

Номер места _____

Фамилия _____

58-я МЕЖДУНАРОДНАЯ МЕНДЕЛЕЕВСКАЯ ОЛИМПИАДА

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ТУР

Шэньчжэнь – 2024 г.

Общие указания

- **Правила техники безопасности:** следуйте общепринятым правилам проведения химического эксперимента; в течение всего времени пребывания в лаборатории Вы обязаны носить лабораторный халат и защитные или корректирующие очки; в лаборатории запрещается принимать пищу и пить.
- **Нарушение правил техники безопасности:** Вам будет сделано лишь одно предупреждение; в случае повторного нарушения Вы будете дисквалифицированы.
- **Время:** общая продолжительность экспериментального тура составляет 5 ч. **Первые 15 мин отводятся для ознакомления с заданием, начинать экспериментальную работу в это время не разрешается** (можно осмотреть пипетку-дозатор и др. оборудование).
- В лаборатории имеются часы. После того, как прозвучит команда СТОП, Вы должны немедленно прекратить работу и сдать все листы.
- **Кроме реактивов, посуды и оборудования, используйте только калькулятор и ручку.**
- Обратитесь к ассистентам, если у Вас возникли **вопросы** по технике безопасности или Вам нужно выйти в туалет.
- Сливайте **жидкие отходы** в пластиковую емкость «**Liquid waste**», которая находится у Вас на столе.
- Записывайте **ответы только в предназначенных для этого местах**; ответы, записанные в других местах, оцениваться не будут. Приводите расчеты везде, где это требуется.
- **Вы можете использовать посуду в течение тура несколько раз.** Мойте ее тщательно.
- Выданное Вам количество растворов ограничено. Пролитый или полностью израсходованный раствор будет заменен с наложением штрафа.
- Работа с **бюретками:** вам выданы бюретки с открытыми кранами. Закройте кран бюретки перед использованием. Если при заполнении бюретки в носике остается пузырек воздуха, аккуратно встряхните бюретку в вертикальном положении. Если это не помогает, обратитесь к ассистенту. Краны бюреток могут подтекать, в таком случае подтяните пластиковую гайку крана. Всегда подставляйте стаканчик под бюретку.
- Вы можете использовать обратную сторону листов задания в качестве черновика.
- **Содержите свое рабочее место в порядке.** Рулоны салфеток есть на каждом лабораторном столе, кроме того, в лаборатории имеются рулоны бумажных полотенец.
- Если вы что-то разбили, обратитесь к ассистентам, которые помогут вам убрать осколки и выдадут замену.
- Вы будете использовать **пипетку-дозатор** с возможностью отбора жидкости от 100 до 1000 мкл. Установите необходимый объем на дозаторе вращением рукоятки. Нажатие поршня дозатора «до первой остановки» отвечает выставленному вами объему и используется при наборе жидкости, нажатие «до упора» служит для спуска всего объема жидкости. Будьте внимательны, не засасывайте раствор внутрь дозатора, поскольку это может вывести его из строя. Используйте для каждого раствора отдельный съемный наконечник дозатора.
- Для заполнения стеклянных пипеток вы будете пользоваться **грушей-пипетатором**. Запрещается набирать жидкость в пипетки ртом. Пипетатор имеет три клапана (стеклянных шарика): А – выпуск воздуха при сжатии груши, S – всасывание раствора в пипетку, Е – опорожнение пипетки. Клапаны тугие, применяйте, пожалуйста, силу!

Spirulina platensis – суперфуд



Очень популярная в Китае и ряде соседних стран спирулина – сине-зеленая микроводоросль, имеющая уникальный состав. Она содержит до 70% полноценного белка, который легко усваивается организмом, а также множество витаминов, микроэлементов и других полезных веществ. Спирулина богата ненасыщенными жирными кислотами, такими как линолевая и линоленовая, играющими ключевую роль в состоянии сердечно-сосудистой системы человека. Спирулина богата полисахаридами и фотосинтетическими пигментами, включая фикоцианин, хлорофилл и фикоэритрин, которые положительно влияют на обмен веществ и работу пищеварительной системы. Таким образом, спирулина представляет собой многофункциональное средство поддержания здоровья и улучшения работы различных систем организма.

Часть А. Конформации фикоцианина

Спирулина богата белком фикоцианином. Он полезен для человека, так как способствует производству эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов, а также росту и дифференциации стволовых клеток. Хотя белки состоят из одних и тех же аминокислот, некоторые белки окрашены, а некоторые нет. Фикоцианин имеет яркую окраску за счет хромофора под названием фикоцианобилин.

Реагенты:

Реагент	Подпись	Емкость
Раствор фикоцианина	Phycocyanin	Виала на 10 мл
Буферный раствор (pH 7.0)	Buffer	Виала на 10 мл
Вода	H ₂ O	Промывалка
Раствор хлорида натрия	NaCl	Микропробирка
Раствор хлорида гуанидиния	Guanidine	Микропробирка
Раствор лаурилсульфата натрия ¹	SDS	Микропробирка
Раствор мочевины, 8 М	Urea 8 М	Виала на 10 мл
Раствор гидроксида натрия, 1 М	NaOH 1 М	Микропробирка
Раствор соляной кислоты, 1 М	HCl 1 М	Микропробирка
Ацетон	Acetone	Микропробирка
Этанол	Ethanol	Микропробирка
Раствор сульфата аммония	(NH ₄) ₂ SO ₄	Микропробирка

Оборудование: кюветы, фотометр, пипетка-дозатор, сменные наконечники, микропробирки, штатив для микропробирок.

¹ В растворе может наблюдаться осадок, что не является препятствием к проведению опыта. Уменьшить количество осадка можно подогревая и встряхивая раствор.

Номер места _____

Фамилия _____

Когда фикоцианин сворачивается вокруг фикоцианобилина, появляется ярко-синее окрашивание, что позволяет понять, в свернутом или развернутом состоянии находится белок. Для проверки конформационного состояния белка можно использовать различные вещества, меняющие конформацию.

В виале на 10 мл вам выдан раствор фикоцианина в буферном растворе. Используя дозатор, разлейте в 11 микропробирок по 100 мкл раствора фикоцианина. Затем в каждую микропробирку добавьте по 900 мкл испытуемых реагентов. Закройте пробирку и встряхните ее несколько раз. Равновесие в системах устанавливается в течение 5 мин.

Определите, как изменилась окраска раствора, используя следующие обозначения:

- «В» для синего, за эталон возьмите цвет фикоцианина в буферном растворе;
- «L» для голубого;
- «Р» для фиолетового;
- «О» для бесцветного;
- «Х» для любого другого окрашивания.

A1. Положите микропробирки в соответствии с номерами на лист проверки (лист 5). Напишите свои наблюдения в соответствии с указанными обозначениями. Получите подпись преподавателя.

A2. Какой реагент эффективнее всего разворачивает белок согласно проведенному анализу?

--

A3. Изменение каких факторов приводит к денатурации белка?

☐ Температура
☐ Ионная сила
☐ Кислотность среды
☐ Концентрация белка

Номер места _____

Фамилия _____

Пример	Запишите сюда код окраски: В/L/P/O/X	1. Buffer		2. H ₂ O		3. NaCl		4. Guanidine		5. SDS	
 Положите сюда микропробирку для фотографирования											
6. Urea 8 M		7. NaOH 1 M		8. HCl 1 M		9. Acetone		10. Ethanol		11. (NH ₄) ₂ SO ₄	

Подпись преподавателя _____

Номер места _____

Фамилия _____

Многие белки выполняют свои функции в форме четвертичных структур, энергия которых отличается от энергии линейного биополимера. Оценить различие энергии структур белка – непростая задача, однако окрашенные белки могут выступать удобной моделью для проведения подобных расчетов.

Для расчета свободной энергии Гиббса процесса разворачивания белка приготовьте 7 растворов фикоцианина общим объемом 2 мл каждый, используя разные объемы 8 М раствора мочевины в соответствии с таблицей ниже. В пластиковые кюветы для измерения оптической плотности с помощью дозатора добавьте 200 мкл фикоцианина, соответствующий объем раствора мочевины, после чего добавьте рассчитанный объем буферного раствора и хорошо перемешайте (для этого можете использовать многократный набор раствора в наконечник дозатора). Кюветы пометьте маркером. Для установления равновесия подождите примерно 20–30 мин. В это время Вы можете выполнять другие части работы.

Номер кюветы	1	2	3	4	5	6	7
$V(\text{Phycocyanin})$, мкл	200	200	200	200	200	200	200
$V(\text{Urea } 8 \text{ M})$, мкл	0	750	900	1100	1300	1400	1800
$V(\text{Buffer})$, мкл							

A4. Рассчитайте концентрации мочевины в пронумерованных пробирках. Запишите результаты в таблицу.

Номер кюветы	1	2	3	4	5	6	7
$c(\text{Urea})$, М							

По истечении заданного времени зарегистрируйте коэффициент пропускания (T , %) каждого из растворов, используя **датчик пропускания** монохроматического света (фотометр), находящийся рядом с компьютером. Если прибор не включен, то дайте ему прогреться около 30 с после включения перед началом измерений. Для проведения измерений откройте крышку и поместите кювету в держатель стрелкой к экрану. Измерения проводятся при длине волны 650 нм (на экране прибора отображаются Red(650nm) и коэффициент пропускания света). **Важно проводить все измерения на одном и том же приборе!**

Коэффициент пропускания T связан с оптической плотностью (A) следующим соотношением:

$$A = -\lg\left(\frac{T, \%}{100}\right)$$

Номер места _____

Фамилия _____

A5. Укажите номер используемого Вами фотометра. Запишите измеренные значения пропускания в таблицу. Рассчитайте значения оптической плотности для каждого образца.

Номер фотометра: _____

Номер кюветы	1	2	3	4	5	6	7
$T, \%$							
A							

Для расчета константы равновесия разворачивания белка используйте формулу:

$$K_{eq} = \frac{[\text{unfolded}]}{[\text{folded}]} = \frac{A_f - A}{A - A_u},$$

где K_{eq} – константа равновесия, A_f – оптическая плотность свернутого белка (в буферной системе), A_u – оптическая плотность развернутого белка (при самой высокой концентрации мочевины), A – оптическая плотность раствора, для которого рассчитывается константа.

A6. Рассчитайте константу равновесия и свободную энергию Гиббса (20°C) разворачивания белка в соответствии с номером кюветы.

Номер кюветы	2	3	4	5	6
K_{eq}					
$\Delta_r G^\circ$					

A7. На миллиметровой бумаге (следующий лист) постройте зависимость $\Delta_r G^\circ$ от концентрации мочевины и проведите от руки линию тренда. Обозначьте размерность величин, отложенных по осям.

A8. Рассчитайте свободную энергию Гиббса в водном растворе ($\Delta_r G_{H_2O}^\circ$) по градуировочному графику, предполагая, что зависимость имеет следующий вид:

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r G_{H_2O}^\circ - m \cdot c,$$

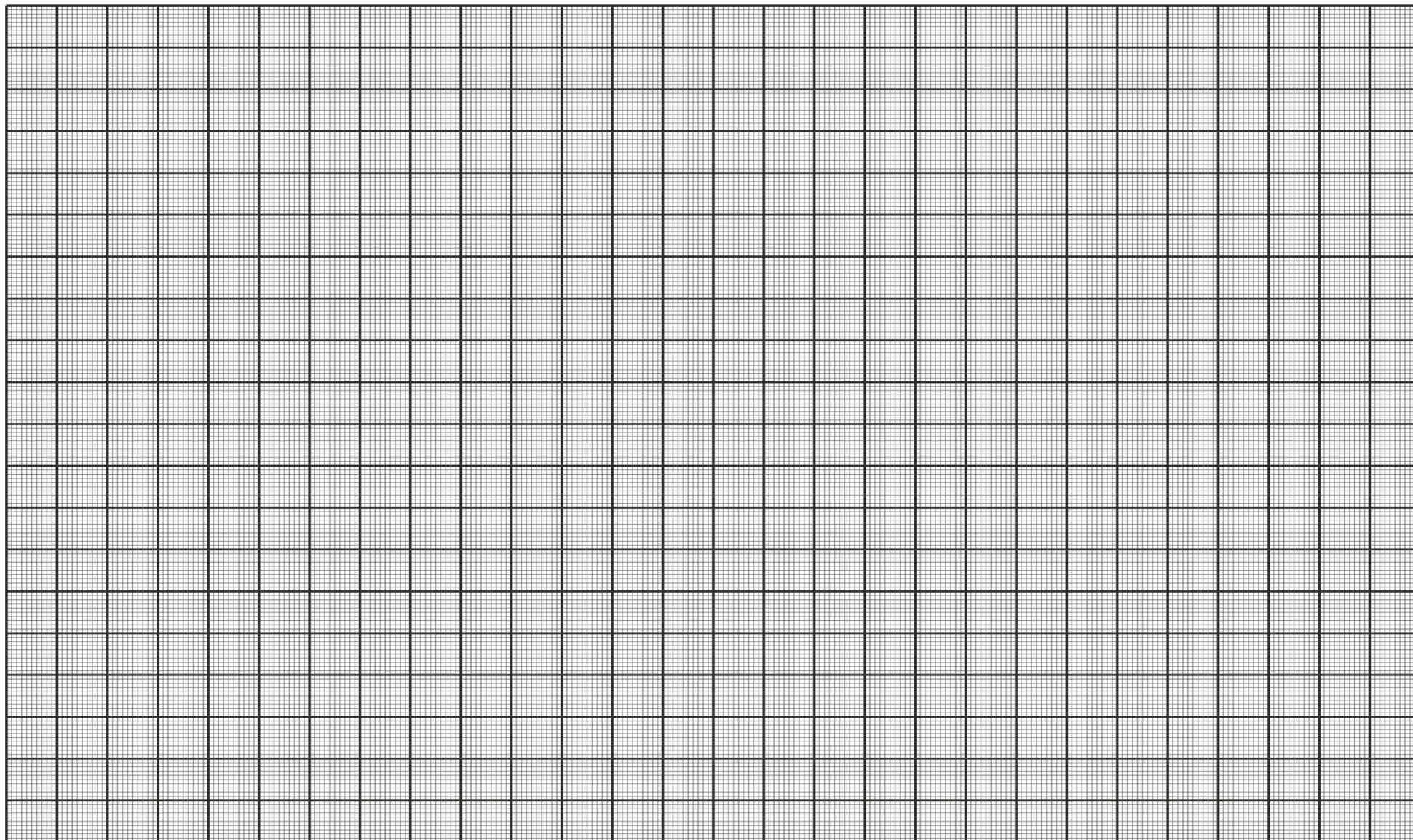
где m – некоторый коэффициент, c – концентрация мочевины.

Запишите свой ответ:

$\Delta_r G_{H_2O}^\circ =$

Номер места _____

Фамилия _____



Часть В. Титриметрическое определение жирных кислот по методу Маргошеса

Помимо белка в состав спирулины входят ненасыщенные жирные кислоты. Одним из главных способов нахождения ненасыщенности жиров является определение иодного числа. Иодное число выражает массу I_2 (в граммах), которое требуется для полного насыщения жирных кислот, содержащихся в 100 г жира. Метод Маргошеса – один из способов определения иодного числа, основанный на окислении двойной связи иодом с последующим титрованием непрореагировавшего иода. По результатам титрования и опираясь на данное значение иодного числа Вам предстоит определить массу выданного Вам образца масла.

Реагенты:

Реагент	Подпись	Емкость
Раствор тиосульфата натрия, 0.09621 М	$Na_2S_2O_3$	Банка на 250 мл
Раствор Маргошеса (этанольный раствор иода, 0.1 М)	I_2	Банка на 100 мл
Раствор крахмала, 1%	Indicator (starch)	Капельница на 30 мл
Спиртовая смесь этанол-хлороформ (10:1 об.)	C_2H_5OH $CHCl_3$ (10:1)	Банка на 250 мл

Оборудование: мерная колба на 100 мл с навеской масла (1 шт.), бюретка на 25 мл (1 шт.), небольшая стеклянная воронка для бюретки (1 шт.), груша с тремя клапанами (1 шт.), мерный цилиндр на 100 мл (1 шт.), пипетка с делениями на 10 мл (3 шт.), колба для титрования на 250 мл с пришлифованной пробкой (3 шт.), стакан на 50 мл (3 шт.).

В бюретку налейте стандартный раствор тиосульфата натрия. В мерную колбу с навеской масла добавьте 40 мл смеси этанола с хлороформом (10:1) (далее «спиртовая смесь») стаканом и интенсивно перемешайте, не переворачивая колбу. Убедитесь, что навеска растворилась. Доведите раствор до метки спиртовой смесью, еще раз интенсивно перемешайте, переворачивая колбу.

Контрольный опыт. Для проведения контрольного опыта в коническую колбу на 250 мл пипеткой добавьте 10.00 мл смеси этилового спирта и хлороформа (10:1) и 5.00 мл раствора Маргошеса. Затем введите 40 мл дистиллированной воды, закройте пробкой, взболтайте, **приоткройте пробку для сброса давления в колбе** и оставьте на 5 мин. После этого колбу с закрытой пробкой осторожно встряхните 2–3 раза, придерживая пробку, и **приоткройте пробку для сброса давления в колбе**. Интенсивно перемешивайте содержимое колбы в течение 3 мин, периодически сбрасывая давление.

Титруйте полученную смесь, энергично перемешивая, раствором тиосульфата натрия до появления светло-желтой окраски (**убедитесь, что на дне колбы не осталось темного осадка**), затем добавьте 3–4 капли крахмала и титруйте до исчезновения синей окраски.

Номер места _____

Фамилия _____

В1. Запишите объем тиосульфата натрия, затраченного на контрольный опыт (V_{ref}):

Титрование №	1	2	3			
Начальный объем, мл						
Конечный объем, мл						
Объем, израсходованный на титрование, мл						

Объем, принятый Вами в качестве ответа, V_{ref} : _____ мл

Определение иодного числа масляной смеси. Описанную для контрольного опыта процедуру необходимо провести для раствора масла в спиртовой смеси. Отберите аликвоту 10.00 мл раствора масла из мерной колбы и перенесите ее в колбу для титрования. Затем добавьте пипеткой к анализируемой пробе 5.00 мл раствора Маргошеса. Добавьте 40 мл дистиллированной воды, закройте колбу пробкой, взболтайте, **приоткройте пробку для сброса давления в колбе** и оставьте колбу на 5 мин. Затем колбу с закрытой пробкой осторожно встряхните и **приоткройте пробку для сброса давления в колбе**. Интенсивно перемешивайте содержимое колбы в течение 2–3 минут, периодически сбрасывая давление. Полученную смесь титруйте при интенсивном перемешивании раствором тиосульфата натрия до перехода коричневой окраски в светло-желтую. Затем добавьте индикатор (1%-ный раствор крахмала) и продолжите титрование до исчезновения синей окраски.

В2. Запишите объем тиосульфата натрия, затраченного на титрование пробы с маслом (V):

Титрование №	1	2	3			
Начальный объем, мл						
Конечный объем, мл						
Объем, израсходованный на титрование, мл						

Объем, принятый Вами в качестве ответа, V : _____ мл

В3. Напишите уравнение реакции непредельного соединения $\begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \end{array}$ с реактивом Маргошеса в присутствии воды. Учтите, что вицинальные диiodиды неустойчивы и не образуются в данной реакции.

Номер места _____

Фамилия _____

В4. Выведите формулу, связывающую иодное число выданного вам масла, массу масла в вашей мерной колбе m (мг), объем раствора в мерной колбе 100.0 мл, объем аликвоты 10.00 мл, объемы (мл), полученные при титрованиях (V_{ref} – контрольного, V – собственно определения), концентрацию тиосульфата $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3)$, массу эквивалента иода ($M = 126.9$ г/моль).

Выкладки:

Иодное число =

В5. Рассчитайте массу масла в выданном Вам образце, если его иодное число равно **86**.

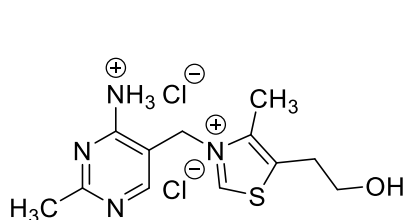
Расчет:

Содержание масла в мерной колбе: _____ мг

Часть С. Распознавание витаминов

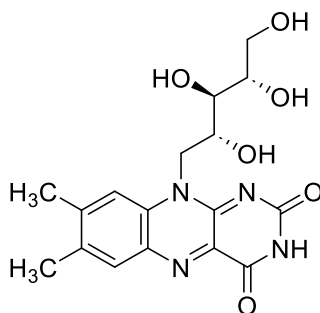
Спирулина — уникальная микроводоросль, содержащая витамины и микроэлементы, необходимые для человека. В состав спирулины входят такие витамины, как А, В₁, В₂, В₃, В₆, В₉, С, D и Е. Эти витамины играют важную роль в поддержании здоровья нашей кожи, волос, ногтей, иммунной системы и общего состояния организма.

В таблице ниже приведены некоторые витамины, которые могут содержаться в спирулине.



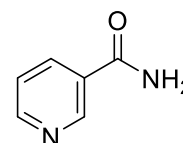
Тиамин гидрохлорид
(витамин В₁)

(C₁₂H₁₇ClN₄OS)



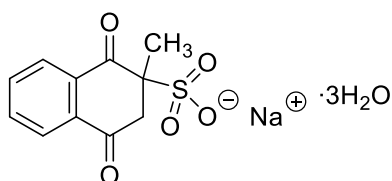
Рибофлавин (витамин В₂)

(C₁₇H₂₀N₄O₆)



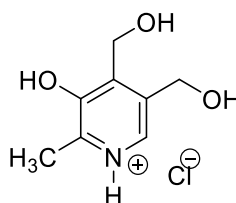
Никотинамид
(витамин В₃)

(C₆H₆N₂O)



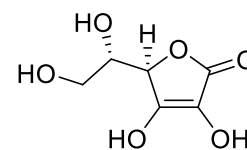
Викасол
(аналог витамина К₃)

(C₁₁H₉NaO₅S)



Пиридоксина гидрохлорид
(витамин В₆)

(C₈H₁₂NO₃Cl)



Аскорбиновая кислота (витамин С)

(C₆H₈O₆)

Реагенты:

Реагент	Подпись	Емкость
Тиамин гидрохлорид	1–8	Микропробирка
Рибофлавин		Микропробирка
Никотинамид		Микропробирка
Викасол		Микропробирка
Пиридоксина гидрохлорид		Микропробирка
Аскорбиновая кислота		Микропробирка
Раствор иодида калия		Микропробирка
Фосфатный буфер (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄)		Микропробирка
Раствор гидроксида натрия, 0.1 М	NaOH 0.1 М	Микропробирка
Раствор нитрита натрия, 1 М	NaNO ₂ 1 М	Микропробирка
Раствор хлорида железа(III), 0.05 М	FeCl ₃ 0.05 М	Микропробирка

Раствор сульфаниловой кислоты [†] , 0.06 M	Sulfanilic acid 0.06 M	Микропробирка
Раствор нитрата серебра, 0.5 M	AgNO ₃ 0.5 M	Микропробирка
Индикаторная бумага для определения pH		

Оборудование: микропланшет, фильтровальная бумага, пипетка-дозатор, сменные наконечники.

В вашем распоряжении имеется набор следующих реагентов: NaOH, NaNO₂, FeCl₃, сульфаниловая кислота, AgNO₃. Используя эти растворы в индивидуальном виде или смешивая их и получая новые реагенты, можно идентифицировать витамины и другие предложенные Вам вещества. В микропробирках под номерами **1–8** вам выданы растворы витаминов: тиамин гидрохлорид, рибофлавин, никотинамид, викасол, пиридоксин гидрохлорид, аскорбиновая кислота (формулы представлены в таблице выше). Кроме того, среди веществ для распознавания находятся раствор KI и фосфатный буфер.

Идентификация витаминов основана на способности веществ приводить к окрашенным продуктам, а также образованию осадков и(или) выделению газа при действии на них соответствующих реагентов. Используйте выданные реактивы в том числе и для создания необходимого pH для проведения реакции. Для контроля pH используйте универсальную индикаторную бумагу.

Для успешного выполнения эксперимента обратите внимание на следующие рекомендации:

- реакции проводите в 96-луночном планшете;
- не наливайте много раствора в ячейки. Для проведения реакции достаточно добавить 100 мкл анализируемого раствора.

При проведении реакций обнаружения учитывайте следующие факты:

- Рибофлавин в нейтральном или слабокислом растворе (pH 6.5–7.2), реагируя с AgNO₃, образует окрашенное соединение.
- Витамин B₆ и никотинамид образуют окрашенные соединения с FeCl₃.
- В результате взаимодействия сульфаниловой кислоты с подкисленным раствором нитрита натрия образуется диазофенилсульфоновая кислота.
- Тиамин реагирует в щелочной среде с солями диазония с образованием окрашенных в красно-оранжевый цвет триазенов. Пиридоксин тоже способен вступать в реакцию азосочетания в щелочной среде с образованием окрашенных в красно-оранжевый цвет продуктов.
- В щелочной среде (pH ≥ 11) сульфонатная группа удаляется из молекулы викасола, и 2-метил-1,4-нафтохинон выпадает в осадок.

[†]4-Аминобензолсульфоновая кислота (C₆H₇NO₃S)

Номер места _____

Фамилия _____

Таблица для записи наблюдений (не оценивается):

		Добавляемые реактивы						
№ пробирки с неизвестными веществами	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							

Номер места _____

Фамилия _____

С1. Определите содержимое пробирок. Запишите ответ в таблицу.

Анализируемый раствор	B₁	B₂	B₃	B₆	K₃	C	KI	NaH₂PO₄ +Na₂HPO₄
№ пробирки								

С2. Напишите уравнение реакции пиридоксина гидрохлорида с гидроксидом натрия. Используйте структурные формулы для органических соединений.

С3. Напишите уравнение реакции пиридоксина с диазофенилсульфоновой кислотой в щелочной среде. Используйте структурные формулы для органических соединений.

С4. Напишите уравнение реакции аскорбиновой кислоты с хлоридом железа(III). Используйте брутто-формулы соединений.

С5. Напишите уравнение реакции аскорбиновой кислоты с нитритом натрия в кислой среде. Используйте брутто-формулы соединений.

Номер места _____

Фамилия _____

С6. Напишите уравнение реакции иодида калия с нитритом натрия в кислой среде.

С7. Напишите уравнение реакции хлорида железа(III) с фосфатным буфером.

С8. Напишите уравнение реакции хлорида железа(III) с иодидом калия.