопчатобумажные тканевые фильтры (2 шт.), воронка Бюхнера, колба Бунзена, насос Камовского, стеклянные палочки, бюретка, пинцет, универсальная индикаторная бумага, фарфоровая чаша для выпаривания (1000 мл).

Задание 1. Выделение и количественное определение пектиновых веществ из кожуры цитрусовых.

Метод основан на переведении пектиновых веществ в растворимое состояние, превращении в пектиновую кислоту с дальнейшим осаждением последней в виде кальциевой соли и учете ее весовым способом.

В зависимости от цели исследования можно определять отдельно растворимый пектин и протопектин, либо общее количество пектиновых веществ. Ход определения в обоих случаях одинаков, с тем лишь отличием, что в первом случае осаждают и учитывают пектиновую кислоту отдельно в 2 экстрактах, а во втором – экстракты объединяют и определяют общее количество пектиновых веществ.

Методика работы

1.1. Пробоподготовка

Исходный материал (кожура свежих апельсинов или грейпфрутов или помело) разрезать с помощью ножниц на маленькие части и тщательно растереть со стеклом в ступке до однородной массы.

1.2. Определение влажности пектинсодержащего сырья

Влажность пектинсодержащего сырья определить по формуле (2), см. работу №1, задание 1.3.

1.3. Экстрагирование пектиновых веществ

Перед началом каждой операции рекомендуется заранее готовить хлопчатобумажные тканевые фильтры, подогнав их по размерам к используемой воронке Бюхнера.

1.3.1. Извлечение водорастворимого пектина

Навеску 25 г измельченной кожуры апельсинов количественно перенести в коническую колбу на 250 мл, залить 100 мл воды (предварительно нагретой до 45°C) и выдержать при этой температуре 30 минут (на водяной бане), периодически перемешивая содержимое. После этого полученный водный экстракт аккуратно профильтровать через тканевый фильтр. Для фильтрования использовать колбу Бунзена с воронкой Бюхнера, насос Камовского. Полученный экстракт перенести в мерную колбу на 250 мл.

Оставшееся в колбе сырье повторно залить 75 мл воды ($T=45^{\circ}\text{C}$), выдержать 30 минут на водяной бане, профильтровать и слить в мерную колбу с первым экстрактом. Остаток в колбе третий раз залить 50-60 мл воды той же температуры, получить третий экстракт по описанной выше методике, профильтровать и слить в ту же мерную колбу. Содержимое колбы с объединенным экстрактом довести дистиллированной водой до мерной черты. Если раствор получился мутный, его необходимо еще раз профильтровать.

1.3.2. Извлечение кислоторастворимых протопектина и пектовой кислоты

В коническую колбу на 250 мл с оставшимся после экстрагирования водорастворимого пектина сырьем добавить 50 мл 0.3 N раствора соляной кислоты. Закрыть колбу пробкой с вертикально поставленным (обратным) холодильником и поместить на 30 минут в кипящую водяную баню. Затем фильтрат вместе с сырьем профильтровать через тканевый фильтр (см. задание 1.3.1) и перенести в мерную колбу на 500 мл. Остаток на фильтре несколько раз промыть горячей водой, сливая промывную воду в ту же мерную колбу.

Фильтр вместе с остатком перенести в экстракционную колбу на 250 мл, залить 70 мл 1% раствора лимоннокислого аммония, закрыть пробкой с обратным холодильником и выдержать на кипящей водяной бане 30 минут. Отфильтровать содержимое и перенести в мерную колбу на 500 мл с первым экстрактом кислоторастворимых пектиновых веществ. Остаток на фильтре промыть горячей водой, объединяя промывную воду в той же мерной колбе. Фильтрат охладить до комнатной температуры и довести дистиллированной водой до мерной черты.

1.4. Подготовка фильтров

Подогнать хлопчатобумажные тканевые фильтры (2 шт) по размеру используемой воронки Бюхнера, поместить в сушильный шкаф и выдержать при температуре 100°C в течение 2 часов. Затем фильтры перенести в эксикатор с хлористым кальцием и оставить на 30-40 минут. Далее взвесить массу высушенных фильтров на аналитических весах. Вновь повторять всю процедуру до тех пор, пока масса фильтров перестанет изменяться (точность ± 0.0003 г). Полученные значения массы фильтров учитывать в расчетах при определении количества экстрагированных пектиновых веществ.

1.5. Омыление пектиновых веществ

1.5.1. Омыление и количественное определение водорастворимого пектина

В коническую колбу на 250 мл отобрать 50 или 100 мл (в зависимости от разбавления и от ожидаемого количества пектина) первой вытяжки водорастворимого пектина, прибавить равный объем (50 или 100 мл) 0.4% раствора едкого натра и оставить при комнатной температуре на одни сутки. На следующий день раствор подкислить тем же объемом (50 или 100 мл) 1 N раствора уксусной кислоты и осадить образовавшуюся пектиновую кислоту 50 (или 100) мл 11.1% раствора хлористого кальция. Операцию проводить при комнатной температуре.

Полученный осадок пектата кальция отфильтровать через заранее высушенный до постоянного веса тканевый фильтр и промыть 0.5% раствором хлористого кальция. Затем осадок на фильтре многократно промыть холодной дистиллированной водой для освобождения от хлористого кальция (проверка по реакции на хлор с азотнокислым серебром). В завершение осадок промыть несколько раз горячей водой для удаления солей.

Фильтр с осадком перенести пинцетом в заранее доведенный до постоянной массы бюкс и высушить до постоянного веса при 100-105°C. Определить массу высушенного пектина как разность между (масса бюкса + масса фильтра с осадком после сушки) и (исходная масса прокаленного бюкса + масса прокаленного фильтра). Полученный вес сухого пектина умножить на 0.9235, осуществляя тем самым количественный перевод на пектиновую кислоту. Рассчитать процентное содержание пектина с учетом произведенного разбавления.

1.5.2. Омыление и количественное определение кислоторастворимых протопектина и пектиновой кислоты

Со второй вытяжкой кислоторастворимых протопектина и пектиновой кислоты провести аналогичные пункту 1.5.1 операции, с той лишь разницей, что эту вытяжку необходимо нейтрализовать едким натром до прибавления щелочи, необходимой для омыления (при этом происходит изменение цвета раствора с бледно-желтого на ярко-желтый). Рассчитать процентное содержание протопектина и пектиновой кислоты с учетом произведенного разбавления.

1.6. Расчет и оформление результатов

Рассчитать содержание пектата кальция и пектовой кислоты в первой фракции, а также протопектина и пектиновой кислоты с учетом влажности исходного сырья.

Задание 2. Выделение пектина из мякоти тыквы.

Методика работы

2.1. Пробоподготовка

Мякоть тыквы (без семян) натереть на терке-рашпеле с мелкими зубцами и тщательно растереть со стеклом в ступке до однородной массы (жома).

2.2. Определение влажности пектинсодержащего сырья

Влажность пектинсодержащего сырья определить по формуле (2), см. работу №1, задание 1.3.

2.3. Экстрагирование пектиновых веществ

Перед началом работы подготовить хлопчатобумажные тканевые фильтры (см. задание 1.3).

2.3.1. Извлечение пектиновых веществ из исходного сырья

Навеску 25 г (точность взвешивания до 0.02 г) полученного жома количественно перенести в термостойкую колбу на 1000 мл и залить раствором соляной кислоты $C=0.1\text{ N}$, соблюдая модуль ванны 1:20 (из

расчета на 1 г сырья – ~20 мл раствора реагента). Тщательно перемешать смесь стеклянной палочкой и определить pH с использованием универсальной индикаторной бумаги. Значение pH должно соответствовать интервалу 0.8–1.0. Если pH смеси выше 1.0, то подкорректировать его значение введением дополнительной порции раствора HCl. Поместить колбу на водяную баню, предварительно нагретую до $T=60-70^{\circ}\text{C}$, и выдержать реакционную систему при этой температуре в течение 1.5-2 часов, периодически помешивая содержимое покачиванием колбы. Отфильтровать экстракт через хлопчатобумажный тканевый фильтр. Для фильтрования использовать колбу Бунзена с воронкой Бюхнера, насос Камовского. Полученный экстракт перенести в чистую колбу на 1000 мл.

Отфильтрованный жом количественно перенести с тканевого фильтра в первую колбу на 1000 мл, вторично залить 0.1 N раствором HCl (гидромодуль тот же, 1:20) и выдержать на водяной бане при $T=60-70^{\circ}\text{C}$ в течение 0.5-1 часа. Отфильтровать полученный экстракт через хлопчатобумажный тканевый фильтр (см. выше) и соединить с экстрактом, полученном в предыдущем опыте.

2.3.2. Концентрирование экстракта пектиновых веществ

Объединенный экстракт перелить в фарфоровую чашу для выпаривания на 1000 мл, поместить чашу на водяную баню ($T=90-95^{\circ}\text{C}$) и концентрировать экстракт выпариванием жидкой фазы до достижения вязкоподобной консистенции с содержанием сухого вещества ~1%. Время выпаривания варьируется в среднем от 3 до 5 часов.

Отбор проб для определения содержания сухого вещества в концентрируемом экстракте. В бюкс на 25 мл поместить 5 мл сконцентрированного экстракта, высушить до постоянной массы, взвесить на аналитических весах и определить содержание сухого вещества. Если полученная концентрация сухого вещества ниже 0.8-1.0%, продолжить концентрирование объединенного экстракта.

2.3.3. Выделение и количественное определение пектиновых веществ

Выделение пектиновых веществ из сконцентрированного экстракта (концентрата) провести осаждением ацетоном (используется для получения технического пектина) и этиловым спиртом (используется для получения пищевого пектина)

Измерить объем полученного в задании 2.3.2 концентрата и разделить на две равные части. Одну часть концентрата вылить при

перемешивании в двойной объем ацетона, вторую часть – в двойной объем этилового спирта ($C \sim 95\%$). При осаждении твердая фаза пектиновых веществ образуется в форме хлопьев белого или бежевого цвета. Профильтровать полученную систему через заранее высушенный до постоянного веса хлопчатобумажный тканевый фильтр (см. задание 1.4 и 2.3.1). Твердую фазу пектиновых веществ высушить в струе воздуха при комнатной температуре.

Тканевый фильтр с твердой фазой пектиновых веществ перенести в заранее доведенные до постоянной массы бюксы, высушить до постоянной массы при $T=70-80^\circ\text{C}$ и определить массу полученного продукта. Рассчитать процентное содержание пектина в исходном сырье, учитывая его влажность. Сравнить количественный выход готового продукта при использовании разных осадителей.

Задание 3. Провести сравнительный анализ гелеобразующей способности пектина цитрусовых с тыквенным пектином.

Методика работы. Приготовить растворы полученных образцов цитрусового и тыквенного пектина в воде и разбавленной уксусной (или другой) кислоте разных концентраций. Провести визуальный анализ гелеобразующей способности полученных образцов.

При оформлении результатов написать структурные формулы пектина, пектиновой и пектовой кислот.

Работа №3: Определение фракционного состава целлюлозосодержащего сырья

Цель работы: Определение содержания α -, β - и γ -целлюлозы в целлюлозосодержащем сырье (древесные опилки, бумага, солома и др.).

Задание 1. Определение содержания α -целлюлозы.

Сырье и реактивы: целлюлозосодержащее сырье (древесные опилки, бумага, солома и др.), растворы едкого натра концентрации $C=9.5\%$ и 17.5% , дистиллированная вода, фенолфталеин.

Приборы и посуда: толстостенный стеклянный стакан (на 200 мл), стеклянная палочка, фильтр Шотте №4, насос Комовского, колба Бюхнера, 2 бюкса на 50 мл, пробирки.

Методика работы

1.1. Определение влажности целлюлозосодержащего сырья

Влажность целлюлозосодержащего сырья определить по формуле (2), см. работу №1, задание 1.3.

1.2. Выделение α -целлюлозы

Навеску 3 г (точность ± 0.0002 г) измельченного воздушно-сухого целлюлозосодержащего сырья поместить в толстостенный стеклянный стакан, емкостью 200 мл. Залить навеску 45 мл 17.5% -ого раствора едкого натра. Сначала необходимо прилить 15 мл раствора NaOH, осторожно помешивая содержимое стакана стеклянной палочкой. Через 3 мин при перемешивании влить оставшиеся 30 мл раствора концентрированной щелочи. Стакан с полученной смесью накрыть стеклом и оставить на 45 мин. По истечении указанного времени к реакционной смеси прилить 50 мл дистиллированной воды и тщательно помешивать в течение 2 мин. Затем содержимое стакана перенести на фильтр Шотте, равномерно распределить по поверхности и отфильтровать щелочной раствор в колбу Бюхнера насосом Комовского.

Остаток на фильтре сначала тщательно промыть 9.5% -ым раствором щелочи (3 раза по 25 мл). Далее остаток промыть дистиллированной водой до отрицательной реакции на фенолфталеин. Для этого по мере промывки водой отбирать в пробирку несколько капель фильтрата и добавлять в неё каплю фенолфталеина. При

отрицательной реакции на щёлочь – промывку закончить. Остаток максимально перенести с фильтра Шотте в бюкс (бюкс предварительно высушить до постоянной массы и взвесить с точностью ± 0.0003 г) и сушить в сушильном шкафу 5-6 часов при $T=100^{\circ}\text{C}$. После этого бюкс перенести в эксикатор, охладить и взвесить. Процедуру сушки проводят до постоянства массы бюкса (см. работу №1, задание 1.3).

1.3. Определение содержания α -целлюлозы

Содержание α -целлюлозы (A_1 , в %) рассчитать по формуле:

$$A_1 = \frac{(m_1 - m) \cdot 100}{m_2 \cdot (100 - W)} \cdot 100, \quad (5)$$

где m_1 – масса бюкса с высушенной α -целлюлозой (г), m – масса высушенного бюкса (г), m_2 – навеска воздушно-сухого целлюлозосодержащего сырья (г), W – влажность целлюлозосодержащего сырья (%), определённая в задании 1.1).

Задание 2. Определение содержания β - и γ -целлюлозы.

Сырье и реактивы: водные растворы бихромата калия концентрации $C=0.1$ Н, тиосульфата натрия $C=0.1$ Н, иодида калия $C=10\%$, сульфата аммония $C=40\%$, крахмала $C=0.5\%$, серной кислоты $C=1$ Н, концентрированная серная кислота ($\rho=1.84$ г/см³), дистиллированная вода.

Приборы и посуда: мерная колба на 1 л, пипетка, коническая колба на 250 мл, бюретка на 50 мл (2 шт), цилиндр на 50 мл, колба на 750 мл, бумажный фильтр «синяя лента».

Методика работы

2.1. Общее выделение β - и γ -целлюлозы

Фильтрат и промывные воды (без фенолфталеина), полученные в ходе выполнения задания 1, собрать в мерную колбу на 1 л. Объем содержимого колбы довести дистиллированной водой до метки (до $V=1$ л). Взять пипеткой аликвоту объемом 25 мл и внести в коническую колбу на 250 мл. Затем в коническую колбу добавить из бюретки 50 мл 0.1 Н раствора бихромата калия и осторожно помешивая влить цилиндром 35 мл концентрированной серной кислоты ($\rho=1.84$ г/см³).

Полученную смесь кипятить на электрической плитке в течение 3 мин, охладить и количественно перенести в колбу на 750 мл. Далее

добавить 10 мл 10%-ого раствора иодида калия для определения избытка бихромата калия. Колбу с полученной смесью оставить на 5 мин в тёмном месте для окончания химической реакции. Выделившийся йод оттитровать 0.1 Н раствором тиосульфата натрия. В конце титрования прилить 2-3 мл раствора крахмала и титровать до перехода синей окраски раствора в бирюзово-зелёную. Параллельно провести «холостой опыт», вводя те же реагенты, кроме щелочного раствора целлюлозы. Щелочной раствор целлюлозы заменить на 25 мл дистиллированной воды.

2.2. Определение общего содержания β- и γ-целлюлоз

Содержание общего количества β- и γ-целлюлозы (A_2 , в %) рассчитать по формуле:

$$A_2 = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0.000685 \cdot 1000 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - W)} \cdot 100, \quad (6)$$

где V_1 – объём 0.1 Н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование «холостой пробы» (мл); V_2 – объём 0.1 Н раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование щелочного раствора гемицеллюлоз (мл); m – исходная навеска воздушно-сухого целлюлозосодержащего сырья (г); W – влажность целлюлозосодержащего сырья (%); 0.000685 – количество гемицеллюлоз, практически окисляемой 1 мл 0.1 Н раствора бихромата калия.

2.3. Выделение γ-целлюлозы

В коническую колбу на 250 мл пипеткой внести 25 мл анализируемого раствора гемицеллюлоз и титровать в присутствии фенолфталеина 1Н серной кислотой. При этом на титрование расходуется V мл серной кислоты. В другую коническую колбу на 250 мл внести 25 мл щелочного раствора гемицеллюлоз, добавить $(V - 1)$ мл 1 Н серной кислоты и 1.5 мл 40%-ного раствора сульфата аммония. Колбу с содержимом нагревать на водяной бане (80°C) в течение 15 мин, затем охладить. После охлаждения прилить 1 мл 1 Н серной кислоты и отфильтровать содержимое колбы на фильтре «синяя лента». Осадок на фильтре промыть несколько раз горячей дистиллированной водой. В колбу добавить из бюретки 50 мл бихромата калия и осторожно при помешивании 35 мл концентрированной серной кислоты.

Дальнейшие процедуры выполнять аналогично методике определения общего содержания β- и γ-целлюлоз (см. задание 2.1, 2-ой абзац).

2.4. Определение содержания γ -целлюлозы

Содержание γ -целлюлозы (A_3 , в %) рассчитать по формуле (6), в которой A_2 заменяется, соответственно, на A_3 .

2.5. Определение содержания β -целлюлозы

Содержание β -целлюлозы (A_4 , в %) определить по соотношению:

$$A_4 = A_2 - A_3 . \quad (7)$$

При выполнении работы в качестве исходного сырья использовать древесные опилки различных пород древесины, бумагу, солому и др.

Полученные результаты оформить в виде таблицы 5.

Таблица 5

Сравнительный анализ содержания гемицеллюлоз
в целлюлозосодержащем сырье различного происхождения

№	Вид сырья	Содержание гемицеллюлоз		
		α -	β -	γ -
1	Опилки древесины лиственных пород			
2	Опилки древесины хвойных пород			
3	Бумага			
4	Солома			

Работа №4: Определение удельного оптического вращения растворов полисахаридов

Цель работы: определение величины удельного оптического вращения растворов полисахаридов растительного и животного происхождения на круговом поляриметре.

Реактивы: образцы полимеров (ди- и триацетат целлюлозы, хитозан, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, пектин, агар-агар, водорастворимый крахмал), растворители (дистиллированная вода, водные растворы уксусной кислоты концентрации $C=0.33$ М и 0.66 М, уксуснокислого натрия $C=0.4$ М, хлорида натрия $C=3\%$, этиловый спирт, ацетон, метиленхлорид, диметилсульфоксид), раствор йода, раствор сульфата меди (II) $C=5\%$.

Приборы и посуда: круговой поляриметр СМ, измерительная кювета, весы аналитические, магнитная мешалка, водяная баня, песчаная баня, газовая горелка, электрическая плитка, холодильник, колбы на 50 или 100 мл (1-7 шт), колба на 250 мл, мерные цилиндры на 50 или 100 мл (2 шт), фильтр Шотта №160, капроновая ткань, фильтровальная бумага, индикаторная бумага, стеклянная палочка, стеклянная чашка, 6 бюксков на 25 мл (или 50 мл), термометр, пробирки (7 шт), пипетка.

Методика работы на поляриметре

Поляриметр круговой СМ предназначен для измерения угла вращения плоскости поляризации оптически активными прозрачными растворами и однородными жидкостями при длине волны линии D спектра натрия (589 нм). Пределы измерения угла вращения $\pm 360^\circ$, точность измерений $\pm 0.05^\circ$.

Общий вид и «разрез» поляриметра кругового СМ представлены на рис.13 и 14.

Основные узлы кругового поляриметра СМ: головка анализатора (рис.13: 1, 2, 9-11; рис.14: 6, 9-14), поляризационное устройство (рис.13: 3; рис.14: 2-5), осветитель (рис.13: 6, 7, 12; рис.14: 1), штатив со стойкой (рис.13: 4), измерительная кювета.

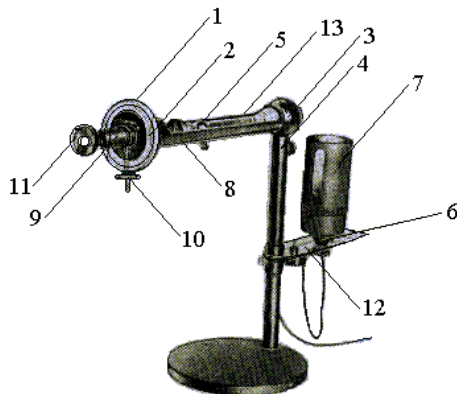


Рис.13. Круговой поляриметр СМ: 1 – неподвижный лимб, 2 – нониус, 3 – поляризационное устройство, 4 – штатив со стойкой, 5 – измерительная кювета, 6 – кронштейн, 7 – источник света, 8 – вращающаяся шторка, 9 – зрительная трубка, 10 – фрикцион, 11 – измерительный окуляр, 12 – кронштейн, 13 – соединительная трубка.

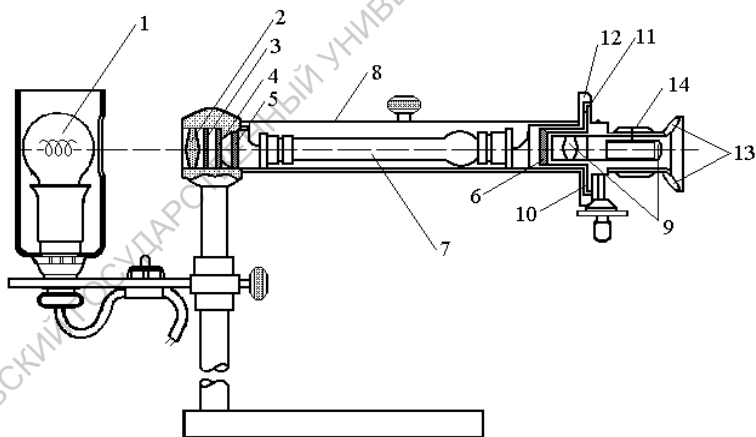


Рис.14. Разрез кругового поляриметра СМ: 1 – источник света, 2 – осветительная линза, 3 – поляризатор, 4 – диафрагма с кварцевой пластиной, 5 – оранжевое защитное стекло, 6 – анализатор, 7 – стеклянная кювета для растворов, 8 – шторка, 9 – зрительная трубка, 10 – нониус I, 11 – нониус II, 12 – лимб с градусной шкалой, 13 – отсчетные лупы, 14 – муфта.

Перед началом работы произвести заземление прибора через штепсельную вилку осветителя. Укрепить осветитель (рис.13: 6, 7) на кронштейне прибора (12) и включить его. Фотометрическое поле наблюдать через измерительный окуляр (11). Перемещением муфты зрительной трубки (9) установить окуляр (11) по глазу на резкое изображение линий раздела тройного поля зрения. Тройное поле установить на фотометрическое равенство в чувствительном положении, т.е. на равномерную затемненность (рис.15).

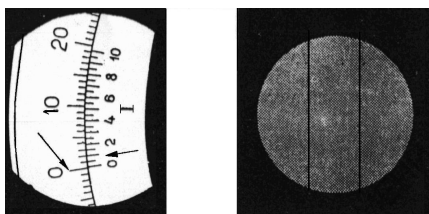


Рис.15. Начальное положение лимба и нониуса, а также поле зрения после установки анализатора на равную затемненность тройного поля зрения в чувствительном положении и при введенной кювете, наполненной дистиллированной водой (нулевое положение).

Чувствительное положение анализатора характеризуется следующим:

- незначительное вращение муфты фрикциона вызывает резкое изменение освещенности наблюдаемых частей поля;
- наблюдаемое тройное поле при установке на равномерную освещенность его частей будет темное.

Путем перемещения осветителя по пазу вдоль кронштейна (рис.13: 12) и самого кронштейна по стойке штатива (4) вверх, вниз, вправо, влево, добиться максимальной равномерной освещенности поля.

Определение нулевого положения прибора

Чистую поляриметрическую кювету (рис.13: 5, рис.14: 7), держа вертикально, наполнить дистиллированной водой так, чтобы образовался выпуклый мениск. На мениск, избегая образования пузырька воздуха, сбоку надвинуть сухое покровное стекло (кварцевую пластинку), предварительно протертое смоченной спиртом фильтровальной бумагой. Затем наложить резиновую прокладку и навинтить прижимную гайку. Если в кювете остался пузырек воздуха, процедуру повторить еще раз.

Для определения нулевого положения прибора, поместить кювету в соединительную трубку (рис.13: 13) поляриметра и закрыть шторкой (8). Перемещением муфты зрительной трубки (9) установить окуляр (11) по глазу на резкое изображение разделяющих линий тройного поля. Вращением фрикциона (10) повернуть анализатор (при этом вращаются нониус и зрительная трубка) до равномерного затемнения тройного поля зрения (рис.15). При этом в поле зрения не должно наблюдаться окрашивания средней части поля относительно крайних частей и не должно быть заметно резкого выделения сторон кварцевой пластинки. Если в поле зрения появляется окрашивание, то необходимо отжать покровное стекло, так как в данном случае окрашивание поля зрения получается за счет возникших напряжений в стекле трубки. Резкое выделение сторон кварцевой пластинки может происходить и от неправильной установки осветителя.

Установку на равномерную затемненность тройного поля зрения повторить 10 раз, добиваясь хорошей воспроизводимости результатов (с точностью до $\pm 0,1^\circ$). Отсчет произвести по лимбу и нониусу. За нулевой отсчет взять среднюю величину из полученных значений.

Разница при установке на равенство (равномерную затемненность) между нулевым штрихом нониуса (рис.15, правая малая шкала) и нулевым положением лимба (левая большая шкала) представляет собой инструментальную поправку α_n (т.е. поправке на «0»), которую необходимо учитывать при расчете величины удельного оптического вращения растворов полисахаридов.

Оцифровка отчетного устройства

Если нулевой штрих нониуса при установке на равенство оказался относительно нулевого штриха лимба смещенным по часовой стрелке, то инструментальной поправке α_n приписывается знак (+), если против часовой стрелки (-). Шкала лимба показывает значения целых градусов (цена деления 1°), шкала нониуса – доли градуса (цена деления 0.05°).

Отсчет ведут следующим образом: определяют на сколько полных градусов повернут нуль нониуса по отношению к лимбу (левая стрелка на рис.15), затем по штриху нониуса, совпадающему с градусным штрихом лимба (правая стрелка на рис.15), отсчитывают доли градуса. Далее к числу градусов, взятых по лимбу, прибавляют отсчет по нониусу.

Пример. Нуль шкалы на рис.15 не совпадает с нулем нониуса, показание нониуса $+0.1^\circ$ (отмечено стрелками). Таким образом, инструментальная поправка $\alpha_{\text{п}} = +0.1^\circ$.

Определение угла вращения плоскости поляризации оптически активной средой

Вылить дистиллированную воду из кюветы и заполнить ее исследуемой системой. Поместить кювету с раствором в соединительную трубку прибора и закрыть шторкой. Вид тройного поля зрения изменится (рис.16), появится темное окрашивание средней части поля.

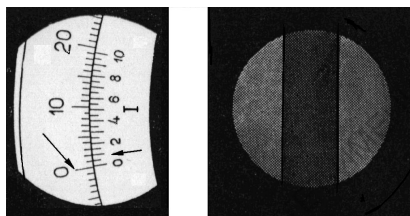


Рис.16. Начальное положение лимба и нониуса, а также поле зрения после введения кюветы, наполненной раствором оптически-активного вещества.

Вращением фрикцииона (рис.13: 10) установить тройное поле на равномерную затемненность (рис.17), произвести отсчет не менее 10 раз и взять среднее значение.

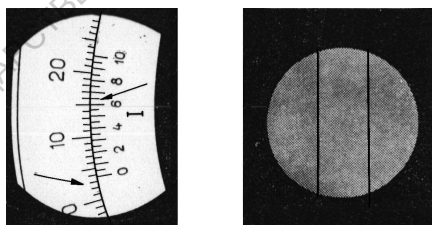


Рис.17. Конечное положение лимба и нониуса, а также поле зрения после установки анализатора на равное затемнение тройного поля в чувствительном положении с кюветой, заполненной раствором.

Пример. Показание прибора (α) по рис.17 соответствует $+3.65^\circ$ (отмечено стрелками). Истинный угол вращения (на примере рис.15-

17) получается вычитанием инструментальной поправки ($\alpha_{\text{п}}$, с ее знаком) из полученного отсчета (α):

$$+3.65^{\circ} - (+0.1^{\circ}) = +3.55^{\circ}.$$

После окончания измерений раствор вылить из кюветы, промыть кювету дистиллированной водой и сполоснуть этиловым спиртом. Покровные стекла протереть фильтровальной бумагой, смоченной спиртом.

Задание 1. Определить величину удельного оптического вращения растворов ацетатов целлюлозы.

Реактивы: диацетат целлюлозы (ДАЦ), триацетат целлюлозы (ТАЦ), ацетон, дистиллированная вода, метиленхлорид, этиловый спирт.

Методика работы

1.1. Приготовление растворов

Приготовить 50 мл раствора ДАЦ в смеси ацетона с водой (соотношение компонентов 95:5) концентрации 0.5 г/100 мл и по 50 мл раствора ДАЦ и ТАЦ в смеси метиленхлорида с этиловым спиртом (соотношение компонентов 90:10) такой же концентрации. Для этого взвесить на аналитических весах навеску полимера (с точностью до 0.001 г); в цилиндр налить ацетон (метиленхлорид) и добавить дистиллированную воду (этиловый спирт). В колбу на 50 мл (или 100 мл) налить $\approx 1/2$ часть объема смешанного растворителя из мерного цилиндра, затем высыпать полимер и вылить остатки растворителя. Полное растворение ДАЦ и ТАЦ произойдет через ~ 1 час. Полученные растворы профильтровать через фильтр Шотта.

1.2. Определение концентрации раствора по сухому остатку

Поскольку ацетон и метиленхлорид относятся к классу летучих жидкостей, точную концентрацию раствора (необходимую для последующих расчетов) определить по сухому остатку.

Шесть пронумерованных открытых бюкса на 10-15 мл вместе с крышками поместить в сушильный шкаф и выдержать при температуре 105°C в течение 4-х часов. Затем бюксы перенести в эксикатор с хлористым кальцием и оставить на 40 минут. Далее взвесить массу прокаленных бюксов на аналитических весах. Затем вновь прокалить бюксы в течение 1 часа, дать остыть и взвесить. Повторять всю процедуру до тех пор, пока масса бюксов перестанет

изменяться (расхождения допустимы лишь в четвертом знаке после запятой).

В два доведенных до постоянного веса бюкса внести пипеткой по 5-7 мл раствора ДАЦ в ацетоно-водной смеси, в два других – по 5-7 мл раствора ДАЦ в смеси метилхлорида с этиловым спиртом, еще в два бюкса – по 5-7 мл раствора ТАЦ в смеси метилхлорида с этиловым спиртом. Взвесить бюксы с растворами полимеров на аналитических весах, поместить сначала под тягу до испарения растворителя, а затем в сушильный шкаф с температурой 105°C. Бюксы с пленкой полимера довести до постоянного веса и определить точную концентрацию (C , г/100 мл) исходного раствора по формуле:

$$C = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100}{V}, \quad (8)$$

где m_1 – масса пустого бюкса с крышкой (г); m_2 – масса бюкса с сухим полимером (г); V – объем раствора полимера, взятый для определения концентрации (мл). Определить среднюю концентрацию исходных растворов ДАЦ и ТАЦ из данных двух параллельных опытов.

1.3. Определение величины удельного оптического вращения

Заполнить поляриметрическую кювету раствором ДАЦ в ацетоноводной смеси. Определить показание прибора по описанной выше методике (отсчет произвести 10 раз). Угол вращения плоскости поляризации раствора полимера (α_{p-pa}) выразить с учетом инструментальной поправки поляриметра (α_n). Вылить раствор из кюветы, промыть ее ацетоном и высушить. Заполнить кювету растворителем – смесью ацетона с водой (95:5), определить показание прибора и выразить (с учетом α_n) угол вращения плоскости поляризации растворителя (α_{p-pa}). Величину удельного оптического вращения $[\alpha]_D^T$ рассчитать по формуле (1), с учетом $\alpha = \alpha_{p-pa} - \alpha_n$. При каждом измерении фиксировать температуру окружающей среды (T , °C).

По окончании измерений вылить из кюветы раствор, промыть кювету ацетоном и высушить.

Заполнить поляриметрическую кювету раствором ДАЦ в смеси метилхлорида с этиловым спиртом и определить α_{p-pa} . Вылить

раствор, промыть кювету метиленхлоридом (либо смесью метиленхлорида с этанолом) и высушить. Заполнить кювету растворителем – смесью метиленхлорида с этанолом (90:10), определить $\alpha_{p-ля}$. Затем рассчитать $[\alpha]_D^T$.

Вновь очистить и высушить кювету. Заполнить поляриметрическую трубку раствором ТАЦ в смеси метиленхлорида с этиловым спиртом и определить $\alpha_{p-ра}$. Вылить раствор, промыть и высушить кювету, заполнить растворителем, определить $\alpha_{p-ля}$ и рассчитать $[\alpha]_D^T$.

1.4. Оформление результатов

Результаты измерений оформить в виде таблицы 6.

Таблица 6

Протокол выполнения задания 1

Исследуемая система	Инструментальная поправка $\alpha_{п}$, град.	Угол вращения раствора $\alpha_{p-ра}$, град.	Угол вращения растворителя, $\alpha_{p-ля}$, град.	Измеряемый угол вращения α , град.	Концентрация раствора C , г/100мл	Длина кюветы ℓ , дм	$[\alpha]_D^T$, град·мл/дм·г
ДАЦ + ацетон: вода (95:5)					0.5		
ДАЦ + метиленхлорид: этанол (90:10)					0.5		
ТАЦ + метиленхлорид: этанол (90:10)					0.5		

При оформлении результатов работы написать структурные формулы ди- и триацетата целлюлозы. Сделать вывод о конформационном состоянии макромолекул ДАЦ и ТАЦ в исследуемых растворителях.

Задание 2. Определить величину удельного оптического вращения растворов хитозана в уксусной кислоте и ацетатном буфере.

Реактивы: хитозан (полученный в работе №1 либо промышленного производства), водные растворы уксусной кислоты

концентрации $C=0.33$ М и 0.66 М, водный раствор уксуснокислого натрия $C=0.4$ М.

Методика работы

2.1. Приготовление растворов

Приготовить 30 мл раствора хитозана в уксусной кислоте ($C=0.33$ М) концентрации 0.5 г/100мл и 30 мл раствора хитозана в ацетатном буфере (0.33 М CH_3COOH + 0.2 М CH_3COONa) такой же концентрации. Для этого взвесить на аналитических весах две навески полимера (с точностью до 0.001 г) на стеклянной чашечке. В один цилиндр налить рассчитанный объем 0.33 М CH_3COOH , в другой – рассчитанные равные объемы 0.66 М CH_3COOH и 0.4 М CH_3COONa . В одну колбу на 50 мл (или 100 мл) налить из мерного цилиндра $\approx 1/2$ часть объема CH_3COOH , в другую – $\approx 1/2$ часть объема ацетатного буфера. Затем в обе колбы высыпать (количественно) полимер и вылить оставшейся растворитель. Полное растворение хитозана в обеих колбах произойдет через ~ 1 час. Полученные растворы профильтровать через фильтр Шотта.

2.2. Определение влажности образца (см. работу №1, задания 1.3 и 2.2)

2.3. Определение величины удельного оптического вращения

Определить угол вращения плоскости поляризации раствора хитозана в уксусной кислоте, раствора хитозана в ацетатном буфере и растворителей (см. задание 1.3). Перед каждым измерением кювету необходимо промывать дистиллированной водой и высушивать на воздухе.

2.4. Оформление результатов

Результаты измерений оформить в виде таблицы 7.

Таблица 7

Протокол выполнения задания 2

Исследуемая система	Инструментальная поправка α_p , град.	Угол вращения раствора $\alpha_{р-ра}$, град.	Угол вращения растворителя, $\alpha_{р-ля}$, град.	Измеряемый угол вращения α , град.	Концентрация раствора C , г/100мл	Длина кюветы l , дм	$[\alpha]_D^T$, град.·мл/дм·г
Хитозан + CH_3COOH					0.5		
Хитозан + CH_3COOH + CH_3COONa					0.5		

При оформлении результатов работы написать структурные формулы хитозана и уксусно-кислой соли хитозана.

Задание 3. Определить величину удельного оптического вращения водных и солевых растворов карбоксиметилцеллюлозы разной концентрации. Построить концентрационную зависимость удельного оптического вращения.

Реактивы: карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), дистиллированная вода, водный раствор хлорида натрия $C=3\%$.

Методика работы

3.1. Приготовление растворов

Приготовить 50 мл водного раствора КМЦ концентрации ~ 0.12 г/100 мл и 50 мл солевого раствора КМЦ (растворитель – водный раствор NaCl , $C=3\%$) такой же концентрации (методику смешения реагентов см. в задании 1.1 и 2.1). Оставить колбы при комнатной температуре на 2 часа для растворения полимера. Если порошок КМЦ за указанный промежуток времени не растворится, необходимо продолжить растворение в водяной бане при $T=50-60^\circ\text{C}$. Полученные растворы профильтровать через фильтр Шотта.

Из исходного раствора КМЦ приготовить растворы различной концентрации посредством разбавления. Для этого взять 30 мл исходного водного (или солевого) раствора, налить в чистую колбу, добавить 30 мл дистиллированной воды (или раствора NaCl , $C=3\%$) и тщательно перемешать плавным покачиванием колбы. Из полученных растворов взять 30 мл, перелить в новую колбу, добавить 30 мл воды (или раствора NaCl) и т.д. Таким образом, необходимо получить 5 водных и 5 солевых растворов КМЦ с концентрациями ~ 0.06 , ~ 0.03 , ~ 0.015 и ~ 0.0075 г/100мл.

3.2. Определение влажности полимера (см. задание 2.2)

3.3. Определение величины удельного оптического вращения

Определить угол вращения плоскости поляризации приготовленных водных и солевых растворов КМЦ разной концентрации, дистиллированной воды и NaCl (см. задание 1.3). Для каждого раствора рассчитать величину удельного оптического вращения.

3.4. Оформление результатов

Результаты измерений оформить в виде таблицы 8.

Протокол выполнения задания 3

Исследуемая система	Инструментальная поправка $\alpha_{п}$, град.	Угол вращения раствора $\alpha_{р-ра}$, град.	Угол вращения растворителя, $\alpha_{р-ля}$, град.	Измеряемый угол вращения α , град.	Концентрация раствора C , г/100мл	Длина кюветы ℓ , дм	$[\alpha]_D^T$, град·мл/дм·г
КМЦ + H ₂ O					0.12		
					0.06		
					0.03		
					0.015		
					0.0075		
КМЦ + H ₂ O + NaCl					0.12		
					0.06		
					0.03		
					0.015		
					0.0075		

Построить зависимость $[\alpha]_D^T = f(C)$ для водных и солевых растворов КМЦ (на одном графике). При оформлении результатов работы написать структурную формулу КМЦ. Оценить конформационное состояние макромолекул КМЦ в разных растворителях.

Задание 4. Определить величину удельного оптического вращения растворов метилцеллюлозы в воде и в диметилсульфоксиде.

Реактивы: метилцеллюлоза (МЦ), дистиллированная вода, диметилсульфоксид (ДМСО).

Методика работы

4.1. Приготовление растворов

Приготовить 50 мл водного раствора МЦ концентрации 0.5 г/100 мл и 50 мл раствора МЦ в ДМСО такой же концентрации.

Приготовление водного раствора МЦ. Взвесить на аналитических весах рассчитанную навеску полимера (с точностью до 0.001 г) и поместить ее в термостойкую колбу на 100 мл. В другую термостойкую колбу на 100 мл (или 50 мл) налить из мерного цилиндра рассчитанное количество дистиллированной воды и довести до кипения на электрической плитке. Залить кипящей водой навеску

МЦ, оставить при комнатной температуре на 2 часа для набухания полимера. Растворение полимера продолжить при температуре ~4-5°C. Для этого колбу с набухшим полимером поместить в холодильник и оставить на 24 часа (или до следующего занятия). Полученный раствор профильтровать через капроновую ткань.

Приготовление раствора МЦ в ДМСО. Взвесить на аналитических весах рассчитанную навеску полимера (с точностью до 0.001 г), поместить в колбу на 100 мл, залить рассчитанным объемом ДМСО и растворять при $T=40-50^{\circ}\text{C}$, перемешивая систему магнитной мешалкой в течение 1-2 часов. Полученный раствор профильтровать через капроновую ткань.

4.2. Определение влажности полимера (см. задание 2.2)

4.3. Определение величины удельного оптического вращения

Определить угол вращения плоскости поляризации приготовленных растворов МЦ, воды и ДМСО (см. задание 1.3). Рассчитать величину удельного оптического вращения растворов МЦ.

4.4. Оформление результатов

Результаты измерений оформить в виде таблицы 9.

Таблица 9

Протокол выполнения задания 4

Исследуемая система	Инструментальная поправка $\alpha_{\text{п}}$, град.	Угол вращения раствора $\alpha_{\text{р-ра}}$, град.	Угол вращения растворителя, $\alpha_{\text{р-ля}}$, град.	Измеряемый угол вращения α , град.	Концентрация раствора C , г/100мл	Длина кюветы ℓ , дм	$[\alpha]_D^T$, $\frac{\text{град}\cdot\text{мл}}{\text{дм}\cdot\text{г}}$
МЦ + H ₂ O					0.5		
МЦ + ДМСО					0.5		

При оформлении результатов работы написать структурную формулу МЦ. Оценить конформационное состояние макромолекул МЦ в разных растворителях.

Задание 5. Определить величину удельного оптического вращения водных растворов пектина разной концентрации. Построить концентрационную зависимость удельного оптического вращения.

Реактивы: пектин, дистиллированная вода.

Методика работы

5.1. Приготовление растворов

Приготовить 50 мл водного раствора пектина концентрации 0.2 г/100 мл (методику смешения реагентов см. в задании 1.1 и 2.1). Раствор профильтровать через фильтр Шотта. Из исходного раствора пектина приготовить четыре раствора различной концентрации из диапазона 0.2–0.05 г/100мл посредством разбавления исходного раствора дистиллированной водой.

5.2. Определение влажности полимера (см. задание 2.2)

5.3. Определение величины удельного оптического вращения

Определить угол вращения плоскости поляризации приготовленных водных растворов пектина разной концентрации и дистиллированной воды (см. задание 1.3). Для каждого раствора рассчитать величину удельного оптического вращения.

5.4. Оформление результатов

Результаты измерений оформить в виде таблицы 10.

Таблица 10

Протокол выполнения задания 5

Исследуемая система	Инструментальная поправка $\alpha_{п}$, град.	Угол вращения раствора $\alpha_{р-ра}$, град.	Угол вращения раствора $\alpha_{р-ля}$, град.	Измеряемый угол вращения α , град.	Концентрация раствора C , г/100мл	Длина кюветы ℓ , дм	$[\alpha]_D^T$, град·мл/дм·г
Пектин + H ₂ O					1		
					0.6		
					0.4		
					0.2		
					0.1		

Построить графическую зависимость $[\alpha]_D^T = f(C)$ для исследуемых растворов, сделать вывод. При оформлении результатов работы написать структурную формулу пектина.

Задание 6. Определить величину удельного оптического вращения водного раствора альгината натрия или агароида (агар-агара).

Реактивы: агар-агар, дистиллированная вода.

Методика работы

6.1. Приготовление раствора

Приготовить 50 мл водного раствора агар-агара концентрации 0.05 г/100 мл (методику смешения реагентов см. в задании 1.1 и 2.1).

Растворение проводить на кипящей водяной бане в течение 3-4 часов. Содержимое колбы периодически перемешивать (либо стеклянной палочкой, либо плавным покачиванием колбы). Раствор профильтровать через капроновую ткань.

6.2. Определение влажности образца полимера (см. задание 2.2)

6.3. Определение величины удельного оптического вращения

Определить угол вращения плоскости поляризации приготовленного раствора агар-агара (см. задание 1.3). Рассчитать величину удельного оптического вращения.

6.4. Оформление результатов

Результаты измерений оформить в виде таблицы 11.

Таблица 11

Протокол выполнения задания 6

Исследуемая система	Инструментальная поправка $\alpha_{\text{п}}$, град.	Угол вращения раствора $\alpha_{\text{р-ра}}$, град.	Угол вращения растворителя. $\alpha_{\text{р-ля}}$, град.	Измеряемый угол вращения α , град.	Концентрация раствора C , г/100мл	Длина кюветы ℓ , дм	$[\alpha]_D^T$, $\frac{\text{град} \cdot \text{мл}}{\text{дм} \cdot \text{г}}$
Агар-агар + H ₂ O					0.05		

При оформлении результатов работы написать структурную формулу агароида.

Задание 7. Определить величину удельного оптического вращения водных растворов крахмала.

Реактивы: водорастворимый крахмал, дистиллированная вода.

Методика работы

7.1. Приготовление растворов

Приготовить по 50 мл водных растворов крахмала концентрации 0.25% и 0.125%. Для этого взвесить на аналитических весах рассчитанную навеску полимера (с точностью до 0.001 г), в цилиндр налить дистиллированную воду. В колбу на 100 мл налить $\approx 3/4$ части воды из мерного цилиндра и нагреть до кипения на электрической плитке. Оставшуюся $\approx 1/4$ часть воды смешать с полимером и добавить (при перемешивании стеклянной палочкой) полученную смесь в кипящую воду. Полученные растворы охладить до комнатной температуры и профильтровать через капроновую ткань.

7.2. Определение влажности образца (см. задание 2.2)

7.3. Определение величины удельного оптического вращения

Определить угол вращения плоскости поляризации растворов крахмала и дистиллированной воды (см. задание 1.3). Рассчитать величину удельного оптического вращения растворов полимера.

7.4. Оформление результатов

Результаты измерений оформить в виде таблицы 12.

Таблица 12

Протокол выполнения задания 7

Исследуемая система	Инструментальная поправка $\alpha_{п}$, град.	Угол вращения раствора $\alpha_{р-ра}$, град.	Угол вращения раствора $\alpha_{р-ля}$, град.	Измеряемый угол вращения α , град.	Концентрация раствора C , %	Длина кюветы ℓ , дм	$[\alpha]_D^T$, град·мл/дм·г
Крахмал + H ₂ O					0.25		
Крахмал + H ₂ O					0.125		

При оформлении результатов работы написать структурные формулы углеводов крахмала (амилозы и амилопектина).

Задание 8. Определить величину удельного оптического вращения продуктов кислотного гидролиза водорастворимой фракции крахмала.

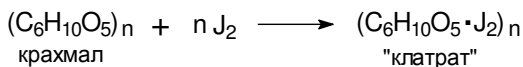
Реактивы: водорастворимый крахмал, дистиллированная вода, серная кислота $C=10\%$, раствор NaOH $C=0.05$ Н, раствор йода, раствор сульфата меди (II) $C=5\%$.

Методика работы

8.1. Приготовление растворов

Приготовить 200 мл водного раствора крахмала концентрации 2% (см. задание 7.1).

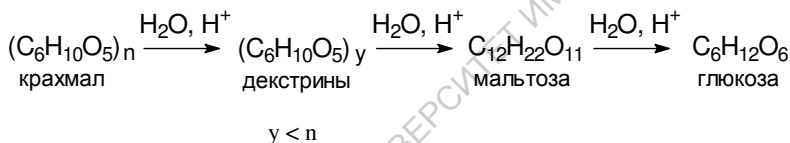
Провести качественную реакцию на крахмал. Для этого в пробирку отобрать 2 мл крахмального клейстера и добавить 1-2 капли раствора йода. Должно появиться синее окрашивание за счет образования соединения включения («клатрата»):



При нагревании синее окрашивание должно исчезать, а при охлаждении появляться вновь.

8.2. Кислотный гидролиз крахмала

В коническую колбу на 250 мл поместить 200 мл крахмального клейстера ($C=2\%$), добавить 40 мл серной кислоты ($C=10\%$) и тщательно перемешать стеклянной палочкой. Полученную смесь поместить на песчаную баню и кипятить в течение 30 минут. В процессе кипячения системы каждые 5 минут брать пробы гидролизата, отливая в отдельную колбу ($V=50$ мл) по 15 мл горячей жидкости. Отобранные пробы необходимо быстро охладить под струей водопроводной воды и нейтрализовать (для прекращения дальнейшего процесса гидролиза) раствором гидроксида натрия. Процесс нейтрализации контролировать по индикаторной бумаге. Схема кислотного гидролиза крахмала приведена ниже.



Для контролирования процесса гидролиза крахмала провести качественный анализ продуктов реакции. В отдельные пробирки отобрать по 2-3 мл нейтрализованных гидролизатов из каждой пробы и добавить по 1-2 капли раствора йода. В последовательно отобранных пробах должно наблюдаться постепенное изменение окраски растворов при реакции с йодом за счет образующихся декстринов по мере убывания величины повторяющихся звеньев их молекул: сине-фиолетовая, красно-фиолетовая, красно-оранжевая, оранжевая, желтая. Желтая окраска раствора указывает, что гидролиз крахмала закончен.

Для подтверждения полноты протекания реакции гидролиза провести качественную реакцию на глюкозу. В пробирку с нейтрализованной пробой гидролизата, показавшую желтое окрашивание, добавить 2-3 капли раствора сульфата меди (II), несколько капель раствора щелочи до появления интенсивной синей окраски раствора (окрашивание жидкости происходит вследствие образования комплексных алкоголятов меди (сахаратов)). Образующийся первоначально осадок гидроксида меди (II) необходимо растворить энергичным встряхиванием пробирки.

Протокол выполнения задания 8

№	Время реакции, τ , мин	Инструментальная поправка $\alpha_{п}$, град.	Угол вращения раствора $\alpha_{р-ра}$, град.	Угол вращения растворителя, $\alpha_{р-ля}$, град.	Измеряемый угол вращения α , град.	Концентрация раствора C , %	Длина кюветы l , дм	$[\alpha]_D^T$, $\frac{\text{град} \cdot \text{мл}}{\text{дм} \cdot \text{г}}$
1						2		
2								
...								
n								

Построить графическую зависимость изменения величины удельного оптического вращения $[\alpha]_D^T$ в процессе кислотного гидролиза крахмала ($[\alpha]_D^T = f(\tau)$).

При оформлении результатов работы написать уравнения химических реакций и структурные формулы углеводов крахмала.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Илиел Э., Вайлен С., Дойл М. Основы органической стереохимии. Пер. с англ. З.А. Бредихиной. Под ред. А.А. Бредихина. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2007. 703 с.
2. Птичкин И.И., Птичкина Н.М. Пищевые полисахариды: структурные уровни и функциональность. Саратов: Изд-во ФГОУ ВПО «Саратовский ГАУ». 2005. 164 с.
3. Бакстон Ш., Робертс С. Введение в стереохимию органических соединений. Пер. с англ. В.М. Демьянович. М.: Мир. 2005. 311 с.
4. Нолтинг Б. Новейшие методы исследования биосистем. Пер. с англ. Н.Н. Хромова-Борисова. М.: Техносфера. 2005. 256 с.
5. Илиел Э. Основы стереохимии. 2-е изд. Пер. с англ. В.М. Демьянович. Под ред. В.М. Потапова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 2005. 119 с.
6. Шиповская А.Б., Кленин В.И., Сударушкин Ю.К. Реология полимерных систем: Учеб. пособие. 2-е изд., пер. и доп. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та. 2004. 68 с.
7. Пентин Ю.А., Вилков Л.В. Физические методы исследования в химии. М.: Мир. ООО «Изд-во АСТ». 2003. С.555-604.
8. Грандберг И.И. Органическая химия: Учеб. для студ. вузов, обучающихся по агроном. спец. М.: Дрофа. 2001. 672 с.
9. Оои Т., Ицука Э., Онари С. и др. Биополимеры. Пер. с японск. Под ред. В.В. Коршака, И.А. Ямскова. М.: Мир. 1988. 544 с.
10. Дашевский В.Г. Конформационный анализ макромолекул. М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит. 1987. 288 с.
11. Кочетков Н.К., Бочков А.Ф., Дмитриев Б.А. и др. Химия углеводов. М.: Химия. 1967. 672 с.
12. Йиргенсонс Б. Природные органические макромолекулы. Пер. с англ. Л.Н. Акимовой, М.С. Хлудовой. Под ред. Г.Д. Вовченко. М.: МИР. 1965. 556 с.

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ	3
1. КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ	5
2. ОБЩИЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ПРИРОДНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ	9
2.1. Фракционное осаждение и экстракция	9
2.2. Фильтрование, ультрафильтрование, диализ	11
2.3. Ферментативная очистка	13
2.4. Хроматографические методы	14
2.5. Электрофорез	20
2.6. Ультрацентрифугирование	20
2.7. Критерии индивидуальности и нативности полисахарида	21
3. ОПТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДОВ	22
4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	26
Работа №1. Получение и свойства полисахаридов животного происхождения	26
Задание 1. Выделение хитина из панцирей речного рака	26
Задание 2. Проведение химической реакции полимераналогичного превращения хитин – хитозан	29
Задание 3. Сравнительный анализ растворимости образцов хитина и хитозана в различных средах	33
Работа №2. Получение и свойства полисахаридов растительного происхождения	34
Задание 1. Выделение и количественное определение пектиновых веществ из кожуры цитрусовых	34
Задание 2. Выделение пектина из мякоти тыквы	37
Задание 3. Провести сравнительный анализ гелеобразующей способности пектина цитрусовых с тыквенным пектином	39
Работа №3: Определение фракционного состава целлюлозосодержащего сырья	40

Задание 1. Определение содержания α -целлюлозы	40
Задание 2. Определение содержания β - и γ -целлюлозы	41
Работа №4. Определение удельного оптического вращения растворов полисахаридов	44
Задание 1. Определение величины удельного оптического вращения растворов ацетатов целлюлозы	49
Задание 2. Определение величины удельного оптического вращения растворов хитозана в уксусной кислоте и ацетатном буфере	51
Задание 3. Определение величины удельного оптического вращения водных и солевых растворов карбоксиметилцеллюлозы разной концентрации. Построение концентрационной зависимости удельного оптического вращения растворов полисахарида	53
Задание 4. Определение величины удельного оптического вращения растворов метилцеллюлозы в воде и в диметилсульфоксиде	54
Задание 5. Определение величины удельного оптического вращения водных растворов пектина разной концентрации. Построение концентрационной зависимости удельного оптического вращения растворов пектина	55
Задание 6. Определение величины удельного оптического вращения водного раствора агарида (агар-агара)	56
Задание 7. Определение величины удельного оптического вращения водных растворов крахмала	57
Задание 8. Определение величины удельного оптического вращения продуктов кислотного гидролиза водорастворимой фракции крахмала	58
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	62