

# 39-я Международная Химическая Олимпиада

*Химия: искусство, наука, забава*



## Тренировочные задачи (Практический тур)

15-24 Июля 2007г

Москва, Россия

## **СОДЕРЖАНИЕ**

ПРАВИЛА РАБОТЫ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.....	3
ПРЕДУПРЕЖДАЮЩАЯ МАРКИРОВКА ХИМИЧЕСКИХ РЕАКТИВОВ,.....	4
Задача 29. ТИТРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА В РАЗНЫХ СТЕПЕНЯХ ОКИСЛЕНИЯ.....	6
Задача 30. АСИММЕТРИЧЕСКИЙ АВТОКАТАЛИЗ – ЧИСЛЕННЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ.....	11
Задача 31. КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ .....	13
Задача 32. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ КИСЛОТНОСТИ БРОМКРЕЗОЛОВОГО СИНЕГО (3',3'',5',5''-ТЕТРАБРОМ-М-КРЕЗОЛСУЛЬФОНФТАЛЕИН, БКС).....	15
Задача 33. КИСЛОТНЫЙ ОРАНЖЕВЫЙ 7 .....	18
Задача 34. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БЕЛКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ.....	21

## **ПРАВИЛА РАБОТЫ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ**

Мы уделяем огромное внимание безопасности во время экспериментальной работы. Ниже приведены правила, обязательные для исполнения во время практического тура МХО–2007. Мы надеемся, что вы примете во внимание эти правила и при подготовке к Олимпиаде.

- Участники должны иметь собственные лабораторные халаты.
- Перед работой участникам будут письменно разъяснены правила техники безопасности на их родном языке. Каждый участник должен внимательно с ними ознакомиться и подтвердить это своей подписью.
- Перед работой участники должны ознакомиться с расположением запасных выходов, лабораторного душа, пожарного одеяла и промывалки для глаз.
- В лаборатории нужно находиться только в лабораторном халате, перчатках и защитных очках.
- Запрещено приносить в лабораторию сумки и верхнюю одежду. Их следует оставлять в гардеробе
- В лаборатории строго воспрещается есть, пить, курить и пробовать химические реактивы на вкус
- Строго воспрещается ртом набирать растворы в пипетку.
- Организаторы постарались исключить использование агрессивных химических реактивов во время практического тура Олимпиады. Все потенциально опасные реактивы будут маркированы международными символами. Каждый участник обязан уметь их распознавать и понимать их значение.
- Не выливайте химические реактивы в раковину. Следуйте инструкциям по утилизации реактивов, выданным Организаторами.
- Без колебаний задавайте лаборанту вопросы, касающиеся техники безопасности.

Невозможно создать правила на все случаи жизни, поэтому мы надеемся на ваш здравый смысл и персональную ответственность.

Желаем удачи при подготовке и во время практического тура!

## **ПРЕДУПРЕЖДАЮЩАЯ МАРКИРОВКА ХИМИЧЕСКИХ РЕАКТИВОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ВО ВРЕМЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ТУРА**

### **R-МАРКИРОВКА**

- R5: Нагревание может повлечь взрыв
- R8: Контакт с горючими материалами может вызвать возгорание
- R9: Образует взрывоопасные смеси с горючими материалами
- R10: Огнеопасно
- R11: Очень огнеопасно
- R20: Опасно при вдыхании
- R22: Опасно при проглатывании
- R23: Ядовито при вдыхании
- R25: Ядовито при проглатывании
- R34: Вызывает ожоги
- R35: Вызывает сильные ожоги
- R36: Раздражает глаза
- R37: Раздражает дыхательную систему
- R40: Имеются указания на канцерогенный эффект
- R43: Может вызвать повышенную чувствительность кожи
- R50: Очень ядовито для водных организмов
- R61: Опасно при беременности
- R20/21/22: Опасно при вдыхании, контакте с кожей и проглатывании
- R23/24/25: Ядовито при вдыхании, контакте с кожей и проглатывании
- R36/38: Раздражает глаза и кожу
- R36/37/38: Раздражает глаза, дыхательную систему и кожу
- R50/53: Очень ядовито для водных организмов, может вызвать долговременные неблагоприятные последствия для водной среды

### **S-МАРКИРОВКА**

- S2: Беречь от детей
- S7: Хранить плотно закрытым
- S16: Хранить вдали от источников огня – Не курить
- S17: Хранить вдали от горючих материалов
- S22: Не вдыхать пыль
- S23: Не вдыхать газ/пары/аэрозоль (указано производителем)

S24: Избегать контакта с кожей

S26: При попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться за медицинской помощью

S28: При контакте с кожей немедленно промыть большим количеством ... (указано производителем)

S30: Беречь от воды

S35: Емкость и ее содержимое следует утилизировать с осторожностью

S36: Используйте защитную одежду

S37: Используйте защитные перчатки

S38: При недостаточной вентиляции используйте противогаз

S45: В случае неосторожного обращения или плохого самочувствия немедленно обратитесь за медицинской помощью (укажите данный знак где только возможно)

S60: Емкость и ее содержимое следует утилизировать как опасные отходы

S61: Не допускать попадания в окружающую среду. Используйте специальные инструкции по безопасности

S1/2: Хранить плотно закрытым. Беречь от детей

S36/37: Используйте защитные перчатки и одежду

S36/37/39: Используйте защитные перчатки, очки и одежду

S37/39: Используйте защитные перчатки и очки

## **Задача 29. ТИТРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА В РАЗНЫХ СТЕПЕНЯХ ОКИСЛЕНИЯ**

Некоторые методы определения железа в степенях окисления +2 и +3 обсуждаются в Задаче 12. Предлагаем вам на практике познакомиться еще с одним методом.

### **Необходимые реактивы и растворы**

$\text{KIO}_3$  (R9, R22, R36/37/38, S35), ч.д.а., твердый

Аскорбиновая кислота, твердая

KI (R36/38, R42-43, R61; S26, S36/37/39, S45), 5% водный раствор

HCl (R34, R37, S26, S36, S45), конц. и 2 М раствор

$\text{HNO}_3$  (R8, R35, S1/2, S23, S26, S36, S45), конц.

Сульфосалициловая кислота, 25% водный раствор

$\text{NH}_3$  (R10, R23, R34, R50, S1/2, S16, S36/37/39, S45, S61), 10% водный раствор

EDTA (R36, S26), стандартный раствор, концентрация около 0.05 М (точная концентрация будет указана)

### **1. Приготовление раствора $\text{KIO}_3$ – первичного стандарта**

1.1. Рассчитайте с точностью до 0.0001 г массу  $\text{KIO}_3$ , необходимую для приготовления 200.0 мл 0.01000 М раствора  $\text{KIO}_3$ .

1.2. На аналитических весах возьмите навеску  $\text{KIO}_3$  с точностью не менее 0.0001 г. Масса навески должна отличаться от вычисленной не более, чем на 0.05 г

1.3. Перенесите навеску в 200.0 мл мерную колбу, доведите водой до метки.

1.4. Рассчитайте точную мольную концентрацию приготовленного раствора.

### **2. Приготовление раствора титранта – аскорбиновой кислоты**

2.1. Рассчитайте с точностью до 0.01 г массу аскорбиновой кислоты, необходимую для приготовления 200.0 мл 0.1 М раствора.

2.2. На технических весах возьмите навеску аскорбиновой кислоты. Масса навески должна отличаться от вычисленной не более, чем на 0.05 г

2.3. Поместите навеску в коническую колбу, добавьте 200 мл воды, тщательно перемешайте и закройте пробкой.

### 3. Стандартизация раствора аскорбиновой кислоты

3.1. Заполните бюретку приготовленным раствором аскорбиновой кислоты.

3.2. Пипеткой отберите 10.00 мл аликвоту стандартного раствора  $KIO_3$  и поместите ее в 100 мл коническую колбу. Добавьте 20 мл 5% раствора  $KI$  и 5 мл 2M раствора  $HCl$ .

3.3. Титруйте смесь раствором аскорбиновой кислоты до исчезновения окрашивания.

**Примечание.** Часто при титровании иода восстановителями к титруемому раствору добавляют крахмал в качестве индикатора. В данном случае этого делать не рекомендуется, так как в присутствии крахмала реакция значительно замедляется.

3.4. Повторяйте титрование до тех пор, пока не будут получены три результата, отличающиеся не более чем на 0.10 мл.

3.5. Рассчитайте средний объем затраченного титранта.

3.6. Рассчитайте мольную концентрацию аскорбиновой кислоты в растворе.

### Вопросы

1. Напишите уравнения всех реакций, протекающих во время стандартизации раствора аскорбиновой кислоты. Учтите, что аскорбиновая кислота  $C_6H_8O_6$  при этом превращается в дегидроаскорбиновую  $C_6H_6O_6$ .

2. В присутствии избытка иодида калия  $KIO_3$  может быть использован как первичный стандарт для растворов  $HCl$ . Метод аналогичен предыдущему за исключением того, что  $HCl$  в данном случае к титруемому раствору не добавляется. Какие вещества могут быть использованы как индикаторы для данной реакции:

- крахмал
- сульфосалициловая кислота
- метиловый оранжевый
- метиловый оранжевый +  $Na_2S_2O_3$  (в избытке)

#### 4. Определение $Fe(III)$ с помощью аскорбинометрии

4.1. Получите у лаборанта исследуемый раствор, содержащий  $Fe(II)$  и  $Fe(III)$  (в 100.0 мл мерной колбе). Доведите водой до метки и перемешайте.

4.2. Заполните бюретку стандартным раствором аскорбиновой кислоты.

4.3. Пипеткой отберите 10.00 мл аликвоту исследуемого раствора, поместите ее в 100 мл коническую колбу, добавьте 40 мл воды и нагрейте почти до кипения.

4.4. Добавьте в раствор 4-5 капель 25% раствора сульфосалициловой кислоты в качестве индикатора.

4.5. Титруйте раствор до исчезновения фиолетовой окраски. Во время титрования и особенно около конечной точки раствор должен быть горячим. Если необходимо, периодически подогревайте колбу. Вблизи конечной точки титровать следует медленно.

4.6. Повторяйте титрование до тех пор, пока не будут получены три результата, отличающиеся не более чем на 0.10 мл.

4.7. Рассчитайте средний объем затраченного титранта.

4.8. Рассчитайте массу  $Fe(III)$  в выданном вам образце.

**Примечание.** Аскорбиновая кислота неустойчива и легко окисляется кислородом воздуха, особенно в водных растворах. Поэтому стандартизацию раствора и его использование следует проводить в один день.

## Вопросы

1. Напишите уравнения всех реакций, протекающих при определении Fe(III). Аскорбиновая кислота  $C_6H_8O_6$  при этом окисляется до дегидроаскорбиновой  $C_6H_6O_6$ .

2. В какой среде аскорбиновая кислота наиболее ярко проявляет восстановительные свойства?

- в кислой
- в нейтральной
- в основной
- ее восстановительные свойства не зависят от pH

## 5. Определение общего количества железа с помощью комплексометрического титрования

5.1. Заполните бюретку стандартным раствором ЭДТА.

5.2. Пипеткой отберите отберите 10.00 мл аликвоту исследуемого раствора и поместите ее в 100 мл коническую колбу. Добавьте 5 мл концентрированной HCl и 2 мл концентрированной  $HNO_3$  для полного окисления Fe(II) до Fe(III). Накройте колбу часовым стеклом, нагрейте до кипения и продолжайте нагревание в течение 3-5 минут, стараясь избежать разбрызгивания.

5.3. Охладите раствор и осторожно нейтрализуйте, по каплям добавляя 10% раствор  $NH_3$  до возникновения небольшого помутнения и изменения окраски от лимонно-желтой до коричневой.

5.4. Добавьте несколько капель 2 M HCl для растворения осадка, затем прилейте еще 0.5 мл, разбавьте водой до 50 мл и нагрейте почти до кипения.

5.5. В горячий раствор добавьте 4-5 капель раствора сульфосалициловой кислоты в качестве индикатора.

5.6. Титруйте до изменения окраски от фиолетовой до чисто желтой. Во время титрования и особенно около конечной точки раствор должен быть горячим. Если необходимо, периодически подогревайте колбу. Вблизи конечной точки титровать следует медленно.

5.7. Повторяйте титрование до тех пор, пока не будут получены три результата, отличающиеся не более чем на 0.10 мл.

5.8. Рассчитайте средний объем затраченного титранта.

5.9. Рассчитайте общую массу железа в выданном вам образце.

5.10. Рассчитайте массу Fe(II) как разницу чисел, полученных при ответах на вопросы 5.9 и 4.8.

## Вопросы

1. Напишите уравнения всех реакций, протекающих при определении общего количества железа.

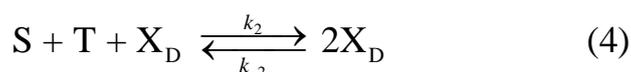
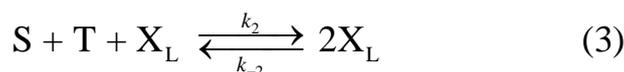
2. При комплексонометрическом определении Fe(III) необходимо строго контролировать кислотность раствора. Почему?

- Если кислотность слишком низка, выпадает осадок  $\text{Fe}(\text{OH})_3$
- Если кислотность слишком велика, Fe(III) не образует комплекс с сульфосалициловой кислотой
- Если кислотность слишком велика, Fe(III) не образует комплекс с ЭДТА
- Если кислотность слишком низка и/или велика, ЭДТА разлагается

**Задача 30. АСИММЕТРИЧЕСКИЙ АВТОКАТАЛИЗ – ЧИСЛЕННЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ**

Нарушение хиральной симметрии в живой природе (L-аминокислоты и D-углеводы) до сих пор остается загадкой. Одно из объяснений этого явления основано на идее автокатализа. Хиральный (асимметрический) автокатализ – это реакция, в которой хиральный продукт служит катализатором своего собственного образования. В таких реакциях малый избыток одного из двух энантиомеров, который может образоваться в результате флуктуации, экспоненциально возрастает с течением времени.

Рассмотрим кинетическую схему, объясняющую это явление. Два энантиомера,  $X_L$  и  $X_D$ , обратимо образуются из реагентов T и S:



Энантиомеры реагируют между собой, давая продукт P. Реакции протекают в открытой системе, где концентрации реагентов T и S поддерживаются постоянными.

Система кинетических уравнений может быть решена численно с помощью любого математического программного пакета, например Mathematica, MathCad, и т.д. Также может быть использована программа KINET, размещенная на официальном сайте [www.icho39.chem.msu.ru](http://www.icho39.chem.msu.ru). Примем следующие значения кинетических констант, выраженные в относительных единицах:  $k_1 = 0.5$ ,  $k_{-1} = 0.1$ ,  $k_2 = 0.5$ ,  $k_{-2} = 0.2$ ,  $k_3 = 0.5$ .

**Методика**

Для численного решения системы дифференциальных уравнений различные программные пакеты используют разные команды. В Mathematica такой командой является NDSolve. Аргументами команды являются: система уравнений, начальные условия и временной интервал. Например, система уравнений

$$a'(t) = -a(t)p(t)$$

$$p'(t) = a(t)p(t) - 2 \cdot p(t)$$

с начальными условиями  $a(0) = 2$ ,  $p(0) = 0.5$  на временном интервале от  $t = 0$  до  $t = 10$  численно решается в результате выполнения команды:

```
sol=NDSolve [{a'[t]==-a[t]*p[t], p'[t]==a[t]*p[t]-2*p[t], a[0]==2, p[0]==0.5},
  {a, p}, {t, 0,10}]
```

Полученное решение может быть представлено в виде графика с помощью команды Plot:

```
Plot [Evaluate [{a [t], p [t]}/.sol, {t, 0,10}], PlotRange-> All]
```

## Вопросы

1. Сравните реакции 1 и 2 или 3 и 4 в вышеприведенной схеме. Почему константы скорости одинаковы для энантиомеров  $X_L$  и  $X_D$ ?

2. Управляющим параметром данной модели является произведение концентраций реагентов. Численно решите систему кинетических уравнений и представьте на одном графике кривые зависимости  $X_L$  и  $X_D$  с начальными условиями:  $[X_L]_0 = 0$ ,  $[X_D]_0 = 0.01$  для двух случаев: произведение  $[S][T]$  мало, произведение  $[S][T]$  велико. Варьируя значение параметра  $[S][T]$ , определите пороговое значение, выше которого форма кривых качественно меняется.

3. При заданном значении  $[S][T] = 5$  исследуйте влияние начальной хиральной асимметрии на кинетические кривые. Рассмотрите два случая:  $[X_D]_0 = 0.001$ ,  $[X_D]_0 = 0.1$ .

Попробуем определить элементарные стадии, ответственные за усиление хиральной асимметрии.

4. Выясним роль обратимости. Для этого сравним кинетические кривые при одних и тех же начальных условиях для двух моделей: с обратимым ( $k_{-1} \neq 0$ ;  $k_{-2} \neq 0$ ) и необратимым ( $k_{-1} = k_{-2} = 0$ ) образованием энантиомеров.

5. Проанализируем упрощенную схему, в которой отсутствуют две первые реакции. Возможно ли усиление хиральной асимметрии в такой системе?

6. Сравним открытую и закрытую системы. Открытую систему вы уже исследовали. В закрытой системе реагенты S и T не поступают в реакционную смесь, и поэтому теперь их нужно включить в систему кинетических уравнений. Возможно ли усиление хиральной асимметрии в закрытой системе?

Сделайте выводы. Какие условия необходимы для усиления хиральной асимметрии? Какие элементарные стадии ответственны за это?

### **Задача 31. КОЛЕБАТЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ**

#### **Введение**

В 1921 году У. Брэй опубликовал статью, посвященную колебательному характеру окисления перекиси водорода иодатом калия. Однако тщательное изучение механизмов колебательных реакций началось лишь в 1951 году, когда Б.П. Белоусов обнаружил колебания концентраций окисленной и восстановленной форм церия, катализирующего окисление лимонной кислоты бромат-ионом. Позже было показано, что колебания возможны и в других окислительно-восстановительных системах. А.М. Жаботинский изучал окисление малоновой кислоты бромат-ионом в присутствии ионов марганца. Механизм этой реакции чрезвычайно сложен и включает десятки промежуточных веществ.

Мы изучим колебательную реакцию между малоновой кислотой и иодат-ионом в присутствии соли марганца и перекиси водорода.

#### **Реактивы и оборудование**

- 1) 40 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (R5, R8, R20, R22, R35; S1/2, S17, S26, S28, S36/37/39, S45)
- 2)  $\text{KIO}_3$  (R9, R22, R36/37/38, S35).
- 3) конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (R23/24/25, R35, R36/37/38, R49, S23, S30, S36/37/39, S45)
- 3)  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4$ , малоновая кислота (R20/21/22, S26, S36/37/39)

- 4)  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (R20/21/22, R36/37/38, R40, S26, S36)
- 5) крахмал
- 6) раствор KI (R36/38, R42-43, R61; S26, S36/37/39, S45)
- 7) раствор  $\text{AgNO}_3$  (R34, R50/53, S1/2, S26, S45, S60, S61)
- 8) аналитические весы
- 9) чашки для взвешивания
- 10) плоскодонные колбы или стаканы (250-500 мл), 4 штуки
- 11) секундомер

## Методика

Приготовьте три раствора (можно это сделать заранее):

- 1) раствор 80 мл 40 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  в 120 мл воды,
- 2) раствор 8.7 г  $\text{KIO}_3$  и 0.9 мл конц.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в 190 мл воды,
- 3) раствор 3 г  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_4$ , 2.4 г  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  и 0.06 г крахмала в 195 мл воды.

Смешайте растворы в одном сосуде и наблюдайте колебательный процесс. Определите период колебаний и его изменение во времени.

Разделите смесь на две части и поместите в стаканы.

К одной части добавьте раствор  $\text{AgNO}_3$  (сначала – несколько капель, затем ~3 мл). Наблюдайте изменение периода колебаний. Отметьте цвет раствора по окончании колебательного процесса.

К другой части добавьте раствор KI (несколько капель). Наблюдайте изменения в периоде колебаний.

## Вопросы

1. Окисление малоновой кислоты иодатом калия – автокаталитический процесс. Напишите полное уравнение реакции. Какой продукт катализирует колебательный процесс? Объясните действие нитрата серебра.

2. Б.П. Белоусов использовал в качестве окислителя бромат-ион. Предположите, что произойдёт при замене иодата на бромат в реакции с малоновой кислотой. Какую роль играет пероксид водорода при окислении малоновой кислоты иодатом?

3. Хорошо известно, что одной из стадий колебательного процесса является образование иодмалоновой кислоты и её последующее разложение. Как можно объяснить, что иодид калия ингибирует реакцию?

4. Б.П. Белоусов использовал редокс-пару  $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$  для изучения колебательных реакций. Возможно ли использование следующих редокс-пар переходных металлов в качестве катализаторов:  $\text{Co}^{3+}/\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Tl}^{3+}/\text{Tl}^{1+}$ ?

$$E^\circ(\text{Co}^{3+}/\text{Co}^{2+}) = 1.81 \text{ В,}$$

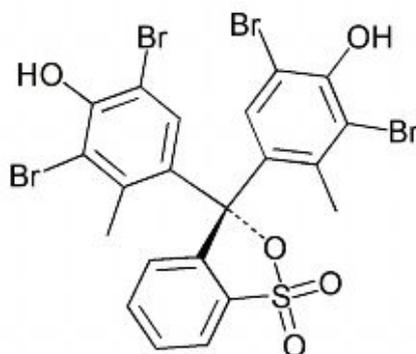
$$E^\circ(\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}) = 1.61 \text{ В,}$$

$$E^\circ(\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}) = 1.51 \text{ В,}$$

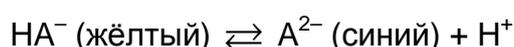
$$E^\circ(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}) = 0.77 \text{ В?}$$

### Задача 32. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ КИСЛОТНОСТИ БРОМКРЕЗОЛОВОГО СИНЕГО (3',3'',5',5''-ТЕТРАБРОМ-М-КРЕЗОЛСУЛЬФОНФТАЛЕИН, БКС)

Бромкрезоловый синий (БКС)



представляет собой органический краситель, используемый в качестве кислотно-основного индикатора и являющийся слабой двухосновной кислотой ( $\text{H}_2\text{A}$ ). Водные растворы БКС изменяют свою окраску с желтой на синюю в диапазоне рН 3-6 в результате отщепления второго протона:



На основании зависимости оптической плотности раствора БКС от pH можно рассчитать константу его кислотной диссоциации по второй ступени,  $pK_{a2}$ .

### Используемые реагенты и растворы

Бромкрезоловый синий, 0.25% раствор в 50% водном этаноле (R11, S2, S7, S16).

Смесь кислот для приготовления буферных растворов: водные растворы  $H_3PO_4$  (R34, S1/2, S26, S45),  $CH_3COOH$  (R10, R35, S1/2, S23, S26, S45) и  $H_3BO_3$  (S22, S26, S36/37, S38, S45), каждый 0.04 М.

NaOH (R35, S1/2, S26, S37/39, S45), 0.2 М и 2 М растворы.

HCl (R34, R37, S26, S36, S45), 2 М раствор.

### 1. Выбор оптимальной длины волны для определения $K_{a2}$

1.1. В две 50.0 мл мерные колбы поместите 1.00 мл раствора БКС и 10.00 мл смеси кислот (см. список реагентов). Затем добавьте 1.00 мл 0.2 М раствора NaOH в первую и 6.00 мл раствора 2 М NaOH во вторую колбу. Разбавьте растворы водой до метки и перемешайте.

1.2. Измерьте pH приготовленных растворов. Первый должен иметь pH порядка 2-3, второй – порядка 7-8. В этих условиях весь БКС находится в форме  $HA^-$  или  $A^{2-}$ , соответственно. Если какое-либо значение pH отличается от требуемого, измените его, добавив несколько капель 2 М HCl или 2 М NaOH.

1.3. Измерьте спектр поглощения растворов в интервале 400-700 нм; 5-10 точек будет достаточно.

1.4. Выберите длину волны, при которой разница в оптической плотности растворов наибольшая. Обычно эта длина волны соответствует максимуму поглощения одного из образцов или близка к ней. Далее проводите все измерения при этой длине волны.

**2. Приготовление серии растворов БКС, измерение их поглощения и рН**

2.1. В каждую из двенадцати 50.0 мл мерных колб поместите 1.00 мл раствора БКС и 10.00 мл смеси кислот. Затем добавьте 0.2 М NaOH в каждую колбу в количестве, указанном в таблице ниже:

Номер колбы	0,2 М NaOH, мл
1	0.75
2	1.50
3	2.50
4	2.75
5	3.00
6	3.25
7	3.50
8	3.75
9	4.00
10	4.25
11	5.25
12	6.25

Разбавьте растворы водой до метки и перемешайте.

**Примечание.** Необходимо, чтобы концентрация БКС была абсолютно одинакова во всех растворах. Обратите на это особое внимание при приготовлении растворов!

2.2. Для каждого раствора измерьте рН и оптическую плотность при выбранной длине волны.

2.3. Из полученных данных рассчитайте значение  $\lg K_{a2}$  для каждого исследованного раствора (исключая те, в которых содержание одной из форм красителя ничтожно мало по сравнению с другой).

2.4. Рассчитайте среднее значение  $\lg K_{a2}$ .

**Вопросы**

Обозначим:

$[HA^-]$ ,  $[A^{2-}]$ ,  $c$  – равновесные концентрации соответствующих форм БКС и его полная концентрация, соответственно;

$l$  – длина кюветы;

$K_{a2}$  – константа кислотности  $\text{HA}^-$ ;

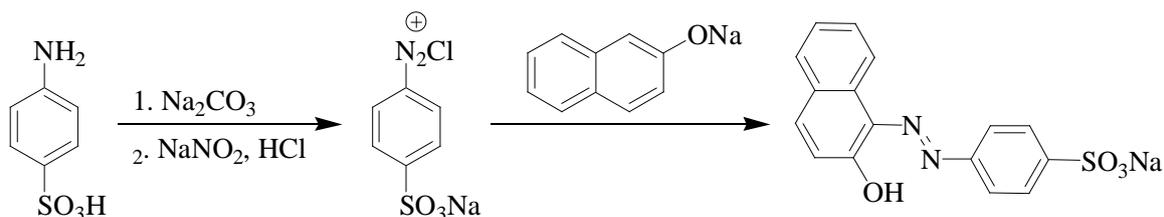
$\varepsilon_{\text{HA}}$ ,  $\varepsilon_{\text{A}}$  – коэффициенты поглощения соответствующих форм при выбранной длине волны;

$A_{\text{HA}}$ ,  $A_{\text{A}}$ ,  $A$  – оптическая плотность растворов БКС, содержащих только  $\text{HA}^-$ , только  $\text{A}^{2-}$  и их смесь, соответственно.

1. Напишите выражения для  $A_{\text{HA}}$ ,  $A_{\text{A}}$  и  $A$  через  $[\text{HA}^-]$ ,  $[\text{A}^{2-}]$  и  $c$ .
2. Выразите  $A$  через  $A_{\text{HA}}$ ,  $A_{\text{A}}$  и  $[\text{H}^+]$ .
3. Составьте уравнение для нахождения  $K_{a2}$  исходя из значений  $A_{\text{HA}}$ ,  $A_{\text{A}}$ ,  $A$  и  $[\text{H}^+]$ .
4. Рассмотрим длину волны, при которой  $\varepsilon_{\text{HA}} = \varepsilon_{\text{A}}$ . Она называется изосбестической.
  - а) Возможно ли определить  $K_a$  красителя измерением оптической плотности при изосбестической длине волны?
  - б) Какая аналитическая информация может быть получена из этого измерения?

### Задача 33. КИСЛОТНЫЙ ОРАНЖЕВЫЙ 7

Очень популярный азокраситель, известный под множеством торговых названий и широко используемый в производстве текстиля, кожи, продуктов питания, косметики и т.д., Кислотный 7 (Кислотный Оранжевый II, Персидский Оранжевый и т.п., CI 15510 по универсальному каталогу красителей Color Index) может быть легко получен азо-сочетанием диазотированной сульфаниловой кислоты и 2-нафтолята:



## Материалы и оборудование

Сульфаниловая кислота (R36/37/38, R43, S24, S37)

2-Нафтол (R36/37/38, S26, S37)

Карбонат натрия (R36, S2, S22, S26)

Нитрит натрия (R8, R25, R36/37/38, R50, S26, S36, S45, S61)

Гидроксид натрия (R35, S1/2, S26, S37/39, S45)

Соляная кислота, конц. (R34, R37, S26, S36, S45)

Лёд

Стеклянные стаканы (150, 200, 500 мл), термометр, шпатели, магнитная мешалка и плитка, прибор для вакуумного фильтрования, эксикатор.

## Диазотирование

Сульфаниловую кислоту (8.66 г, 0.05 моль) растворяют в растворе 3 г карбоната натрия в 50 мл воды, находящемся в стакане на 150 мл, используя магнитную мешалку. При интенсивном перемешивании добавляют 15 мл концентрированной HCl. После охлаждения раствора до комнатной температуры стакан помещают в ледяную баню (для обеспечения лучшего охлаждения к смеси может быть добавлено несколько кусочков льда), и охлаждают смесь далее до 0 °С. По каплям прибавляют раствор NaNO<sub>2</sub> (3.45 г, 0.05 моль) в 20 мл воды (**внимание!** Эту операцию необходимо проводить в хорошей тяге, так как выделяются оксиды азота). Скорость прибавления устанавливается таким образом, чтобы температура находилась как можно ближе к 0 °С (**внимание!** Повышение температуры всего на 2-3° приводит к побочным реакциям, в результате которых образуются фенолы, которые затем дают азокрасители, резко уменьшающие чистоту цвета целевого продукта). Иногда по мере прибавления может образовываться белый осадок диазониевой соли (диазотированный сульфанилат является бетаином, внутренней солью с нулевым суммарным зарядом, малорастворимой из-за этого в воде). Результат азосочетания не зависит от того, находится ли диазониевая соль в растворе или в осадке.

После прибавления всего раствора нитрита перемешивание продолжают 10-15 мин (**внимание!** Необходимо внимательно следить за температурой!). Раствор (или суспензию) диазониевой соли необходимо использовать сразу после приготовления.

## Азосочетание

2-нафтол (7.21 г, 0.05 моль) растворяют в 40 мл 5% раствора NaOH. Полученный раствор смешивают с раствором 12.5 г Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 100 мл воды в стакане на 500 мл. Получившийся раствор должен быть прозрачным; если в нём присутствует муть или осадок, необходимо его профильтровать. Раствор нафтолята охлаждают до 0 °С льдом (ледяная баня + несколько кусочков льда непосредственно в раствор). Раствор диазониевой соли медленно приливают к раствору нафтолята при интенсивном перешивании шпателем или стеклянной палочкой. Во время прибавления необходимо поддерживать температуру ниже 8 °С. Затем смесь оставляют на час, желательно на магнитной мешалке. За это время краситель частично выпадает в виде золотистых пластинок.

Через час раствор нагревают до полного растворения осадка, фильтруют горячим (*примечание*: эта процедура может быть опущена при отсутствии воронки для горячего фильтрования), и насыщают 50 г хлорида натрия (необходимо поддерживать температуру выше 50° во время насыщения, поэтому стакан помещают на плитку). Осадок красителя, полученный высаливанием, отделяют вакуум-фильтрованием горячего раствора (*примечание*: если температура раствора падает ниже 50°, хлорид натрия может также выпадать в осадок вместе с красителем). Оранжевый продукт высушивают в эксикаторе над CaCl<sub>2</sub>. Выход 25 г.

Качество красителя может быть определено УФ/видимой спектроскопией. В водном растворе  $\lambda_{\max}$  487 нм ( $\lg \varepsilon$  4.87).

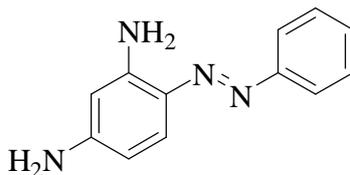
## Вопросы

1. Этот краситель под названием *тропеолин 000* используется как кислотнo-основной индикатор в водных растворах. Предположите, в какой области pH он изменяет свой цвет:

- сильнокислой (pH < 2);  кислой (pH 2-6.5);  нейтральной (pH 6.5-7.5);  
 слабощелочной (pH 7.5-9);  сильнощелочной (pH 9-14).

2. Напишите уравнение реакции, соответствующей цветовому переходу.

3. Напишите уравнение реакции азосочетания, приводящей к красителю *хризоидину*.



4. В какой среде необходимо проводить это азосочетание:

сильнощелочной,  слабощелочной,  слабокислой,  сильнокислой?

#### **Задача 34. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ БЕЛКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ**

Гель-фильтрация – простой и надёжный хроматографический метод разделения молекул в зависимости от их размера. При разделении молекулы элюируются в порядке уменьшения их размеров. Многосторонность метода делает его применимым для очистки и характеристики биологических веществ всех классов, включая те, которые трудно разделить другими способами.

Некоторые гелеобразующие органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой (обычно называемые матрицами для гель-фильтрации, GFM) проявляют свойства молекулярных сит и могут разделять молекулы по их размерам и форме. Хроматографическая колонка заполняется набухшим гелем и уравнивается соответствующим буферным раствором. Механизм разделения основан не на адсорбции и не зависит от выбранного элюента; вследствие этого он значительно мягче. Жидкость внутри пористых гранул геля GFM является стационарной фазой, в то время как элюируемый раствор снаружи – подвижной.

В колонке все молекулы образца могут присутствовать в жидкой фазе между гранулами. Объем всей этой “наружной” жидкости называют *мёртвым объемом* в гель-фильтрации; обычно он составляет 30% объема всей колонки. Молекулы образца распределяются между элюентом (подвижная фаза) и доступной частью пор гранул (стационарная фаза). Это приводит к *динамическому равновесию* распределения молекул образца между подвижной и стационарной фазой, которое

определяется исключительно диффузией. Подвижная фаза переносит молекулы вниз по колонке. Молекулы, присутствующие в порах, являются “стационарными” и никуда не переносятся. Скорость перемещения зоны, содержащей образец, зависит от доли молекул образца в подвижной фазе. Разделение индивидуальных макромолекул может быть достигнуто только в том случае, когда возможно их частичное проникновение в поры GFM. *Приемлемый объем образца* должен составлять не более 0.5-5% от объема колонки, поскольку при гель-фильтрации нет эффекта концентрирования. *Скорость потока* необходимо поддерживать низкой во избежание уширения пиков из-за неполного массопереноса, в то время как колонка должна быть достаточно длинной для обеспечения оптимального разделения.

## Реактивы

Голубой декстран (молекулярная масса MW = 2 МДа), 4 мг

Белки:

Овальбумин (MW = 43 кДа), 1.5 мг

Цитохром С (MW = 13 кДа), 0.4 мг

Бычий сывороточный альбумин (BSA) (MW = 67 кДа), 2.2 мг

Химотрипсиноген (MW = 25 кДа), 1 мг

Гемоглобин (MW = 64.5 кДа), 1.5 мг

0.1 М HCl (R34, R37, S26, S36, S45) 230 мл, KCl 22.35 г

Буфер: Трис(2-амино-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол; R36/37/38, S26, S36) 6.05 г

GFM: Toyopearl HW-50 (или HW-55), 70 мл.

Если некоторые из приведённых выше белков недоступны, их можно заменить другими с близкой молярной массой (не протеазами). Toyopearl может быть также заменён GFM со схожими свойствами.

## Оборудование

Хроматографическая колонка объемом 70 мл; удлинительная трубка; штатив; перистальтический насос; увикорд, соединенный с самописцем; центрифуга для пробирок Eppendorf; аналитические весы; водоструйный насос; один мерный цилиндр объемом 1000 мл; одна мерная колба объемом 250 мл; одна большая

воронка Бюхнера со стеклянным фильтром; одна колба Бунзена объемом 1000 мл; одна круглодонная колба объемом 1000 мл; одна микропипетка на 100 мкл с насадками; одна микропипетка на 1000 мкл с насадками; один шприц на 2 мл, соединённый со шлангом длиной 20 см; 4 пробирки Eppendorf; один мерный цилиндр объемом 100 мл; одна колба объемом 200 мл; один стакан объемом 100 мл; большой стальной шпатель; маленький шпатель; стеклянная палочка; фильтровальная бумага.

Указание: Вместо увикорда можно использовать УФ-ВИД спектрофотометр и мерные пробирки.

## Методика

### Шаг 1. Приготовление буферного раствора

Для приготовления 0.2 М Трис-буферного раствора, растворите 6.05 г Трис в 250 мл дистиллированной воды в мерной колбе объемом 250 мл. Смешайте 125 мл 0.2 М раствора Трис и 230 мл 0.1 Н HCl в мерном цилиндре объемом 1000 мл. Разбавьте смесь водой до 800 мл. Прибавьте 22.35 г KCl к Трис-HCl раствору и тщательно перемешайте до полного растворения соли. Добавьте воды до 1000 мл (конечная концентрация KCl составляет 0.3 М).

### Шаг 2: Подготовка хроматографической колонки

Набивка колонки – одна из самых важных стадий хроматографии, часто определяющей качество всего процесса в целом. Колонка должна быть набита равномерно, причём нижняя и верхняя поверхности геля должны быть строго горизонтальными.

1. Доведите гель до комнатной температуры.
2. Осторожно встряхните бутылку до получения однородной суспензии.
3. Поместите 70 мл геля в стакан и разбавьте буферным раствором до 100 мл.
4. Размешайте смесь стеклянной палочкой до получения однородной суспензии без больших комков.
5. Заполните буферным раствором колонку для обнаружения утечек, увлажнения стенок и вытеснения воздуха из-под нижнего фильтра. (Лучше заполнять колонку снизу вверх, используя водоструйный насос). Слейте буфер, так чтобы над

поверхностью геля оставался слой раствора примерно в 1 см. Для колонок, имеющих снизу пористый стеклянный фильтр, необходимо вырезать из фильтровальной бумаги кружок, диаметр которого равен внутреннему диаметру колонки, и положить его на фильтр во избежание утечки геля.

6. Установите колонку вертикально и плотно присоедините к удлинительной трубке. Он должен быть в два раза короче колонки.

7. Промойте гель тремя порциями (примерно по 100-120 мл) Трис-буферного раствора на воронке Бюхнера со стеклянным фильтром, присоединённой к 1000 мл колбе Бунзена, под вакуумом водоструйного насоса. Желательно, чтобы при этом Тоуо-pearl полностью не высыхал. После каждого промывания отсоединяйте вакуум в тот момент, когда верхний слой геля начинает подсыхать. Затем добавьте следующую порцию буфера, размешайте суспензию большим стальным шпателем до гомогенности, и повторите фильтрацию.

8. Перенесите гель из воронки в 1000 мл круглодонную колбу, добавьте 50 мл буферного раствора и подсоедините колбу к водоструйному насосу через переходник. Вакуумную дегазацию нужно проводить в течение как минимум пяти минут.

9. Суспендируйте гель и сразу же перелейте суспензию в колонку одним движением, не прерываясь. Переливание суспензии по стеклянной палочке помогает избежать образования пузырьков воздуха (Рис.1). Постарайтесь, чтобы суспензия геля стекала по стенке колонки.

10. Осторожно заполните удлинительную трубку буферным раствором до конца, стараясь не «беспокоить» гель. Подсоедините резервуар к перистальтическому насосу, который должен быть также соединён с запасом буфера в 200 мл колбе. Включите насос и откройте выход колонки.

11. Необходимо прокачивать буферный раствор через колонку, пока гель не перестанет «усаживаться». После прохождения буфера в объеме, равном двукратному объему геля, отсоедините резервуар и присоедините адаптер.

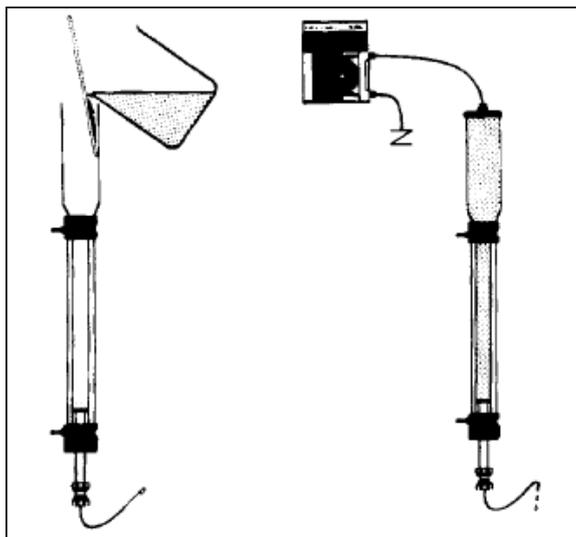


Рис. 1. Набивка колонки для GFM.

### Шаг 3: Приготовление раствора

Взвесьте Голубой Декстран и белки при помощи аналитических весов и маленького шпателя. Приготовьте раствор Голубого Декстрана, растворив его в 1 мл Трис-буферного раствора в пробирке Eppendorf. Приготовьте два раствора стандартных белков в пробирках Eppendorf. Первый раствор содержит Овальбумин, Цитохром С, 0.07 мл раствора Голубого Декстрана и 0.93 мл Трис-буферного раствора. Второй раствор содержит Бычий сывороточный альбумин, Химотрипсиноген, 0.07 мл раствора Голубого Декстрана и 0.93 мл Трис-буферного раствора. Также приготовьте раствор гемоглобина (неизвестный белок) в 1 мл Трис-буферного раствора. Центрифугируйте два раствора стандартных белков и раствор неизвестного белка в течение 5 минут.

### Шаг 4: Нанесение образцов

1. Наносите образцы осторожно, стараясь не “беспокоить” гель. Для удобства можно положить кружок фильтровальной бумаги на поверхность геля (однако не стоит забывать о возможной адсорбции белков на бумаге). Отсоедините насадку и перистальтический насос, откройте выход колонки. Дайте буферному раствору стечь (поверхность геля не должна быть покрыта слоем буфера, но и не должна полностью высыхать), и закройте выход колонки. Медленно прибавьте раствор образца при помощи пипетки или 2 мл шприца, соединённого со шлангом длиной 20 см, откройте выход колонки и дайте раствору впитаться в гель. Закройте выход

колонки и добавьте буферный раствор (примерно 1 мл) медленно и осторожно (как и при нанесении образца). Откройте выход колонки и дайте буферному раствору впитаться в гель. Повторите эту процедуру. Она позволяет образцу глубже проникнуть в гель и, соответственно, избежать обратной диффузии. Закройте выход колонки и осторожно покройте гель слоем буфера высотой примерно 2 см.

2. Подсоедините перистальтический насос ко входу колонки и увикорд к выходу колонки (длина соединительного шланга должна быть как можно меньше) и начните элюцию.

### **Шаг 5: Колоночная хроматография**

1. Проведите калибровку колонки, состоящую из двух стадий:

А. Нанесите первый раствор стандартных белков, содержащий Голубой Декстран, Овальбумин и Цитохром С, на колонку. Начните элюирование со скоростью 1-2 мл/мин, собирая элюат в мерный цилиндр объемом 100 мл. За процессом элюции наблюдают по поглощению элюата при 280 нм, которое регистрируется увикордом. Измерьте объёмы элюции Голубого Декстрана и белков, используя цилиндр (запишите объёмы, соответствующие максимальному поглощению элюата).

Примечание: в случае использования спектрофотометра и пробирок необходимо действовать несколько по-другому. Соберите элюат объёмом 25% от объёма колонки в мерном цилиндре. Затем продолжайте собирать элюат в пробирки порциями по 1 мл. Определите поглощение элюата при 280 нм в каждой пробирке, используя спектрофотометр, и запишите общие объёмы, соответствующие максимумам поглощения элюата.

После регистрации трёх пиков промойте колонку буферным раствором, до достижения общего объема, равного объёму колонки.

В. Нанесите на колонку второй раствор стандартных белков и действуйте как описано выше.

2. Нанесите на колонку раствор неизвестного белка. После регистрации пика отключите перистальтический насос, закройте выход колонки и выключите увикорд.

**Вопросы**

1. Соотнесите хроматографические пики с веществами, нанесёнными на колонку. Заполните таблицу:

Номер стандартного	Номер пика (в порядке появления)		
	1	2	3
1			
2			

2. Чему равен мёртвый объём вашей колонки? Объясните.

3. Рассчитайте объём хроматографической колонки.

4. Рассчитайте коэффициент доступности  $K_{av}$  для всех белков по формуле

$$K_{av} = \frac{V_r - V_0}{V_c - V_0}$$

$V_r$  – время элюции молекул образца,  $V_0$  – мёртвый объём,  $V_c$  – объём колонки.

5. Постройте калибровочный график, отражающий зависимость  $K_{av}$  от  $\lg(MW)$ , используя данные, полученные для 4 стандартных белков.

6. Определите  $MW$  неизвестного белка.

7. Другой важной характеристикой колонки является *предел эксклюзии*,  $M_r$ , который определяется как молекулярная масса наименьшей молекулы, не входящей в поры геля. Определите этот параметр, найдя точку пересечения экстраполированной линейной части калибровочной кривой и оси  $\lg(MW)$ .

8. Оцените объём элюата, необходимый для выхода низкомолекулярных веществ. Дайте пояснения.