

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
для обучающихся по организации и проведению лабораторных работ
по дисциплине «БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ»
для студентов специальности 33.05.01 Фармация

Введение

«Биохимия» является одной из основных дисциплин в биологическом образовании и изучает химическое строение и функцию соединений, входящих в состав живых организмов, и те превращения, которым они подвергаются процессе жизнедеятельности.

Все процессы, происходящие в живом организме, тесно взаимосвязаны и зависят не только от внутренних, но и от внешних условий. Поэтому их следует рассматривать в единенье с окружающей средой.

Молекулярная биология изучает строение соединений обеспечивающих наследственность живого организма и тонкие механизмы передачи наследственной информации.

Целью биохимии и молекулярной биологии является раскрытие биохимических и биофизических основ организации живого организма, выяснение взаимосвязи между структурой и функциями биомолекул, участвующих в реакциях клеточного метаболизма и передачи наследственной информации.

Задачей курса «Биологическая химия» является изучение основных химических превращений, лежащих в основе жизнедеятельности, с участием биокатализаторов (ферментов), осуществляющих быстро, специфично и организовано во времени и пространстве эти химические превращения.

Важнейшей задачей курса является ознакомление с логикой происходящих в живых клетках процессов, их регуляцией и ролью белков и нуклеиновых кислот в них.

Курс «Биологическая химия» призван дать понимание того, каков конкретный молекулярный механизм происходящих в организмах физиологических процессов и каким образом можно направить эти процессы в клетках микроорганизмов, растений и животных, чтобы они могли быть успешно использованы для нужд современной биотехнологии.

Наиболее сложную часть курса планируется изложить на лекциях. Для самостоятельного изучения планируется вынести некоторые разделы. В связи с этим программа курса разделена на две части: первая будет изложена на лекциях, вторая планируется для самостоятельного изучения. Самостоятельная работа студентов контролируется на лабораторных занятиях, при проверке контрольных и самостоятельных работ. Лабораторные занятия позволяют освоить методы качественного и количественного определения основных групп биологически важных соединений: аминокислот, белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, методы работы с ферментами.

Курс «Биологическая химия» призван формировать на лабораторных занятиях студентам интерес к биохимии, умение работать в коллективе и лаборатории, чувство ответственности и долга.

Семестр 5

ЛАБОРАТОРНОЕ ЗАНЯТИЕ №1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ. ПОРЯДОК РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ. ОБОРУДОВАНИЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с посудой, приборами, методами подготовки проб для работы в биохимической лаборатории и методами расчета экспериментальных данных.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ

Работа в химической лаборатории связана с некоторой опасностью, поскольку многие вещества в той или иной степени ядовиты, огнеопасны и взрывоопасны.

Правила работы с огнеопасными веществами

1. Опыты с легковоспламеняющимися веществами (эфир, петролейный эфир, ацетон, бензол и т.д.) необходимо проводить дальше от огня и включенных электроплиток. Нагревать легковоспламеняющиеся жидкости можно только на предварительно нагретой водяной бане, в колбе, снабженной водяным холодильником, вдали от нагревательных приборов.

2. Легковоспламеняющиеся вещества можно отгонять в приборе с водяным холодильником на водяной бане или роторных испарителях. Нельзя упаривать горючие жидкости в открытых сосудах.

3. Приборы, в которых содержатся легковоспламеняющиеся вещества, следует разбирать после того, как будут выключены газовые горелки, находящиеся поблизости.

4. Не выливать воспламеняющиеся вещества в канализацию, ведра и ящики для мусора во избежание пожара от случайно брошенной спички.

5. Нельзя проводить перегонку досуха, так как многие вещества образуют взрывоопасные перекиси при соприкосновении с воздухом.

Первая помощь при ожогах и отравлениях

1. При термических ожогах немедленно делают обильные примочки спиртовым раствором танина, этиловым спиртом или раствором перманганата калия.

2. При ожогах кислотами необходимо сразу же промыть пораженное место большим количеством воды, а затем 3%-ным раствором гидрокарбоната натрия и опять водой.

3. При ожогах едкими щелочами следует хорошо и обильно промыть пораженное место проточной водой, затем разбавленным раствором уксусной кислоты, а после этого опять большим количеством воды.

4. При попадании кислоты или щелочи в глаза следует сразу же их промыть. Для этого направляют небольшую струю воды то в один, то в другой глаз в течение 3-5 мин. Затем глаза необходимо промыть или раствором гидрокарбоната натрия (в случае кислоты), или раствором борной кислоты (в случае щелочи). После этого нужно немедленно обратиться к врачу.

5. При ожогах фенолом пораженное место обрабатывают спиртом.

6. При ожогах кожи бромом его быстро смывают спиртом. Пораженное место смазывают мазью для ожогов. При вдыхании паров брома нужно глубоко подышать над спиртом, а затем выпить молока и выйти на свежий воздух.

Тушение местного пожара и горячей одежды

1. При возникновении пожара немедленно отключить газ и электроприборы по всей лаборатории. Быстро убрать все горючие вещества подальше от огня, а пламя быстро гасить огнетушителем, песком или при помощи противопожарного одеяла.

2. Если на ком-либо загорелась одежда, нужно пострадавшего повалить на пол и быстро покрыть войлочным одеялом.

ПОРЯДОК РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ

1. Работать в лаборатории разрешается только после основательной предварительной подготовки. Студент должен просмотреть по руководству к

практическим занятиям описание опытов, которые он будет выполнять в практикуме, ознакомиться по учебникам со свойствами изучаемых веществ, с теоретическим материалом, относящимся к данной теме, написать уравнения реакций, проработать примеры необходимых расчетов, отметить опыты, выполнение которых требует от экспериментатора особого внимания и осторожности.

2. Прежде чем приступить к выполнению эксперимента, студент должен тщательно продумать его в целом, составить краткий план последовательно проводимых операций. Все приборы, в которых проводится тот или иной опыт, должны быть собраны компактно и целесообразно.

3. Обязательным является выполнение всех работ студентами, начиная от приготовления некоторых реактивов, до анализа и оценки результатов исследований. Каждая работа является контрольной задачей и обсуждение полученных результатов легче связать с соответствующим теоретическим материалом, чему способствуют контрольные вопросы, всесторонне охватывающие изучаемую тему.

4. Студенту в лаборатории отводится постоянное место (рабочий стол), и он обязан поддерживать его в чистоте и порядке. На рабочем столе должны находиться только те предметы, которые нужны в данное время для работы. Все работы, за небольшим исключением, выполняются студентом индивидуально. Категорически запрещается без разрешения преподавателя выполнять опыты, не описанные в руководстве.

5. Необходимые для работы реактивы выставлены на полки, находящиеся над лабораторными столами. Исключение составляют вещества, которые хранятся в вытяжных шкафах. Сухие реактивы необходимо брать чистым шпателем или специальной ложечкой. При дозировании растворов из склянок следует держать последние таким образом, чтобы этикетка была повернута вверх (во избежание ее загрязнения). Крышки и пробки от реактивных банок и склянок следует помещать на стол поверхностью, не соприкасающуюся с реактивом.

6. Если в руководстве нет специального указания, какое количество вещества необходимо взять для проведения в пробирке того или иного опыта, предлагается брать сухое вещество в количестве, закрывающем дно пробирки, а раствор - не более 1/6 объема пробирки. Следует иметь в виду, что при работе с малыми количествами вещества большинство операций (нагревание, охлаждение, фильтрование, высушивание и др.) требует значительно меньше труда и времени. Неизрасходованные реактивы нельзя высыпать (выливать) обратно в материальные склянки, их надо сдавать лаборанту. Для приготовления водных растворов и ополаскивания вымытой стеклянной посуды следует пользоваться дистиллированной водой.

7. Важно рационально и правильно использовать рабочее время. Если определение или опыт по какой-либо причине задерживаются, следует начать другое определение или подготовку к другому опыту. Работа в лаборатории требует тишины, переговоры следует вести в полголоса.

8. Студенты должны соблюдать правила пожарной безопасности и техники безопасности при пользовании реактивами в химической лаборатории. Работать в лаборатории можно только в халате.

9. Уходя из лаборатории, надо убедиться, что все краны (газовые, водопроводные) закрыты; все электроприборы выключены; столы убраны; дверцы вытяжных шкафов опущены.

ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ

В практикуме по биохимии применяют следующую лабораторную посуду:

1. Колбы – круглодонные, плоскодонные, мерные (от 25 мл до 5,0 л),
2. Химические стаканы – различных объемов (чаще от 50 мл до 2,0 л),
3. Пробирки – цилиндрические и конические,
4. Цилиндры – от 10 мл до 2,0 л,

5. Мензурки – от 50 мл до 1,0 л.
 6. Пипетки – емкостью от 0,1 мл до 100 мл – градуированные и пипетки Мора, автоматические, дозаторы.
 7. Бюретки и микробюретки.
 8. Промывалки.
 9. Фарфоровые тигли.
 10. Фарфоровые чашки.
 11. Фарфоровые ступки.
 12. Эксикаторы.
 13. Воронки.
 14. Посуда для взвешивания – часовые стекла, бюксы, тигли.
 15. Стекланные палочки, лопаточки, наконечники.
- Зарисовать лабораторную посуду и записать ее назначение.

Мытье лабораторной посуды

1. Посуду после выполнения лабораторного анализа необходимо промыть в проточной водопроводной воде.
2. Затем тщательно промыть с помощью ершей.
3. Замочить на 1–2 часа в хромовой смеси («хромпик»). Можно использовать синтетические моющие средства, не содержащие биодобавок.
4. Отполоскать от моющего средства с помощью проточной водопроводной воды: 10 раз при использовании хромовой смеси и 15 раз – при использовании синтетических моющих средств.
5. Прополоскать в проточной дистиллированной воде 3 раза,
6. Чистую посуду высушить в сушильном шкафу при температуре 150–180°C.

Сухую посуду (колбы, стаканы) закрыть фильтровальной бумагой либо поставить в шкаф или на стол вверх дном. Пробирки сложить в чистые коробки или ящики столов, выложенные чистой фильтровальной бумагой. Сверху их также следует прикрыть фильтровальной бумагой от пыли и грязи.

Лабораторное оборудование

1. Спектрофотометры СФ–4, СФ–16, СФ–26, СФ–46.
2. Фотоэлектроколориметры (различных марок).
3. Центрифуги – различных марок и назначения.
4. рН-метры.
5. Иономеры с ионоселективными электродами.
6. Весы: аналитические, торсионные, технические.
7. Термостат.
8. Хроматографические камеры.
9. Автоматические анализаторы.

Калибровка мерной посуды

Номинальная емкость мерной посуды не всегда соответствует ее истинной емкости. Для повышения точности объемного анализа мерную посуду, используемую в лаборатории, необходимо калибровать. За единицу объема в метрической системе мер принимают «истинный литр», т.е. объем, занимаемый массой воды в 1 кг при температуре ее наибольшей плотности (т.е. при 3,98°C), взвешенной в безвоздушном пространстве.

В качестве стандартной температуры при калибровании мерной посуды в настоящее время принята температура +20 °C. «Нормальный литр» равен объему такого количества вещества, которое занимает при +20°C объем истинного литра.

Мерную посуду калибруют или проверяют, определяя вес чистой воды, содержащейся в ней, или вес воды, вылитой из нее, при определенной температуре; по весу воды рассчитывают емкость посуды.

Калибровка мерных колб. Емкость мерной колбы проверяют путем взвешивания на технических весах воды, вмещаемой колбой. Для предотвращения ошибки, связанной с

неравноплечностью технических весов, рекомендуется следующий порядок взвешивания.

Чистую сухую мерную колбу помещают на левую чашку весов. На эту же чашку ставят разновес, соответствующий весу воды в объеме калибруемой колбы. Затем уравновешивают весы и заполняют колбу дистиллированной водой, имеющей температуру окружающего воздуха. Следят за тем, чтобы при заполнении колбы капли воды не остались на стенке горла колбы выше метки (капли воды снимают фильтровальной бумагой). Колбу с водой взвешивают, уравновесив весы снятием разновеса с левой чашки. Вес воды в колбе равен весу разновесов, снятых с левой чашки весов. (Если вес воды в колбе больше веса снятого разновеса, то для уравновешивания разновесы добавляют на правую чашку весов). Определение повторяют еще два-три раза.

Калибровка пипеток. Чтобы проверить емкость пипетки, надо взвесить на аналитических весах бюкс с крышкой.

Набрать в пипетку дистиллированную воду до черты (по нижнему мениску), перенести ее во взвешенный бюкс. После опорожнения пипетки выжидают еще 15 с и только после этого отнимают кончик пипетки от стенки сосуда. В кончике пипетки всегда остается небольшое количество жидкости. На это не обращают внимания, т.к. пипетка градуируется на вытекание, и та капля, которая остается в пипетке, не входит в ее объем. Поэтому эту каплю из пипетки не следует ни выдувать, ни выжимать.

Бюкс, в который перенесли воду, закрыть крышкой и снова взвесить. Вес воды в объеме пипетки находят по разности двух взвешиваний. Процедуру определения емкости пипетки проводят трижды, используя для этого три отдельные сухие емкости, и берут среднее арифметическое из 3-х взвешиваний.

При калибровке микропипеток взвешиваемый объем должен превышать погрешность взвешивания в 100 раз, так при калибровке микропипеток вместимостью 10 мкл необходимо поместить во взвешенный бюкс не менее 5 ее объемов.

Калибровка бюреток. Процедура проверки емкости бюретки такая же, как для пипеток, только проделывать ее надо для каждого объема последовательно, т.е. если бюретка вместимостью 50 мл, то взвешивают три раза 5 мл воды (спуская воду от нулевого деления до 5) и находят поправку, затем 10 мл и т.д. до 50 мл. При использовании автоматических микропипеток лучше пользоваться одним дозатором для отбора проб и калибратора, меняя только наконечники.

Применение международной системы единиц (СИ) в лабораторной практике

Масса – величина, характеризующая инерционные и гравитационные свойства тела. Массу тела в состоянии покоя определяют взвешиванием на весах. Результат взвешивания тела на весах следует называть массой, а не весом и выражать в единицах массы – килограммах (кг), граммах (г), долях от грамма – миллиграммах (мг), микрограммах (мкг), нанограммах (нг).

Количество вещества – величина, определяемая числом структурных элементов (атомов, молекул, ионов, электронов и других частиц) в рассматриваемом веществе. За единицу количества вещества принят моль (моль – это количество вещества, содержащее столько структурных единиц, сколько содержится атомов в 0,012 кг изотопа углерода ^{12}C). Число частиц в моле любого вещества одно и то же. Оно равно $6,02 \cdot 10^{23}$ и называется «постоянной Авогадро»). Кратные и дольные единицы от моль – киломоль (кмоль), миллимоль (ммоль), микромоль (мкмоль) и др.

Молярная масса – это масса вещества, взятого в количестве 1 моль. Ее выражают в кг/моль или г/моль. В общем случае молярная масса вещества, выраженная в граммах, численно равна его относительной молекулярной (атомной) массе, выраженной в атомных единицах массы.

Массовая концентрация компонента – отношение массы компонента к объему смеси. Единицы в СИ – кг/м³, в биохимических исследованиях – г/л.

Молярная концентрация компонента (молярность компонента) – отношение количества вещества к объему смеси. Единицы в СИ – моль/м³, в биохимических

исследованиях — моль/л (для выражения концентрации веществ с известной относительной молярной массой).

Нормальная концентрация, или нормальность, выражается числом эквивалентов вещества, содержащегося в 1 л раствора. Раствор, в 1 л которого содержится один эквивалент растворимого вещества, называется нормальным (0,1 экв. вещества — децинормальным, 0,01 экв. — санинормальным, 0,001 экв. — миллинормальным).

Понятие «*активность фермента*» применяют для количественной характеристики биологических катализаторов — ферментов. В качестве единицы СИ принимается моль/с (моль в секунду) — активность фермента, катализирующего превращение 1 моля субстрата (имеется в виду убыль субстрата или образование продукта реакции) в 1 секунду при определенных условиях.

Скорость ферментативной реакции определяется по убыли субстрата или образованию продукта реакции за определенное время в определенном объеме исследуемого материала. В качестве единицы СИ принимается моль в секунду на кубический метр — моль/(с·м³). Однако для выражения результатов биохимических исследований пользуются единицами моль в секунду на литр — моль/(с·л) или чаще миллимоль в час на литр — ммоль/(ч·л).

Показатели экскреции исследуемого компонента с суточным объемом мочи принято обозначать количеством выводимого вещества, отнесенного к единице измерения «сутки» (например, ммоль/сут, мкмоль/сут, нмоль/сут).

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какую лабораторную посуду применяют в биохимии?
2. Правила мытья лабораторной посуды.
3. Какое лабораторное оборудование используют в биохимии? Какие анализы на этом оборудовании можно провести.
4. Калибровка мерной посуды.
5. Какие международные системы единиц (СИ) используются в лабораторной практике?
6. Методы расчета экспериментальных данных.
7. Какие ошибки возможны при расчетах?
8. Приведите примеры приготовления растительных образцов.
9. Приведите примеры приготовления образцов из тканей животных.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. АМИНОКИСЛОТЫ, СВОЙСТВА, КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с цветными реакциями на белки и аминокислоты.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Для аминокислот и белков характерны определенные цветные реакции. Часть этих реакций обусловлена присутствием тех или иных атомных группировок, общих для молекул различных белков, и поэтому такие реакции являются общими цветными реакциями на белки. Другие реакции связаны с наличием в молекуле белка остатка, какой либо аминокислоты и, следовательно, характерны для белков, в молекулу которых входит данная аминокислота.

2.1. БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ (РЕАКЦИЯ ПИОТРОВСКОГО)

В сильно щелочном растворе при добавлении соли меди такие вещества, как биурет ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), оксамид ($\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$), полипептиды и белки образуют сине-фиолетовые и красновато-фиолетовые комплексные соли.

Белки дают сине-фиолетовое окрашивание; продукты их гидролиза — красную или розовую окраску. Биуретовая реакция обусловлена присутствием в молекуле или двух — $\text{CO}-\text{NH}$ -групп или одной — $\text{CO}-\text{NH}$ -группы или $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ групп, связанных непосредственно между собой или посредством атома углерода или азота. Биуретовую реакцию дают пептиды, содержащие минимум три остатка аминокислот.

2.1.1. ОБНАРУЖЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Ход работы

А. Берут пять пробирок и вносят по 1 мл : в первую воды, во вторую – раствора казеина, в третью – раствора яичного белка, в четвертую – раствора желатины, в пятую – раствора α -аминокислоты. В каждую пробирку добавляют по 2 мл раствора гидроксида натрия 10 % и по 3-4 капель раствора с массовой долей сульфата меди 1 %. Содержимое каждой пробирки перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 10 минут для развития окраски. При малом содержании белка чувствительность реакции можно повысить путем наслоения на раствор белка в щелочи 1 мл раствора с массовой долей сульфата меди 1 %.

Б. При малом содержании белка и недостаточной яркости и отчетливости получаемой окраски снова смешивают в чистой пробирке растворы белка и щелочи, наклоняют пробирку и осторожно приливают по ее стенке из пипетки 0,5-1 мл раствора сернокислой меди так, чтобы он образовал в пробирке верхний слой, не смешиваясь с остальной жидкостью. В этом случае на границе слоев появляется очень отчетливое фиолетовое прозрачное кольцо.

Результаты всех реакций вносят в табл.

Таблица Биуретовая реакция на белки и аминокислоты

Исследуемый материал	Окраска продукта	Реагирующая группа
Вода		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		
Аминокислота		

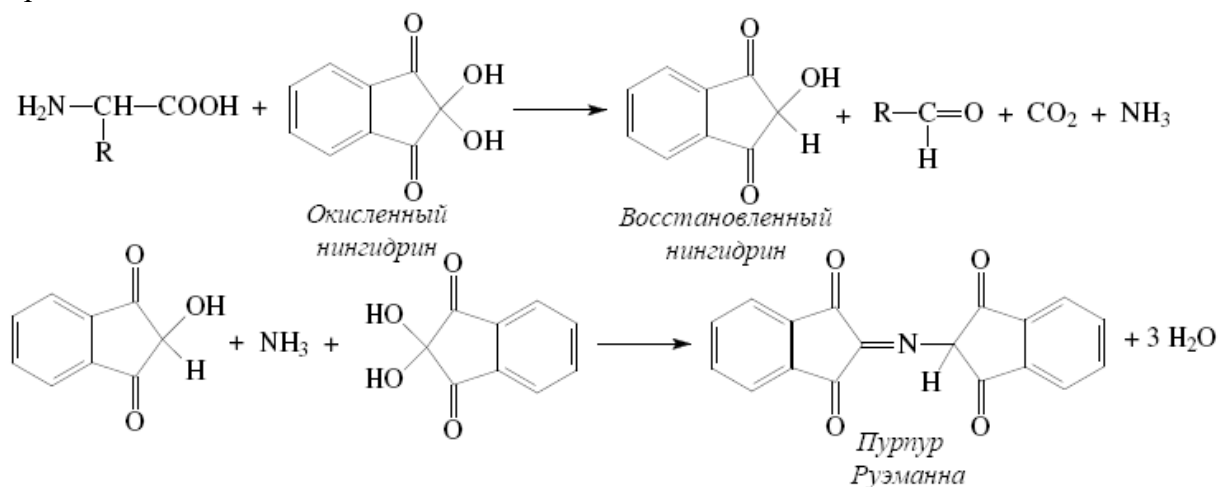
2.1.2. ОБНАРУЖЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ В МОЛЕКУЛЕ ГРАМИЦИДИНА

Ход работы

Содержимое одной таблетки с грамицидином растирают и вносят в пробирку, прибавляют тройной объем 30%-ного раствора гидроксида натрия и хорошо перемешивают. Затем из капельницы добавляют несколько капель 1%-ного раствора сульфата меди и снова хорошо перемешивают. Развивается интенсивное сине-фиолетовое окрашивание, свидетельствующее о наличии пептидных связей в молекуле грамицидина.

2.2. НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (РЕАКЦИЯ РУЭМАННА)

При нагревании растворов белков и полипептидов с нингидрином образуется синее окрашивание.



Эта реакция обусловлена присутствием α -аминокислот со свободной α -аминогруппой, которые реагируют с нингидрином, причем образуются альдегид, аммиак,

CO₂ и восстановленный нингидрин. Восстановленная форма нингидрина реагирует с избытком нингидрина и с аммиаком. При этом образуется продукт конденсации сине-фиолетового цвета.

Окраска чувствительна к [H⁺], поэтому нингидриновую реакцию ведут в нейтральном растворе. Кроме того, следует иметь в виду, что аммиак и β-аланин также дают положительную нингидриновую реакцию. Чувствительность нингидриновой реакции может быть повышена добавлением аскорбиновой кислоты.

Ход работы

В пробирку наливают 10 капель раствора белка, добавляют 5—6 капель 0,2% раствора нингидрина и кипятят. Через 1—3 минуты наблюдают появление розового, красного, а затем сине-фиолетового окрашивания. Через некоторое время раствор становится синим.

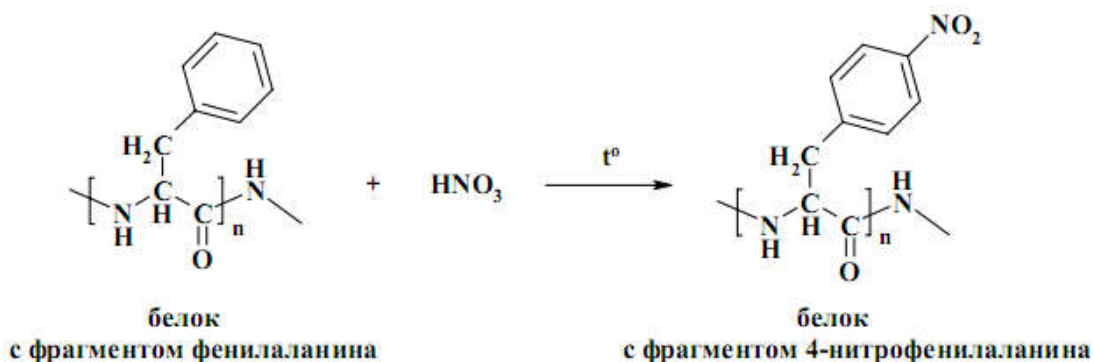
2.3. КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (МУЛЬДЕРА) (на тирозин, триптофан, фенилаланин)

Если смешать раствор белка с концентрированной азотной кислотой, то выпадает осадок белка, который при нагревании смеси частью растворяется с образованием желто окрашенного раствора (греческое «Ксантос» – желтый). При этом происходит образование нитросоединений триптофана и тирозина. Если далее к полученному раствору осторожно добавить едкой щелочи или аммиака, то появляется красновато-оранжевое окрашивание. Это окрашивание обусловлено образованием солей таутомерных ациформ нитросоединений – нитроновых кислот.



Триптофан дает более ярко-красную окраску, чем тирозин. Фенилаланин не нитруется при действии одной азотной кислоты, но при добавлении концентрированных серной и азотной кислот нитрование идет. Ксантопротеиновая реакция получается лучше с сухими препаратами белка.

Ксантопротеиновую реакцию (желтое окрашивание) можно наблюдать на коже, ногтях, шерсти и т. п. при попадании на них концентрированной азотной кислоты. Белки, не содержащие тирозина и триптофана, не дают этой реакции (желатина, сальмин и др.). В отличие от тирозина и триптофана, фенилаланин подвергается нитрованию с большим трудом и, по-видимому, не обуславливает ксантопротеиновой реакции. Поскольку ксантопротеиновая реакция обусловлена нитрованием ароматического кольца, она может быть положительной с более простыми ароматическими соединениями, например с фенолом.

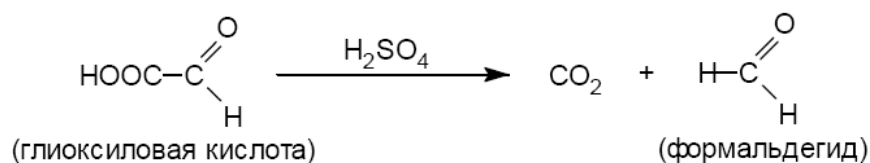


Ход работы

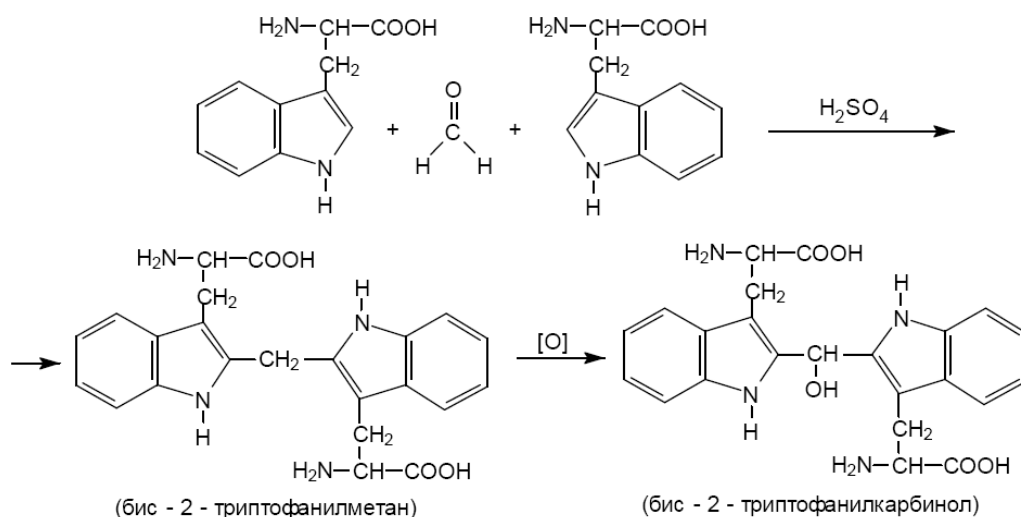
К 1 мл раствора белка добавляют 0,2-0,3 мл концентрированной азотной кислоты, появляется белый осадок или раствор мутнеет. Затем нагревают смесь на горелке до кипения и поддерживают его в течение 1-2 мин. При этом раствор и осадок окрашиваются в ярко-желтый цвет. При кипячении выделившийся осадок может полностью или частично раствориться в результате гидролиза, но характерная желтая окраска раствора сохраняется. Охладив смесь, осторожно по каплям добавляют к кислой жидкости избыток (1-2 мл) концентрированного раствора щелочи или аммиака. Выпадает осадок кислотного альбумината, образующий с избытком щелочи ярко-оранжевый раствор.

2.4. РЕАКЦИЯ АДАМКЕВИЧА

При прибавлении к раствору большинства белков несколько капель концентрированной серной кислоты получается красно-фиолетовое окрашивание. Эта реакция связана с присутствием в молекуле белка триптофана.



Две молекулы триптофана, реагируя с глиоксиловой кислотой, образуют соединение красно-фиолетового цвета:



Ход работы

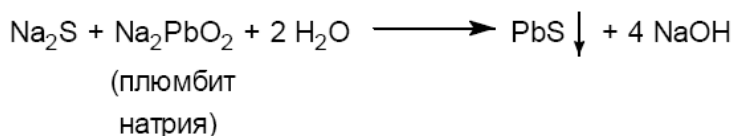
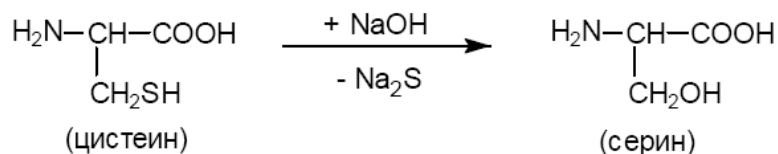
В пробирку наливают несколько капель белка, прибавляют около 1 мл уксусной кислоты и, сильно наклонив пробирку, очень осторожно, по стенке, подслаивают около 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы обе жидкости не смешивались. При стоянии через 10 мин на границе двух жидкостей получается красно-фиолетовое кольцо.

2.5. РЕАКЦИЯ НА ЦИСТЕИН (РЕАКЦИЯ ФОЛЯ)

Реакция обусловлена присутствием в белке аминокислот цистина и цистеина, содержащих слабосвязанную серу.

Эти аминокислоты под влиянием щелочи при нагревании разрушаются с образованием сероводорода. Последний в щелочной среде дает сернистый натрий, который, реагируя с плюмбитом натрия, образует черный осадок сернистого свинца. Для выявления сульфида натрия используют ацетат свинца, который при взаимодействии с гидроксидом натрия превращается в плюмбит. В результате взаимодействия ионов серы и свинца образуется сульфид свинца черного или бурого цвета. При нагревании со щелочью часть белка подвергается гидролизу. Кроме того происходит отщепление части аминок групп (реакция дезаминирования) в виде аммиака, который можно обнаружить по

запаху и посредством смоченной водой красной лакмусовой бумажки, поднесенной к отверстию пробирки (не касаться стенок!).

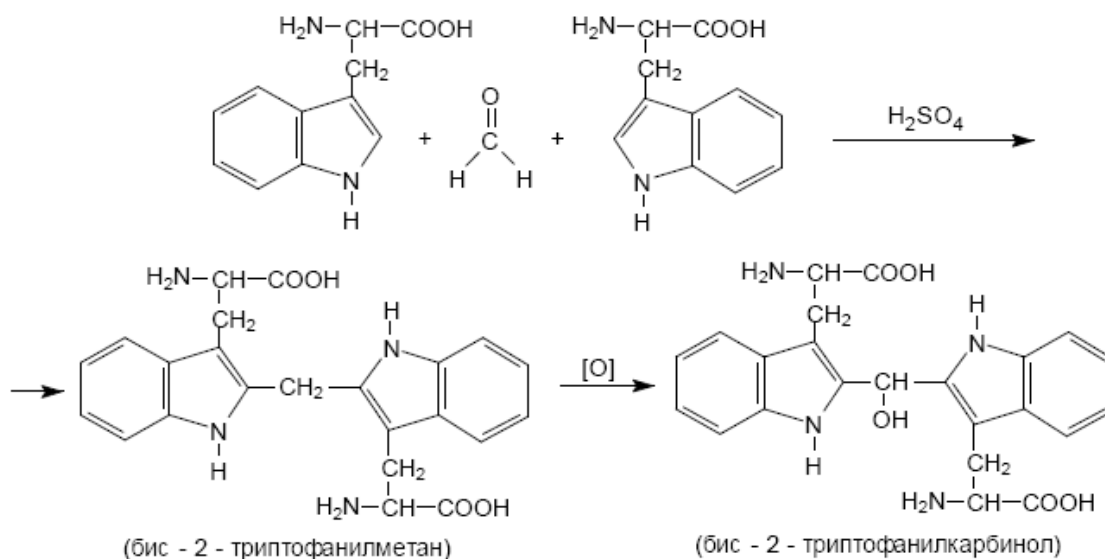


Ход работы

В одну пробирку наливают 5 капель раствора яичного белка, в другую - 5 капель 1% раствора желатина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель 30 % раствора гидроксида натрия и по 1 капле 5% раствора ацетата свинца. При интенсивном кипячении жидкость в пробирках с яичным белком темнеет, образуется черный осадок сульфида свинца. В пробирки с желатином черного осадка не образуется, объясните почему?

2.6. РЕАКЦИЯ ВАУЗЕНЕ (НА ТРИПТОФАН)

Белки, содержащие триптофан, дают в кислой среде в присутствии нитрита натрия и формальдегида сине-фиолетовое окрашивание. В этой реакции триптофан взаимодействует с формальдегидом с образованием продукта конденсации (бис-2-триптофанилметана), который окисляется нитритом натрия до бис-2-триптофанилкарбинола. Последний в присутствии минеральных кислот образует соли сине-фиолетового цвета.



Ход работы

К 1 мл 1% раствора яичного белка добавляют 1 каплю 2,5% раствора формальдегида. К полученной смеси, тщательно перемешивая, добавляют осторожно по каплям 3 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку в ванночке со льдом. Через 10 минут добавляют, перемешивая, 5 капель 0,5% раствора нитрита натрия. Появляется сине-фиолетовая окраска.

2.7. РЕАКЦИЯ С ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

При взаимодействии α-аминокислот с формальдегидом образуются относительно устойчивые карбиноламины – N-метилольные производные, содержащие свободную карбоксильную группу, которую затем титруют щелочью. Эта реакция лежит в основе

количественного определения α -аминокислот методом формального титрования (метод Сёрнсена).

Ход работы

В пробирку наливают 5 капель 1%-го раствора глицина и прибавляют 1 каплю индикатора метилового красного. Раствор окрашивается в желтый цвет (нейтральная среда). К полученной смеси добавляют равный объем 40%-го раствора формальдегида (формалин). Появляется красное окрашивание.

2.8. РЕАКЦИЯ ШУЛЬЦЕ-РАСПАЙЛЯ

Данная реакция обусловлена наличием в белке остатка триптофана. Триптофан, взаимодействуя с оксиметилфурфуролом, даёт продукты конденсации, окрашенные в вишнево-красный цвет. Оксиметилфурфурол в этой реакции образуется из гексоз (быстрее из фруктозы), получающихся при гидролизе сахарозы под влиянием концентрированной серной кислоты.

Ход работы

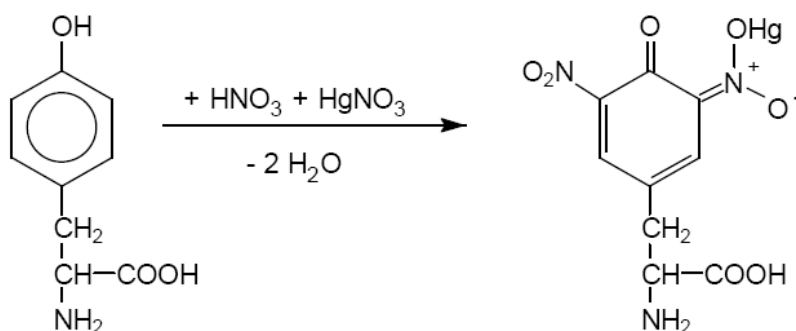
К 1 капле неразбавленного яичного белка или к 5—10 каплям сыворотки добавляют 1—2 капли 10% раствора сахарозы и пипеткой осторожно по стенке пробирки подслаивают около 1 мл концентрированной серной кислоты.

Легким встряхиванием пробирки смешивают обе жидкости. Вследствие выделения тепла при растворении H_2SO_4 в воде происходит саморазогревание жидкости на месте соприкосновения обоих слоев и появляется вишнево-красное окрашивание. Необходимо следить, чтобы жидкость не перегрелась выше 70°C , так как иначе под влиянием H_2SO_4 происходит обугливание органического вещества и раствор буреет.

2.9. РЕАКЦИЯ МИЛЛОНА

Реактив Миллона состоит из азотнокислых солей окиси и закиси ртути в HNO_3 с примесью HNO_2 . Он дает окрашивание с фенолами, полифенолами.

В случае белков реакция обусловлена присутствием в них тирозинового остатка со свободной фенольной группой. При нагревании раствора белка с реактивом Миллона образуется нитросоединение тирозина, которое, присоединяя ртуть, превращается в ртутную соль нитротирозина, имеющую пурпурно-красный цвет. Белки, не содержащие тирозин (желатина, клупеин, сальмин и др.), не дают реакции Миллона.



Ход работы

В пробирку наливают 5 капель раствора белка и 3 капли реактива Миллона. Образуется белый осадок (действие соли тяжелого металла, а также концентрированной азотной кислоты). При слабом нагревании (нагревать не выше 50°C) осадок окрашивается сначала в розовый, а затем в пурпурно-красный цвет от образования ртутной соли нитропроизводного тирозина.

Для сравнения производят аналогичным образом Миллонову реакцию с желатиной. Жидкость остается бесцветной (или слегка желтеет), так как в молекуле желатины остатки тирозина отсутствуют.

Проделяют реакцию с фенолом. В пробирку наливают 10 капель раствора фенола, 5 капель реактива Миллона и осторожно нагревают. Появляется розовое окрашивание.

2.10. РЕАКЦИЯ ПАУЛИ (НА ГИСТИДИН И ТИРОЗИН)

Реакция Паули позволяет обнаружить в белке аминокислоты гистидин и тирозин, которые образуют с диазобензолсульфоновой кислотой комплексные соединения вишнево-красного цвета. Диазобензолсульфоновая кислота образуется в реакции диазотирования при взаимодействии сульфаниловой кислоты с нитритом натрия (или калия) в кислой среде.

Ход работы

К 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты (готовится на 5% соляной кислоте) прибавляют 2 мл 0,5% раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают, добавляют 2 мл 1% раствора яичного белка и после перемешивания 6 мл 10% раствора карбоната натрия. После перемешивания смесь окрашивается в вишнево-красный цвет. Проводят эту реакцию с 0,1% раствором гистидина, сравнивают полученные результаты и делают вывод.

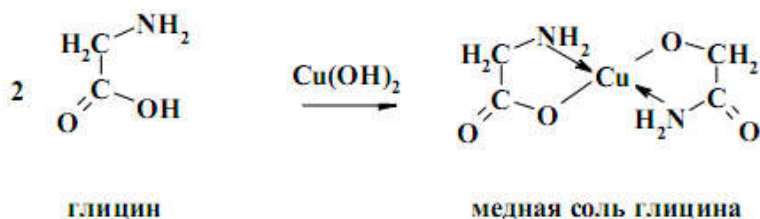
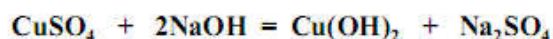
2.11. РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ С АЗОТИСТОЙ КИСЛОТОЙ (ПРОБА ГЕЛЛЕРА)

Проба Геллера основана на взаимодействии аминокислоты (аланина), нитрита натрия и кислоты.

Ход работы

К 2 мл 10 % раствора аланина приливают 2 мл 10% раствора нитрита натрия и 2 капли ледяной уксусной кислоты и встряхивают. Выделяются пузырьки газообразного азота.

2.12. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМИНОКИСЛОТ С СОЛЯМИ МЕДИ (II)



Ход работы

Поместите в пробирку 10 капель раствора глицина, туда же добавьте несколько кристаллов карбоната меди. Содержимое пробирки перемешайте и выдержите на кипящей водяной бане 3-5 минут. С осадка слейте раствор в другую пробирку, охладите. Какие видимые изменения произошли в пробирке?

2.13. ДИАЗОРЕКЦИЯ

Белки дают оранжево-красное окрашивание с диазореактивом (сульфаниловая кислота, растворенная в концентрированной хлоридной кислоты). Окрашивание зависит от образования азосоединений с остатками аминокислот - тирозина, триптофана, гистидина, которые входят в состав белковой молекулы.

Ход работы

В пробирку наливают 0,5 мл 1% раствора белка, 8 капель 10% раствора натрия карбоната и 16 капель диазосмеси (сульфаниловая кислота, растворенная в концентрированной хлоридной кислоты). Через 10 минут образуется оранжево-красное окрашивание.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

№	Название	Реактивы и условия	Окраска	Аминокислоты

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Общая характеристика пептидов, полипептидов, белков и их строения.

2. Как соединяются аминокислоты в молекуле белка и за счет каких групп?
Соедините Ала, Цис, Сер.
3. Перечислите цветные реакции на белки и аминокислоты.
4. Какая реакция открывает пептидные связи? Её химизм.
5. Что характеризуют цвет и интенсивность окраски при положительной биуретовой реакции?
6. Что открывает нингидриновая реакция? Её химизм.
7. Назовите аминокислоты имеющие в радикале бензольное кольцо. Какой реакцией можно обнаружить ароматические аминокислоты? Её химизм.
8. Назовите аминокислоты содержащие серу. Какую из них обнаруживает реакция Фоля? Химизм реакции.
9. Какую цветную реакцию используют для количественного определения белков в растворе и почему?
10. Какую цветную реакцию используют для количественного определения α -аминокислот и почему?
11. Классификация аминокислот (примеры).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3. БЕЛКИ, СВОЙСТВА БЕЛКОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Ознакомиться с реакциями осаждения белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Реакции осаждения белков весьма разнообразны, однако их можно разделить на две группы:

1) практически необратимые реакции осаждения, при которых белки претерпевают глубокие изменения и не могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе: в этом случае имеет место денатурация белка; к необратимым реакциям относятся осаждение белка солями тяжелых металлов, алкалоидными реактивами, минеральными, органическими кислотами и осаждение при нагревании;

2) обратимые реакции осаждения, при которых осаждаемые белки не подвергаются глубоким изменениям и поэтому могут быть растворены в первоначальном растворителе; молекулы белка при этом сохраняют свои первоначальные, включая биологические, свойства и не подвергаются денатурации. К обратимым реакциям осаждения следует отнести реакции осаждения белков органическими растворителями (спиртом или ацетоном) и реакции высаливания белков (осаждение под влиянием концентрированных растворов нейтральных солей щелочных и щелочноземельных металлов).

1. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА ПРИ НАГРЕВАНИИ

Почти все белки денатурируют при нагревании до температуры от 50 °С до 55 °С и выше. Механизм тепловой денатурации связан с перестройкой структуры белковой молекулы, в результате которой белок теряет свои нативные свойства и растворимость. Присутствие солей и концентрация водородных ионов играют важную роль в выпадении в осадок денатурированного при нагревании белка. Наиболее полное осаждение происходит в изоэлектрической точке белка, т.е. при такой величине рН, когда коллоидные частицы белка наименее устойчивы.

Ход работы

В пять пронумерованных пробирок наливают по 10 капель 1% раствора яичного белка. Содержимое первой пробирки нагревают на газовой горелке. Жидкость мутнеет, и, так как частицы денатурированного белка несут заряд, они удерживаются во взвешенном состоянии (яичный альбумин является кислым белком и в нейтральной среде заряжается отрицательно).

Во вторую пробирку добавляют 2-3 капли 1% уксусной кислоты и нагревают. Выпадает осадок белка вследствие того, что белок теряет заряд и находится в состоянии, близком к изоэлектрической точке.

В третью пробирку добавляют 2-3 капли 10% раствора уксусной кислоты, и

содержимое нагревают. Осадка белка не образуется даже при кипячении, т.к. в кислой среде частицы белка перезаряжаются, приобретая положительный заряд.

В четвертую пробирку добавляют 2-3 капли 10% раствора уксусной кислоты и 1 каплю насыщенного раствора хлористого натрия. Образуется осадок белка вследствие адсорбции ионов хлористого натрия (образование двойного изоэлектрического слоя) и нейтрализации положительного заряда на частицах белка.

В пятую пробирку добавляют 2-3 капли 10% раствора едкого натра и нагревают. Осадка белка не образуется даже при кипячении, т.к. в щелочной среде отрицательный заряд на частице белка усиливается. Результаты опыта внести в таблицу.

Таблица Осаждение белка при нагревании

№	Среда	Реактивы	Наблюдаемые изменения	Выводы
1	Нейтральная			
2	Слабокислая			
3	Кислая			
4	Кислая и электролит			
5	Щелочная			

2. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА КОНЦЕНТРИРОВАННЫМИ МИНЕРАЛЬНЫМИ КИСЛОТАМИ

Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами объясняется как явлениями дегидратации белковых частиц и нейтрализации их зарядов, так и рядом других причин (денатурацией, образованием солей).

В избытке серной или соляной кислот, а также при их длительном воздействии, выпавший осадок денатурированного белка растворяется за счет перезарядки белка и частичного гидролиза. В избытке азотной кислоты этого растворения не происходит (сопутствующий нитрат-ион мешает перезарядке белковой молекулы).

Ход работы

В 1-ю пробирку наливают 10 капель концентрированной соляной, во 2-ю 10 капель концентрированной азотной, в третью 10 капель концентрированной серной кислот. Затем, наклонив пробирки под углом 45°, осторожно по стенке пробирки (чтобы жидкости не смешались) наливают 10 капель раствора белка. На границе двух слоев жидкости появляется осадок белка в виде тонкой пленки. Осторожно встряхнуть пробирки, что наблюдается?

3. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА ОРГАНИЧЕСКИМИ КИСЛОТАМИ

Механизм осаждения белков органическими кислотами объясняется дегидратацией белковой и снятием заряда.

Реакции с трихлоруксусной (CCl_3COOH) и сульфосалициловой кислотами являются весьма специфическими и чувствительными (сульфосалициловая кислота открывает белок в разведении 1: 50000). Они получили широкое практическое применение в клинических лабораториях при обнаружении белка в моче и других биологических жидкостях.

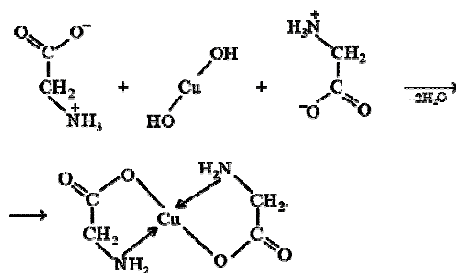
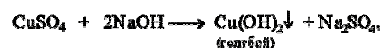
Ход работы

В две пробирки наливают по 5 капель 1% раствора белка и добавляют в одну пробирку 2 капли 10% раствора сульфосалициловой и в другую 2 капли 10% трихлоруксусной кислот. В обеих пробирках образуются осадки белка.

4. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

При действии солей тяжелых металлов на растворы белка происходит денатурация белковой молекулы. Осаждение дегидратированного белка обусловлено адсорбцией тяжелого металла на поверхности белковой молекулы и образованием нерастворимых комплексов.

Со свежеприготовленным гидроксидом меди (II) все α -аминокислоты в мягких условиях дают хорошо кристаллизующиеся внутрикомплексные (хелатные) соли меди (II) синего цвета:



глицинат меди (II)

В таких солях ион меди координационными связями соединен с аминогруппами. Избыток некоторых солей ведет к растворению (пептизации) осадка белков.

Ход работы

В три пробирки наливают по 5 капель 1% раствора яичного белка и по 2-3 капли: в первую - 7% раствора сернокислой меди, во вторую - 5% раствора уксуснокислого свинца, в третью - 5% раствора азотнокислого серебра. Наблюдается образование осадка во всех трех пробирках.

В первую пробирку добавляют еще 5-10 капель раствора сернокислой меди, во вторую - 5-10 капель уксуснокислого свинца, в третью - 5-10 капель азотнокислого серебра. Пронаблюдать, что происходит. Результаты опыта внести в таблицу 2.

5. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

При добавлении к раствору белка органических растворителей, например спирта, выпадает осадок белка. В зависимости от природы белка для его осаждения требуются различные концентрации спирта. Осаждение наступает только из нейтральных или слабокислых растворов (в слабокислой среде заряд на коллоидных частицах белка является наименьшим) и более полно в присутствии электролитов, например хлористого натрия, что связано с ослаблением внутримолекулярных ионных связей ввиду конкуренции добавленных анионов и катионов. Если осаждение производить при низкой температуре (от 0 до 15 °С) и полученный осадок быстро отделить от спирта, то белок сохраняет свои природные свойства и может быть вновь растворен в воде. Длительное воздействие спирта приводит к необратимой денатурации белка.

Однако некоторые белки, например проламины растений, растворимы в горячем 70—80% спирте, гормон поджелудочной железы — инсулин растворяется в подкисленном 60% спирте. Это зависит от особенностей их первичной структуры.

Ход работы

1. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка, а затем при взбалтывании — этиловый спирт до появления осадка. При добавлении 1—2 капель 1% раствора уксусной кислоты образование осадка усиливается. Еще большее осаждение наблюдается при добавлении нескольких капель (1—2) насыщенного раствора поваренной соли.

2. Проводят ту же реакцию, взяв вместо этилового спирта ацетон.

3. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка и добавляют равный объем хлороформа. После встряхивания пробирки и последующего разделения слоев воды и хлороформа в верхнем слое жидкости появляется осадок белка. Денатурация белка хлороформом получила распространение при выделении нуклеиновых кислот и их очистке.

4. В пробирку наливают 10 капель раствора белка и добавляют при взбалтывании фенол до появления мутности или осадка. Осадок увеличивается при стоянии.

6. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА РЕАКТИВАМИ НА АЛКАЛОИДЫ

Алкалоидные реактивы осаждают как белки, так и азотистые основания растений. Объясняется это наличием в белке азотистых гетероциклических группировок, аналогичных тем, которые находятся в молекулах алкалоидов (пиррольные, индольные, юшдазольные). Осаждение белков алкалоидными реактивами протекает в кислой среде и обусловлено образованием нерастворимых солеобразных соединений с основными

азотистыми группами белков. При этом происходит адсорбция аниона осадителя, например $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, на белковой молекуле, являющейся вследствие подкисления катионом. Белки, обладающие основным характером (протамины, гистоны), осаждаются алкалоидными реактивами в нейтральной среде.

Ход работы

1. К 5 каплям раствора белка прибавляют 1 - 2 капли насыщенного раствора танина и 1 - 2 капли 1% раствора уксусной кислоты. Выпадает осадок белка.
2. Добавить к раствору белка, подкисленного уксусной кислотой, 4-5 капель насыщенного раствора пикриновой кислоты. Образуется желтоватый осадок.
3. К подкисленному уксусной кислотой раствору белка добавить по каплям 5% раствор $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Выпадает осадок.

7. ГОРЕНИЕ КАК СПОСОБ РАСПОЗНАВАНИЯ БЕЛКОВЫХ МАТЕРИАЛОВ

Вносят в пламя пучок шерсти, волос, перья птицы и другие белковые тела. Ощущается характерный запах жженных перьев или паленого.

Этот способ может быть использован как наиболее простой для распознавания белков. Например, чтобы отличить шерстяную пряжу от хлопчатобумажной или натуральный шелк от искусственного, можно поджечь очень небольшие пучки нитей исследуемых образцов.

Шерсть и натуральный шелк горят медленно и, как белковые тела, дают при этом характерный запах. Хлопковое волокно и искусственный шелк, представляющие собой в основном клетчатку, горят быстро, выделяя запах жженой бумаги.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

Название осадителя	Употребляемые реактивы	Характер и цвет осадка	Чем обусловлена реакция
Минеральные кислоты			
Органические кислоты			
Тяжелые металлы			
Спирты			
Алкалоиды			

Практическая значимость

На явлениях денатурации белков основаны приемы и методы асептики и антисептики, дезинфекции в лечебной и практической медицине; пастеризация и консервирование продуктов в пищевой промышленности.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите основные факторы, обуславливающие стабильность молекул белка в растворе.
2. Причины осаждения белков нагреванием при pH около 7,0?
3. Характеристика обратимых и необратимых реакций осаждения белков.
4. Почему в растворе при $\text{pH} < 7,0$ белки при нагревании не выпадают в осадок?
5. Почему в растворе при $\text{pH} > 7,0$ белки при нагревании не выпадают в осадок?
6. Почему в растворе при $\text{pH} < 7,0$ с добавлением хлорида натрия белки при нагревании выпадают в осадок?
7. Механизм действия минеральных кислот на белки в растворе.
8. Механизм осаждения белков органическими кислотами.
9. Механизм осаждения белков солями тяжелых металлов.
10. Механизм осаждения белков органическими растворителями.
11. Ренатурация белков, всегда ли она возможна?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. ПРОСТЫЕ БЕЛКИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить свойства простых белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Высаливанием белков называется выделение белков из водных растворов нейтральными растворами концентрированных солей щелочных и щелочноземельных металлов. При добавлении достаточно больших концентраций этих солей к раствору белка происходит дегидратация белковых частиц и снятие заряда, при этом белок выпадает в осадок. Разные белки осаждаются при различных концентрациях солей, что зависит от ионной силы осадителя и размера частиц белковой молекулы. Например, глобулин, имеющий большой молекулярный вес, по сравнению с альбумином, легче выпадает в осадок, чем альбумин.

1.1. ВЫСАЛИВАНИЕ БЕЛКОВ СЕРНОКИСЛЫМ АММОНИЕМ

В пробирку наливают 20 капель неразведенного яичного белка, добавляют равный объем насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и перемешивают. Получается полунасыщенный раствор, при котором выпадает осадок глобулинов. Через 5 мин осадок отфильтровывают. В фильтрате остается другой белок – альбумин. К фильтрату добавляют измельченный порошок $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до полного насыщения. Выпавший осадок отфильтровывают. Фильтрат проверяют на полноту осаждения, проделав биуретовую реакцию.

1.2. ВЫСАЛИВАНИЕ БЕЛКОВ ХЛОРИСТЫМ НАТРИЕМ И СЕРНОКИСЛЫМ МАГНИЕМ

В две пробирки наливают по 2-3 мл раствора белка. Прибавляют при перемешивании до полного насыщения раствора, т.е. до момента, когда часть кристаллов солей перестают растворяться, в одну пробирку тонко измельченного NaCl , а в другую – MgSO_4 , через несколько минут в обеих пробирках появляется осадок. Объясните, какой белок переходит в нерастворимое состояние в этих опытах?

Содержимое пробирок отфильтровывают и прибавляют к фильтрату несколько капель разбавленной CH_3COOH до слабокислой реакции. Что при этом происходит? Результаты опыта занести в таблицу 1.

Таблица 1

Высаливание белков

Белок	Используемая соль	Степень насыщения	Образование осадка
Глобулин			
Альбумин			

2. ДИАЛИЗ БЕЛКОВ

Метод диализа основан на неспособности коллоидных частиц проникать через полупроницаемые мембраны, в то время как частицы кристаллоидов легко проходят через них. Обладая большим диаметром, частицы белка не способны к проникновению через мембраны. Диализ широко используется для очистки белков от низкомолекулярных примесей.

Ход работы

К 1 мл яичного белка добавляют 3-4 мл 5% раствора NaCl , этот раствор наливают во влажный диализный мешочек. Закрепляют верхний край мешочка двумя стеклянными палочками, скрепляют их концы резиновыми кольцами и помещают в стакан с дистиллированной водой на 30 мин, меняя воду каждые 10 мин. Через некоторое время содержимое мешочка мутнеет, а затем выпадает в осадок глобулин.

По окончании диализа с небольшими порциями диализата (наружная жидкость) и диализируемой жидкости проделывают реакции на хлориды, белок и убеждаются в том, что минеральные соли диффундировали во внешний сосуд, а белок остался в мешочке.

Для этого к 10 каплям диализата прибавляют 10 капель 10% раствора HNO_3 и 1-2 капли 1% раствора AgNO_3 . Выпадает осадок AgCl .

К 10 каплям диализата прибавляют 5 капель 10% раствора NaOH и 1-2 капли раствора CuSO_4 . Синее окрашивание свидетельствует об отсутствии белка в диализате.

Провести аналогичные реакции с 10 каплями диализируемой жидкости.

Образующееся фиолетовое окрашивание свидетельствует о наличии белка, а вот осадка AgCl не выпадает, что свидетельствует об отсутствии хлоридов в диализируемой жидкости.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ ПРИРОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

1. ВЫДЕЛЕНИЕ ЯИЧНОГО АЛЬБУМИНА

Яичный белок представляет собой смесь нескольких белков. Примерно 70% яичного белка составляет альбумин, который легко отделяется от глобулинов. При десятикратном разведении яичного белка дистиллированной водой глобулины выпадают в осадок, а альбумин остается в растворе.

Ход работы

Чтобы отделить белок от желтка, осторожно проделывают отверстия в скорлупе яйца с двух концов и выливают белок в стакан емкостью 500 мл, затем в стакан добавляют 250 мл дистиллированной воды и содержимое тщательно перемешивают стеклянной палочкой с резиновым наконечником. Раствор переносят в мерный цилиндр, и объем доводят дистиллированной водой до 300 мл. Раствор оставляют на несколько минут при комнатной температуре для образования хлопьевидного осадка глобулинов.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ СЕМЯН ЗЛАКОВЫХ И БОБОВЫХ

2.1.ВЫДЕЛЕНИЕ АЛЬБУМИНОВ

Альбумины – белки, которые растворяются в воде. К этим белкам относятся белки зародыша семян злаковых растений, белки семян двудольных растений и другие. Из водных растворов эти белки хорошо высаливаются, а при кипячении – денатурируют. Название белков обычно связано с ботаническим названием растения, в котором они локализованы. Альбумины у пшеницы и риса называются лейкозинами, гороха – легумелинами, а у клещевины – рицинами.

Ход работы

В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл воды, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38°C на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6-10 мин. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор альбуминов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании альбуминов в исследуемых объектах.

Если к 1 мл раствора альбуминов пшеничной или гороховой муки добавить по 4 мл насыщенного раствора NaCl то белки выпадут в осадок, вначале в виде мути медленно оседающей на дно пробирки. Результаты записать в журнал.

2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ГЛОБУЛИНОВ

Глобулины (от лат. *globulus* – шарик), группа животных и растительных белков, наиболее широко распространенных в природе. Встречаются вместе с альбуминами. Относятся к глобулярным белкам; растворимы в слабых растворах нейтральных солей, разбавленных кислотах и щелочах; нерастворимы в воде (за исключением, например, миозина). Большинство глобулинов – простые белки. Глобулины кукурузы получили название маизин, фасоли – фазеолин, гороха – легулеин, арахиса – арахин, тыквы – кукурбитин. Глобулины составляют большую часть белков семян масличных культур.

Ход работы

В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл 10% раствора NaCl , перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38°C на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6-10 мин. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор глобулинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой

реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании глобулинов в исследуемых объектах.

Если к 1 мл раствора глобулинов пшеничной или гороховой муки добавить по 1 мл насыщенного раствора NaCl то белки выпадут в осадок, вначале в виде мути медленно оседающей на дно пробирки. Результаты записать в журнал.

2.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОЛАМИНОВ

Проламины – белки, которые растворяются в 60-80% растворе этилового спирта. Простые запасные белки, содержащиеся лишь в семенах злаков: глиадин – в пшенице, ржи, зеин – в кукурузе, гордеин – в ячмене, авенин – в овсе, оризин – в рисе, кафирин – в сорго. В зерне глиадин и глутенин образуют клейковину, от содержания которой зависят качества пшеницы.

Ход работы

В пробирки вносят по 1 г: в первую – пшеничной или ячменной муки, во вторую – гороховой. В обе наливают по 10 мл 70% раствора этанола, перемешивают и ставят в термостат при температуре 37-38°C на 30 мин, перемешивая содержимое пробирок через каждые 6-10 мин. По истечении указанного времени содержимое пробирок вместе с осадком переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют 10 мин со скоростью 3000 об/мин или фильтруют через складчатый фильтр. Полученный прозрачный раствор проламинов сливают в чистые сухие пробирки и используют для проведения биуретовой реакции. По интенсивности окраски делают вывод о содержании проламинов в исследуемых объектах. Если к 2 мл раствора проламинов пшеничной или гороховой муки добавить по 2 мл воды, то белки выпадут в осадок, раствор мутнеет. Результаты записать в таблицу 17.

Таблица 17

Содержание простых белков в пшенице и горохе

Объекты исследования	Простые белки		
	Альбумины	Глобулины	Проламины
Мука пшеничная			
Горох			

3. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЯСА

С помощью высаливания мышечные белки могут быть разделены на следующие фракции, отличающиеся друг от друга по растворимости:

- а) миогенная (альбуминовая) водорастворимая, из которой находится ряд ферментных систем, выпадает в осадок при полунасыщении раствора серноокислым аммонием;
- б) глобулиновая, представляющая собой тоже смесь белков-ферментов, выпадает в осадок при полном насыщении раствора серноокислым аммонием;
- в) миозин, основной сократительный белок мышечных волокон глобулиновой природы, осаждается при насыщении раствора хлористым натрием;
- г) актин, белок мышечных фибрилл;
- д) коллаген, белок соединительной ткани мышц;
- е) строма, белки клеточных структур.

3.1. ЭКСТРАКЦИЯ АЛЬБУМИНОВ

Ход работы

2 г мышечной кашицы помещают в стаканчик или большую широкую пробирку, заливают 10 мл дистиллированной воды и в течение 15 мин постоянно перемешивают; при этом в раствор переходят альбумины.

Жидкость отделяют от мышечной кашицы через два слоя марли, положенной на воронку; оставшуюся на марле кашицу отжимают руками, помещают ее в стаканчик и заливают 10 мл 10% раствора NH₄Cl для извлечения глобулинов. Фильтрат делят на две части и проводят реакции, доказывающие, что в водном экстракте находится альбуминовая фракция белков мышечной ткани. В одной части фильтрата исследуют с помощью

универсальной индикаторной бумажки реакцию среды. Если фильтрат имеет кислую реакцию, то его нагревают в пробирке до кипения и наблюдают образование осадка белка.

Если же фильтрат имеет нейтральную или слабощелочную реакцию, то его предварительно слабо подкисляют 1% CH_3COOH , прибавляя ее по каплям, перемешивая после каждой капли и проверяя, каждый раз реакцию по универсальной индикаторной бумаге, и лишь затем нагревают до кипения. К оставшейся половине фильтрата добавляют порошок $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до насыщения, при этом выпадает осадок альбуминов.

3.2. ЭКСТРАКЦИЯ ГЛОБУЛИНОВ

Экстракцию глобулинов NH_4Cl производят в течение 15 мин при постоянном перемешивании. Солевую пробу центрифугируют. В осадке остаются белки стромы и соединительной ткани.

Центрифугат (жидкая часть) делят на 4 части и проделывают реакции, доказывающие присутствие глобулинов в солевом экстракте.

Нагревают одну часть фильтрата, образуется осадок в результате денатурации глобулинов.

К другой части фильтрата добавляют равный объем насыщенного раствора $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (полунасыщение), выпадает осадок глобулинов.

К третьей части фильтрата приливают 10 мл дистиллированной воды, образуется хлопьевидный осадок глобулинов; содержимое пробирки центрифугируют; осадок делят на 2 части и каждую взбалтывают в 2 мл воды.

К одной части жидкости с осадком прибавляют 1% раствор HCl до растворения осадка, затем нейтрализуют 1% раствором NaOH , добавляя его по каплям до выпадения осадка глобулинов.

К другой части жидкости с осадком добавляют 1% раствор NaOH до растворения осадка, затем нейтрализуют 1% раствором HCl до выпадения осадка глобулинов.

3.3. ОСАЖДЕНИЕ МИОЗИНА ИЗ ГЛОБУЛИНОВОЙ ФРАКЦИИ МЫШЕЧНЫХ БЕЛКОВ

К оставшейся четвертой части фильтрата, содержащей глобулины, добавляют порошок NaCl до полного насыщения; при этом выпадает осадок миозина.

4. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ СОЕВОГО МЯСА

Из соевого мяса можно выделить растительный альбумин.

Ход работы

1,5 г сухого соевого мяса растирают в ступке, переносят в стакан, смешивают с 5 мл воды и оставляют смесь на 15-20 мин при частом встряхивании, после чего переносят ее в воронку на большой складчатый фильтр. Довольно быстро получают раствор, содержащего растительный альбумин.

5. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МОЛОКА

Молоко и молочные продукты являются важнейшими продуктами питания, которые рекомендуется употреблять ежедневно, особенно детям дошкольного возраста, школьникам и подросткам. Молоко и молочные продукты хорошо сбалансированы и легко усваиваются организмом, богаты высококачественным полноценным белком, содержат необходимые для жизнедеятельности жирные кислоты, иммуноглобулины, витамины и микроэлементы.

Ход работы

К 50 мл натурального молока добавляют равный объем воды и затем по каплям при помешивании 0,2-0,5 мл конц. CH_3COOH до образования хлопьев. Через 5-10 мин смесь фильтруют через полотно. Фильтрация идет быстро.

Остаток на фильтре, имеющий консистенцию жидкой сметаны, состоит главным образом из казеина. Для получения раствора казеина к этому остатку (или к 5-6 г творога, растертого в ступке с 10-15 мл воды) добавляют 1 мл 30% раствора NaOH . Щелочную смесь слегка растирают в ступке, приливая воду до общего объема 25-30 мл, и фильтруют через складчатый бумажный фильтр, предварительно хорошо смоченный водой.

6. ВЫДЕЛЕНИЕ ФИБРИНОГЕНА ИЗ ПЛАЗМЫ

Содержание фибриногена в плазме 2-4 г/л, его молекулярная масса около 330000. Молекулы фибриногена имеют вытянутую форму с соотношением осей 20:1, такая форма молекул обуславливает высокую вязкость растворов фибриногена. В процессе свертывания крови фибриноген превращается в фибрин. В отличие от фибриногена фибрин не растворяется в воде и имеет значительно большую молекулярную массу.

При добавлении к плазме крови хлорида натрия до концентрации 10% в осадок выпадает практически только фибриноген, а все другие белки плазмы остаются в растворе.

Ход работы

В центрифужную пробирку наливают 2 мл плазмы крови. Взвешивают 200 мг сухого NaCl, высыпают в пробирку с плазмой и перемешивают до полного растворения. Наблюдают образование осадка. Центрифужную пробирку с раствором уравнивают с центрифужной пробиркой, в которую наливают дистиллированную воду. Пробирку центрифугируют 15 мин при 3500 об/мин. Супернатант сливают в стакан. Осадок представляет собой плотную массу с хорошо выраженной волокнистой структурой.

7. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ КЕРАТИНОВ

Склеропротеины, альбуминоиды, протеиноиды – простые белки животного происхождения; нерастворимы в воде и разбавленных растворах солей, кислот и щелочей. Наиболее важные склеропротеины – коллаген, кератин и фиброин шёлка. Все они имеют фибриллярную структуру. Находясь в организмах в твёрдом или пластическом состоянии, склеропротеины обеспечивают механическую прочность органов, защищают от воздействий внешней среды, а также образуют опорные сетчатые структуры внутри клеток и мембран, влияя на проницаемость последних. В природном состоянии склеропротеины (за исключением эластина) не подвергаются гидролизу протеолитическими ферментами и поэтому не имеют питательной ценности.

1. ДЕЙСТВИЕ ВОДЫ И РАЗБАВЛЕННЫХ КИСЛОТ

В две пробирки помещают по 0,2 г роговых стружек или волос. В первую пробирку наливают 5-7 мл холодной воды, во вторую – столько же 2% раствора H_2SO_4 . Наблюдают, что растворится. Содержимое пробирок кипятят; растворение не происходит. Наблюдается некоторое размягчение роговых стружек в горячей воде, которое при охлаждении и высушивании исчезает.

2. ДЕЙСТВИЕ ЩЕЛОЧИ

В пробирку помещают 0,2 г роговых стружек или волоса, заливают 10% раствором NaOH. При нагревании происходит частичный гидролиз кератина, в результате чего стружки растворяются и в растворе можно обнаружить аминокислоты.

3. ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА АМИНОКИСЛОТЫ В СОСТАВЕ КЕРАТИНА

А. 2 мл щелочного раствора кератина помещают в пробирку, добавляют 0,5 мл раствора $(CH_3COO)_2Pb$, нагревают. Появляется резко положительная реакция, свидетельствующая о том, что в кератине много аминокислот, содержащих серу;

Б. При нагревании роговых стружек с конц. HNO_3 появляется желтое окрашивание; это указывает на наличие в кератине аминокислот с бензольным ядром;

В. При нагревании с реактивом Миллона роговые стружки приобретают красноватое окрашивание, что указывает на содержание в кератине тирозина.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Общая характеристика метода хроматографии, и ее роль в биохимии.
2. Назовите основные виды хроматографии.
3. Общая характеристика принципа хроматографии.
4. Назовите разновидности метода хроматографии на бумаге, и чем они отличаются.
5. Как рассчитывается коэффициент подвижности (R_f) и что он характеризует?
6. Что такое «идентификация аминокислот» и как её проводят.

7. Способы гомогенизации биологического материала.
8. Методы определения гомогенности белковых препаратов.
9. Методы гидролиза белков.
10. Как осуществляется экстракция белков?
11. Методы фракционирования белков.
12. Методы очистки белков.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5. СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить состав сложных белков на примере нуклеопротеидов, гликопротеидов, фосфопротеидов и хромопротеинов. Освоить методы выделения и исследования химического состава сложных белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Сложные белки при гидролизе распадаются на простые белки и небелковую часть, называемую простетической группой. Сложные белки подразделяются на подгруппы в зависимости от характера простетических групп. К важнейшим сложным белкам относятся: нуклеопротеиды, гликопротеиды, фосфопротеиды, хромопротеиды, липопротеиды. Они выполняют в организме различные функции. К сложным белкам относятся и многие ферменты.

1. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ГЛИКОПРОТЕИДОВ

Гликопротеиды - сложные белки, содержащие в качестве простетической группы углеводы и их производные. Из гликопротеидов наиболее распространены муцин и мукоиды, входящие в состав всех тканей и жидкостей. Муцин содержится в слюне и других слизистых выделениях желез, мукоиды - в хрящах, связках и др. Гликопротеиды не растворимы в воде, хорошо растворяются в щелочах, в кислой среде выпадают в осадок.

Ход работы

1.1.1. ВЫДЕЛЕНИЕ МУЦИНА ИЗ СЛЮНЫ

В пробирку берут около 2 мл слюны и по каплям прибавляют концентрированную уксусную кислоту (4-5 капель). Образуется сгусток муцина.

1.1.2. НАФТОЛОВАЯ ПРОБА НА УГЛЕВОДНЫЙ КОМПОНЕНТ (реакция Подобедова)

Углеводы муцина обнаруживают нафтоловой пробой (реакция Подобедова-Молиша).

Реакция обусловлена взаимодействием оксиметилфурфурола, образующегося из гексоз под влиянием серной кислоты с α -нафтолом. При этом образуется окрашенный продукт конденсации.

Эта реакция дает положительный результат со всеми веществами, в состав которых входят углеводы.

Ход работы

К сгустку муцина добавляют 1-2 капли 1% раствора (спиртового) α -нафтола или тимола, перемешивают, а затем по стенке осторожно приливают 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе раздела двух слоев жидкостей появляется фиолетово-красное кольцо (хорошо заметно на белом фоне).

1.2. ОТКРЫТИЕ УГЛЕВОДНОГО КОМПОНЕНТА В ЯИЧНОМ БЕЛКЕ

В сухую пробирку вносят 5 капель 10% раствора белка и проводят реакцию Молиша. На дне пробирки появляется красное окрашивание.

1.3. ОТКРЫТИЕ УГЛЕВОДНОГО КОМПОНЕНТА В ДЕНАТУРИРОВАННОМ ЯИЧНОМ БЕЛКЕ

А. В пробирку помещают кусочек вареного яичного белка и 3 мл концентрированной соляной кислоты. Осторожно нагревают не доводя до кипения. Белок приобретает фиолетовое окрашивание.

Б. В две пробирки вносят по 1 мл 1% раствора яичного белка. В 1-ю вносят 2-3 капли 0,1% раствора альфа-нафтола, во 2-ю пробирку 2-3 капли 1% раствора тимола.

Содержимое пробирок перемешивают и осторожно по стенке доливают по 0,5 мл конц. серной кислоты и дают постоять. На границе раздела фаз в 1-й пробирке появляется фиолетовое кольцо, во 2-й пробирке – красное кольцо.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ФОСФОПРОТЕИДОВ

Фосфопротеины состоят из простого белка и фосфорной кислоты в качестве простетической группы. Фосфорная кислота соединена с остатками оксиаминокислот (серии, треонин) белковой части по типу сложных эфиров. К фосфопротеинам относится казеин молока, ововителлин яичного желтка и др. Они являются питательным материалом. Вместе с аминокислотами фосфопротеины доставляют необходимую для организма фосфорную кислоту. Фосфорная кислота особенно важна для развития скелета и зубов растущих организмов.

2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ КАЗЕИНА ИЗ МОЛОКА

В молоке казеин содержится в виде растворимой кальциевой соли. При подкислении казеинат кальция разлагается и выпадает в осадок в свободном виде. Избыток кислоты мешает осаждению, т.к. при pH ниже изоэлектрической точки (изоэлектрическая точка казеина pH = 4,7) молекула белка перезаряжается, и казеин вновь переходит в раствор.

Ход работы

10 мл молока разбавляют равным количеством дистиллированной воды и осаждают казеин 10 каплями 10% раствора уксусной кислоты. Реакцию среды определяют на pH-метре или с помощью индикаторной бумаги. Выделившийся в виде хлопьев казеин отфильтровывают и промывают на фильтре дистиллированной водой 2-3 раза. Небольшие порции осадка снимают с фильтра шпателем и продельвают цветную реакцию на белок (биуретовую).

2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ В КАЗЕИНЕ

К 1 мл раствора казеина добавляют 2 мл раствора молибдата аммония в азотной кислоте. Смесь слегка нагревают. Образуется осадок фосфорномолибденовокислого аммония $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3$.

2.3. ПРОБА НА ПОЛИПЕПТИДНЫЙ КОМПОНЕНТ КАЗЕИНА

Проба на полипептидный компонент казеина проводится по биуретовой реакции. В пробирку с исследуемым веществом добавляют по 2 мл раствора гидроксида натрия 10 % и по 3-4 капель раствора с массовой долей сульфата меди 1 %. Содержимое пробирки перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 10 минут для развития окраски.

2.4. ГИДРОЛИЗ КАЗЕИНА И ОТКРЫТИЕ ЕГО СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ

При щелочном гидролизе казеин распадается на белок и фосфорную кислоту. Белок открывают биуретовой реакцией, а фосфорную кислоту молибденовой пробой.

Ход работы

К 100 мг сухого измельченного казеина прибавляют 5 мл 10% натра и помещают в кипящую водяную баню на 30 минут, помешивая время от времени содержимое пробирки.

После охлаждения к 10 каплям гидролизата прибавляют 5 капель 10% раствора гидроксида натрия и по каплям 1% раствор сернокислой меди до появления красно-фиолетового или сине-фиолетового окрашивания. Положительная биуретовая реакция доказывает белковую природу казеина.

Для открытия фосфорной кислоты к 20 каплям гидролизата прибавляют 10 капель 25% азотной кислоты (до кислой реакции) и 10 капель раствора молибденовокислого аммония в азотной кислоте. Оставляют стоять на 5 минут.

Образующийся осадок белка и высокомолекулярных продуктов неполного гидролиза белков отфильтровывают с помощью бумажного фильтра.

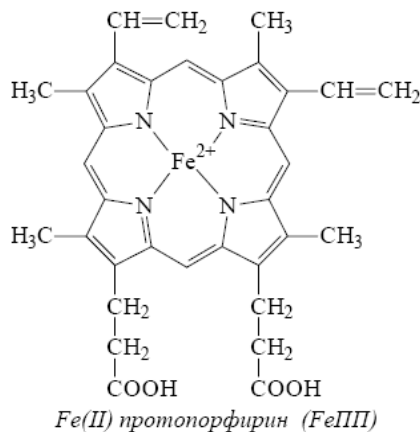
К фильтрату, содержащему фосфорномолибденовокислый аммоний прибавляют 10 капель 2% раствора гидрохинона и оставляют стоять на 5 минут.

К содержимому пробирки добавляют 20 капель раствора сульфита натрия медленно, по каплям, во избежание сильного образования пены. В присутствии фосфорной кислоты

постепенно развивается синее окрашивание раствора.

3. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ХРОМОПРОТЕИДОВ

Биологические пигменты – окрашенные вещества, содержащиеся в тканях животных и растений. Химическая природа и биологическая роль пигментов различны. Обширную группу пигментов составляют хромопротеиды – сложные белки, содержащие окрашенные простетические группы. К ним относится красный гемоглобин, принимающий участие в переносе кислорода; зеленый хлорофилл, принимающий участие в осуществлении процессов фотосинтеза.



Красные водоросли обязаны своей окраской пигменту фикоэритрину, который подобно хлорофиллу, активно участвует в фотосинтезе. К растительным пигментам относятся также антоцианины, обеспечивающие образование розовой, красной, синей и фиолетовой окраски цветов и плодов, а также флавоны, окрашивающие растительные ткани в желтые цвета.

3.1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПИГМЕНТОВ НА БУМАГЕ

Метод распределительной хроматографии смесей, состоящих из нескольких близких по строению и свойствам веществ, основан на явлении адсорбции. Разделение таких веществ основано на неодинаковом коэффициенте распределения каждого из них. Каждое вещество, обладая характерным коэффициентом распределения, продвигаясь вместе с растворителем через слой адсорбента, адсорбируется на разной высоте этого слоя – происходит разделение смеси веществ.

Ход работы

Берут 2 г мелко измельченных свежих листьев, помещают их в фарфоровую ступку и добавляют небольшое количество стеклянного песка и щепотку мела (для нейтрализации органических кислот, находящихся в растительном соке). К полученной смеси небольшими порциями добавляют 10 мл ацетона, непрерывно растирая содержимое ступки. Когда в ступке образуется однородная масса, ее фильтруют через бумажный фильтр в химический стакан. В отфильтрованный ацетоновый экстракт из листьев опускают на 2-3 мм полосу фильтровальной бумаги размером 4x25 мм, укрепленную при помощи зажима на стеклянной палочке. Полоска бумаги не должна касаться стенок стакана. Спустя 20-30 мин наблюдают зональное разделение разноокрашенных растительных пигментов на полосе фильтровальной бумаги.

3.2. РАЗДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ ЛИСТА (ПО КРАУСУ)

Для разделения пигментов используют разную растворимость пигментов листа в спирте и бензине.

Ход работы

Истертые в порошок листья настаивают на спирте (для ускорения извлечения следует поставить колбочку с извлекаемым материалом в кипящую воду). Темно-зеленый экстракт фильтруют через бумажный сухой фильтр. При извлечении пигментов из свежего материала листья мелко нарезают ножницами, помещают в фарфоровую ступку и

растирают пестиком с небольшим количеством спирта. После растирания прибавляют несколько миллилитров спирта и экстракт фильтруют. В пробирку наливают 3-5 мл спиртовой вытяжки, прибавляют несколько большее по объему количество высококачественного бензина и несколько раз энергично встряхивают, закрыв пробирку пробкой. В результате встряхивания происходит разделение пигментов: в верхний, бензиновый слой перейдут два зеленых пигмента и каротин, а в нижнем, спиртовом слое останется ксантофилл. Если после встряхивания слои полностью не разделяются, необходимо прибавить несколько капель воды (осторожно по каплям), чтобы разбавить спирт и обусловить его несмешиваемость с бензином.

3.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХЛОРОФИЛЛА

По своей химической природе хлорофилл – сложный эфир. В центре молекулы находится Mg, который может связываться с азотом четырех пиррольных колец. Зеленый цвет хлорофилла зависит от наличия магния в его молекуле. Связь Mg с ядром частицы хлорофилла очень непрочна: Mg легко замещается атомом водорода даже при воздействии слабой кислотой. Побурение листьев (при отмирании от мороза или при кипячении) зависит от воздействия на хлорофилл кислот клеточного сока.

3.3.1. ОМЫЛЕНИЕ ХЛОРОФИЛЛА

По своей химической природе хлорофилл – сложный эфир, поэтому его можно омылить щелочью.

Ход работы

В пробирку с разделенными слоями экстракта хлорофилла прибавляют небольшой кристаллик щелочи (KOH или NaOH), закрывают пробкой и энергично взбалтывают до растворения щелочи. Происходит омыление хлорофилла и разделение слоев. В нижнем, вводно-спиртовом, слое будут ксантофилл и соли хлорофиллиновой кислоты, а в бензиновом, верхнем, останется каротин. Следует обратить внимание на то, что раствор солей хлорофиллиновой кислоты имеет тоже зеленый цвет. Объясняется это тем, что при омылении отщепляются спирты (метиловый и фитол) и не затрагивается ядро молекулы хлорофилла, где находится магний.

3.3.2. ОМЫЛЕНИЕ СПИРТОВОЙ ВЫТЯЖКИ ХЛОРОФИЛЛА

К 3 или 4 мл спиртовой вытяжки хлорофилла приливают 1 мл 20%-ного спиртового раствора щелочи. Осторожно нагревают до вскипания (2-3 раза). К охлажденному раствору приливают равный объем бензина и 2-3 мл воды. После встряхивания получается разделение, обратное полученному в опыте (по Краусу), т.е. в верхнем, бензиновом, слое будут неизменные желтые пигменты (ксантофилл также переходит в бензин вследствие разбавления спирта водой), а в нижнем, вводно-спиртовом, растворе – продукты омыления хлорофилла (той же зеленой окраски, что и хлорофилл).

3.3.3. ПОЛУЧЕНИЕ ФЕОФИТИНА

Для опыта берут в пробирку 3-5 мл спиртовой вытяжки хлорофилла и прибавляют каплю крепкой соляной кислоты. При взбалтывании цвет раствора меняется из зеленого на бурый. Под влиянием кислоты от хлорофилла отщепляется Mg, на место которого становится водород кислоты. В результате реакции образовался феофитин (бурого цвета) и соль Mg.

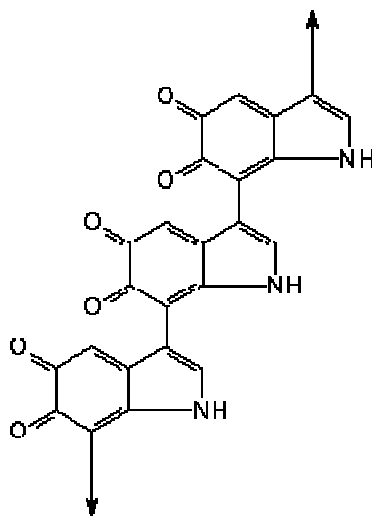
3.3.4. ВОССТАНОВЛЕНИЕ МЕТАЛЛО-ОРГАНИЧЕСКОЙ СВЯЗИ В ХЛОРОФИЛЛЕ

Полученный новый пигмент феофитин может быть вновь превращен в металло-органическое соединение с восстановлением зеленой окраски. Для этого в побуревший раствор бросают небольшой кристаллик ацетата меди или цинка и нагревают раствор на кипящей водяной бане. Бурый цвет раствора меняется на ярко-зеленый вследствие образования металло-органического соединения меди или цинка.

4. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЛАНИНОВ

Меланины (от греч. mélas, родительный падеж mélanos — чёрный), коричневые и чёрные или жёлтые высокомолекулярные водонерастворимые пигменты. Широко

распространены в растительных и животных организмах; определяют окраску покровов и их производных (волос, перьев, чешуи) у позвоночных, кутикулы у насекомых, кожуры некоторых плодов и т.д. Предшественником в организме является аминокислота тирозин, окисление которого в диоксифенилаланин (ДОФА), а затем — в ДОФА-хинон катализирует фермент тирозиназа.



4.1. МЕТОД ЩЕЛОЧНОЙ И КИСЛОТНОЙ ЭКСТРАКЦИИ

Пигменты извлекаются из сырья животного (перья птиц, шерсть животных, подмор пчел) или растительного происхождения (чага, плоды винограда, плоды каштана, подсолнечная лузга, кожура банана, листовый черный чай, семенные оболочки гречки). Извлечение ведут либо растворами 6 н. HCl либо 1 н. NaOH или KOH.

Ход работы

5 г гидролизуемого вещества помещают в круглодонную колбу на 1000 мл, добавляют 250 мл 6 н. раствор соляной кислоты или 1 н. NaOH или KOH и 100 мл дистиллированной воды. Колбу закрывают пробкой с воздушным холодильником, роль которого может выполнять стеклянная трубка длиной 25 - 30 см. Закрепляют колбу с небольшим наклоном и кипятят под тягой на асбестовой сетке. Охлаждают, доводят объем до 500 мл дистиллированной водой, фильтруют. Растворенный в щелочи пигмент переводится в осадок при использовании: ацетона; этилового спирта; при насыщении раствора $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$.

В некоторых случаях нейтрализация является недостаточной для осаждения пигмента и раствор приходится подкислять до pH = 4,6.

В присутствии большого количества FeCl_3 и Fe_2CO_3 из меланинового раствора выпадает тонкодисперсный коричневый осадок.

4.2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МЕЛАНИНОВ

Структура меланинов такова, что они могут существовать в двух формах — восстановленной и окисленной. Поэтому под действием сильных окисляющих агентов меланины обесцвечиваются, что может служить доказательством наличия меланинов в растворе.

Ход работы

1. Растворы полученных пигментов в 0,1 н NaOH легко обесцвечиваются равными объемами концентрированной H_2O_2 .

2. При добавлении 0,1 н раствора KMnO_4 к растворам пигментов наблюдается изменение окраски растворов с красно-розовой до светло-зеленой, вызываемое восстановлением перманганата калия до марганца и оксидов.

3. При добавлении к щелочным растворам пигментов незначительных количеств трехвалентного хлорида железа выпадает коричневый хлопьевидный осадок, который растворяется в избытке реактива.

4. Меланины обладают способностью восстанавливать аммиачный раствор серебра

до металлического серебра.

5. Пигментов частично обесцвечиваются при применении 30%-ной H_2O_2 (пигменты растительного происхождения).

4.3. ИССЛЕДОВАНИЕ МЕЛАНИНОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Меланины можно обнаружить и с помощью тонкослойной хроматографии. Для идентификации меланинов используют их 5% растворы в 0,5 н NaOH.

Исследуемый раствор наносят на пластинку «Silufol» небольшими капельками, пользуясь микропипеткой. Пробу наносят осторожно, не нарушая сорбент.

Пластинку помещают в герметически закрывающуюся камеру, куда предварительно (за 2 часа) заливают систему. Система для разделения: бутанол – уксусная кислота – вода (12:3:5).

Нижний край пластинки должен быть погружен в жидкость на 5 мм. Пластинка должна находиться в камере в течение 50-60 минут. За это время растворитель поднимется на высоту 80-100 мм. Затем пластинку пинцетом вынимают из камеры, высушивают от растворителя на воздухе и отмечают линию финиша.

Для проявления пятен используют раствор 0,1% раствор нингидрина в ацетоне, как и для идентификации аминокислот. Пятна меланина дают слабо-красную окраску.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

Наименование сложного белка	Простетическая группа	Химическая структура простетической группы	Реакции, характерные для простетической группы	Что наблюдается ?	Чем обусловлена реакция ?

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Понятие о сложных белках, их роль. Классификация протеидов.
2. Какие белки относятся к липопротеидам, где встречаются, их функции?
3. Какие белки относятся к фосфопротеидам и какова их роль в организме?
4. Какое строение имеет гем в гемоглобине и миоглобине. Функции гемоглобина и миоглобина.
5. Что представляют собой гликопротеиды и какова их роль в организме?
6. Металлопротеиды, их роль в организме.
7. Хромопротеиды и их роль в организме.
8. Какие биологические пигменты находятся в крови человека и животных?
9. Какова химическая природа хлорофилла? Какова биологическая роль хлорофилла? Какую роль играет ион магния в молекуле хлорофилла?
10. Какую роль играет ион железа в молекуле гема?
11. Что такое меланины, какие функции они выполняют?

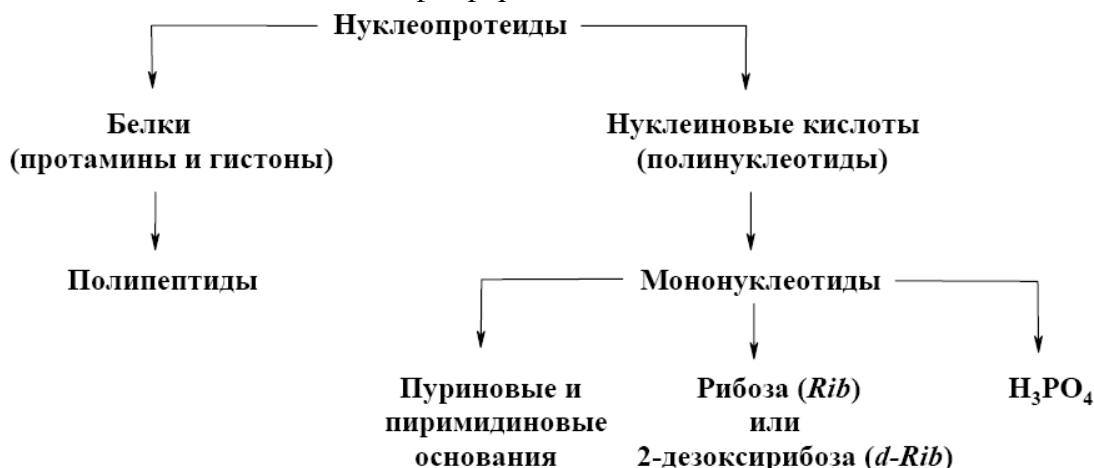
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить знания о строении и биологической роли нуклеиновых кислот.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Дезоксирибонуклеопротеиды являются главной составной частью клеточных ядер. Лучше всего получать нуклеопротеиды из тканей, богатых клеточными ядрами (лейкоциты, спермии, лимфатические узлы, селезенка, печень и др.). Специфическими реакциями последовательно открывают: во-первых, белковую часть - полипептиды и, во-вторых, простетическую группу - нуклеиновые кислоты, состоящие из пуриновых и

пиримидиновых оснований, пентоз и фосфорной кислоты.



6.1. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

Дрожжи богаты нуклеопротеидами рибозного типа. Нуклеопротеид можно извлечь из разрушенных клеток дрожжей при щелочной реакции раствора и осадить подкислением.

Ход работы

1 г дрожжей помещают в ступку, добавляют 2-3 капли эфира и 2-3 капли воды. Вносят щепотку песка и тщательно растирают. К гомогенату приливают 6 мл 0,4% едкого натрия и продолжают растирать в течение 15 мин. Содержимое ступки переносят в центрифужный стакан, центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин. Центрифугат сливают в стакан и постоянно помешивая приливают 2 мл 10% раствор уксусной кислоты до осаждения нуклеопротеида. Осадок нуклеопротеида собирают путем повторного центрифугирования и используют для качественной реакции.

6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ

К составным частям нуклеопротеидов относят полипептиды, углеводный компонент, гетероциклические основания и фосфорную кислоту.

Ход работы

6.2.1. ПОЛИПЕПТИДЫ ОТКРЫВАЮТ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИЕЙ

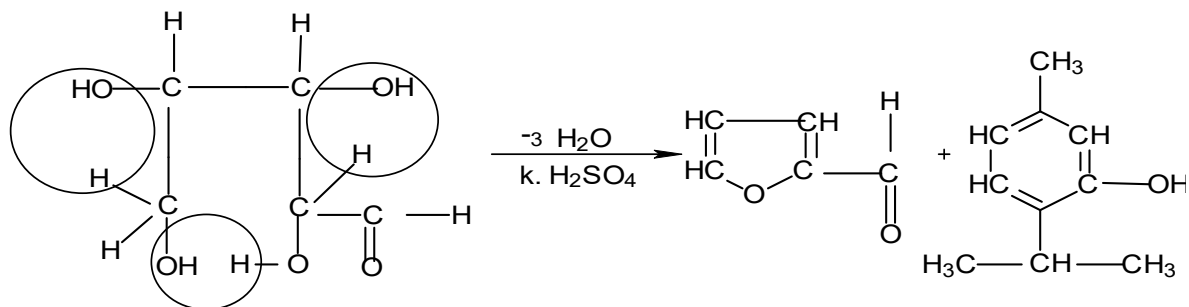
К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 10 капель гидроксид натрия и 2 капли раствора сульфата меди. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

6.2.2. УГЛЕВОДЫ (РИБОЗУ И ДЕЗОКСИРИБОЗУ) ОПРЕДЕЛЯЮТ ФЕЛИНГОВОЙ ПРОБОЙ

К 5 каплям гидролизата добавляют по 5 капель Фелинга I и Фелинга II, тщательно перемешивают и нагревают пробирку до кипения. Отмечают образование осадка и его цвет.

6.2.3. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ МОЛИША НА ПЕНТОЗУ

При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз – оксиметилфурфурол, которые дают с тимолом продукт конденсации красного цвета:



К 10 каплям гидролизата дрожжей прибавляют 3 капли раствора тимола и по стенке

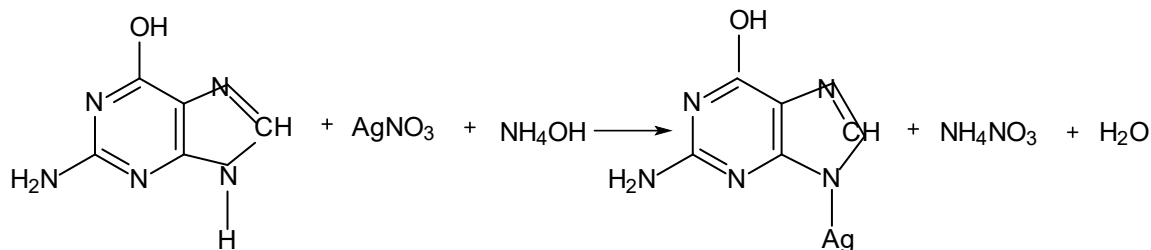
пробирки (осторожно!) - 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки появляется красное окрашивание.

6.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель молибденового реактива, кипятят на пламени горелки. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. Пробирку охлаждают под струей воды и наблюдают выпадение осадка фосфорномолибденовокислого аммония.

6.2.5. ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ ОСНОВАНИЯ ОБНАРУЖИВАЮТ ПО ИХ РЕАКЦИИ С АММИАЧНЫМ РАСТВОРОМ ОКСИДА СЕРЕБРА

К 2 мл гидролизата приливают по каплям концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции по лакмусу и добавляют равный объем аммиачного раствора оксида серебра. Выпадает осадок.



6.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ

Для выделения растительного ДНК можно взять зелёный горошек или лук.

Ход работы

Положите в гомогенизатор около 100 мл этого продукта, добавьте 1/8 чайной ложки соли и 200 мл холодной воды. Гомогенизировать в течение 15 секунд. Профильтровать смесь через кусок капрона. В полученную мякоть добавьте 1/6 от её количества жидкого моющего средства и хорошо размешайте. Оставьте на 5-10 минут. Разлейте жидкость по пробиркам, чтобы в каждой было заполнено не больше трети объёма.

Добавьте в каждую пробирку несколько капель сока, выжатого из ананаса, либо раствора для контактных линз и осторожно встряхните, переворачивая и наклоняя пробирку (во избежание разлома ДНК).

Наклоните пробирку и медленно влейте в неё немного этилового спирта, чтобы он образовал слой поверх гороховой смеси. Лейте, пока спирта и смеси не окажется поровну. ДНК всплывёт вверх в виде хлопьев.

Деревянной палочкой выловите их и рассмотрите под микроскопом.

6.4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Метод определения суммарного количества нуклеиновых кислот основан на определении разностей оптической плотности (метод Δ), применяемый для уменьшения влияния различных примесей в исследуемых экстрактах.

При использовании этого метода в основу расчетов берут не абсолютные величины оптических плотностей, а разность между оптической плотностью при 270 нм и оптической плотностью при 290 нм ($D_{270} - D_{290} = \Delta D_{270}$). Предварительно на гидролизатах стандартных препаратов дрожжевой РНК и тимусовой ДНК было найдено, что ΔD_{270} равна 0,19.

Метод состоит из следующих операций: экстракция нуклеиновых кислот хлорной кислотой, центрифугирование экстракта, измерение на спектрофотометре в ультрафиолете.

Ход работы

Навеску ткани (5–500 мг) заливают точно отмеренным количеством (5–10 мл) 0,5 н. хлорной кислоты (HClO_4) и нагревают в кипящей водяной бане 20 мин. После охлаждения и центрифугирования надосадочную жидкость используют для измерения поглощения в ультрафиолете на спектрофотометре СФ-4 непосредственно (в случае малых количеств определяемого вещества) или после соответствующего разведения в 0,5 н. хлорной

кислоты.

Измерение на спектрофотометре производят при 270 мкм и 290 мкм в отношении контрольного раствора (чистая 0,5 н. хлорная кислота). Если измерение производили в односантиметровых кварцевых кюветах, то расчет производят следующим образом: разность между оптической плотностью при 270 мкм и оптической плотностью при 290 мкм делят на 0,19 и получают количество микрограммов нуклеинового фосфора в 1 мл испытуемого раствора.

Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество нуклеиновой кислоты пользуются средним пересчетным коэффициентом 10,3.

Метод дает возможность определять содержание нуклеиновой кислоты также в том случае, когда в изучаемом материале содержится только РНК или только ДНК.

Для пересчета с содержания фосфора на содержание РНК пользуются коэффициентом 10,5, а на содержание ДНК – 10,1, исходя из теоретического содержания фосфора – 9,5 в РНК и 9,9 в ДНК.

Рекомендуется производить дополнительное контрольное измерение при 260 мкм. Оптическая плотность при 260 мкм должна быть приблизительно равна оптической плотности при 270 мкм (в пределах $\pm 15\%$). Отклонение от последней больше чем на $\pm 15\%$ указывает на наличие большого количества мешающих примесей нуклеиновой природы. В этом случае иногда помогает предварительная отмывка навески материала на холоду 0,2 н. раствора хлорной кислоты.

6.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КРОВИ ПО П. В. СИМАКОВУ)

Из сложных белков особое значение имеют нуклеопротеиды, играющие ведущую роль в передаче наследственных признаков, в синтезе белка, во многих процессах обмена. Нуклеопротеиды состоят из белка и сложных полинуклеотидов, или нуклеиновых кислот, которые в своем составе содержат азотистые основания, углеводы (моносахариды) и фосфорную кислоту. Различают рибонуклеиновые (РНК) и дезоксирибонуклеиновые (ДНК) кислоты в зависимости от того, какой моносахарид – рибоза или дезоксирибоза – входит в их состав. Так как все три компонента (азотистое основание, углевод и фосфорная кислота) входят в состав нуклеиновых кислот всегда в постоянных молярных концентрациях (в отношении 1:1:1), определение нуклеиновых кислот обычно проводят, исследуя содержание какого-либо одного из указанных компонентов.

Принцип метода основан на экстракции нуклеиновых кислот (суммарного количества РНК и ДНК) горячей хлорной кислотой с последующим определением нуклеинового фосфора в растворе фотометрированием при 270 и 290 мкм; по концентрации нуклеинового фосфора вычисляют содержание нуклеиновых кислот. Точность метода $\pm 10\%$.

Ход работы

Определение нуклеиновых кислот в крови. В 1,4 мл воды, налитой в широкие центрифужные пробирки, помещают 0,1 мл крови и размешивают. К полученному гемолизату прибавляют 13,5 мл 0,6 н. раствора хлорной кислоты и перемешивают. Пробирку помещают на 20 мин. в сильно кипящую водяную баню и закрывают маленькой воронкой. За это время происходит полный гидролиз нуклеиновых кислот, связанных с белками, и осаждение белков. Затем пробирку охлаждают струей воды из крана и центрифугируют 10–15 мин. при 1500 об/мин. Жидкость сливают в чистую пробирку и фотометрируют при 270 и 290 мкм в кювете с рабочей длиной 10 мм против 0,6 н. раствора хлорной кислоты.

Определение нуклеиновых кислот в тканях. Навеску материала от 5 до 500 мг заливают точно отмеренным количеством (5–10 мл) 0,5 н. раствора хлорной кислоты и нагревают на кипящей водяной бане 20 мин. Дальнейший Порядок выполнения работы и расчет те же, что и при определении нуклеиновых кислот в крови (А. С. Спирин).

Расчет содержания нуклеиновых кислот в крови производят по формуле:

$$x = \frac{(A - B) \times \Gamma \times 10,3 \times 100}{0,19 \times B} = \text{мг} \%$$

где А–В – разность между оптическими плотностями исследуемого раствора при 270 и 290 мкм,

0,19 – поправка при измерении оптической плотности исследуемого раствора при 270 и 290 мкм;

Г – объем раствора крови с хлорной кислотой;

В – объем крови, взятой для исследования;

10,3 – коэффициент пересчета на количество нуклеиновых кислот;

100 – коэффициент пересчета в процентах.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое нуклеопротейды, из каких компонентов они состоят?
2. АТФ, УДФ, ТМФ, ГТФ, ЦДФ строение и функции.
3. ДНК, биологическая роль, локализация в клетке. Биологическое значение двуспирального строения ДНК. Принцип комплиментарности ДНК и РНК и его биологическая роль.
4. Пуриновые и пиримидиновые основания.
5. РНК, ее виды, биологическая роль, локализация в клетке.
6. Углеводные компоненты нуклеиновых кислот.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

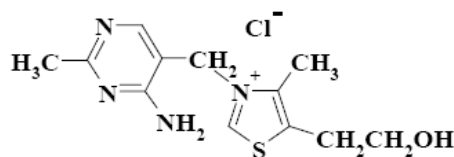
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить знания о строении и биологической роли водорастворимых витаминов. Научиться определять присутствие витаминов в биологических материалах при помощи качественных цветных реакций.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Витамины - незаменимые для жизни органические вещества разнообразной структуры, являющиеся биологическими катализаторами химических реакций или реагентами фотохимических процессов, протекающих в клетке и участвующие в обмене веществ, как правило, в соединении с белками в составе ферментных систем.

7.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИАМИНА (ВИТАМИН В₁)

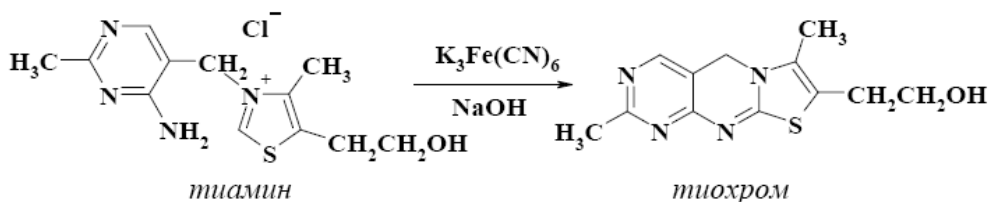
Тиамин (витамин В₁) - водорастворимый витамин. Наряду с аминогруппой витамин В₁ содержит атом серы, и поэтому он получил название тиамин. В химической структуре его содержится два кольца: пиримидиновое и тиазоловое, соединенные метиленовой (-CH₂) группой.



При недостаточности тиамина развивается тяжелое заболевание - бери-бери. Это заболевание представляет собой комбинированный авитаминоз, при котором организм испытывает потребность и в других витаминах - рибофлавине, пиридоксине, витаминах РР, С и др. Тиамин содержится в пшеничном хлебе, сое, горохе, а также в продуктах животного происхождения - печени, почках, мозге. Суточная потребность от 1,3 до 1,9 мг.

7.1.1. РЕАКЦИЯ ОКИСЛЕНИЯ

Под действием железосинеродистого калия тиамин окисляется с образованием желтого пигмента тioxрома. Реакция протекает следующим образом:



Ход работы

К 1-2 мг порошка тиамин добавляют 1-2 капли 5% раствора железосинеродистого калия, 10 капель едкого натра (10% раствор) и перемешивают. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет, вследствие превращения тиамин в тиохром. При освещении ультрафиолетовыми лучами тиохрома видна голубая флуоресценция.

7.1.2. ДИАЗОРЕАКЦИЯ

В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

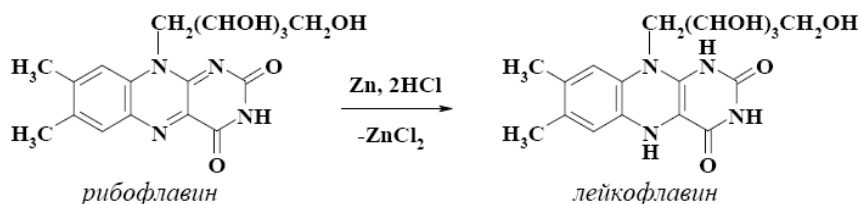
Ход работы

Диазореактив готовят, сливая в пробирку по 5 капель 1 %-го раствора сульфаниловой кислоты и 5 %-го раствора нитрита натрия. В эту же пробирку добавляют на кончике скальпеля порошок тиамин и затем по стенке наклоненной пробирки осторожно приливают 5–7 капель 10 %-го раствора карбоната натрия. На границе жидкостей появляется кольцо оранжево-красного цвета.

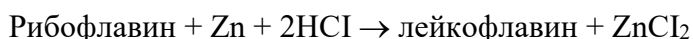
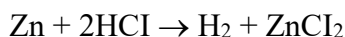
7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОФЛАВИНА (ВИТАМИН В₂)

Рибофлавин (витамин В₂) - водорастворимый витамин. В основе его строения лежит система изоаллоксазина, в боковой цепи - пятиатомный спирт рибитол. Биологическая активность рибофлавина определяется его окислительно-восстановительными свойствами. Рибофлавин, присоединяя два атома водорода, обратимо восстанавливается, переходя в бесцветное соединение - лейкофлавин. Из пищевых продуктов рибофлавином богаты: хлеб из муки грубого помола, семена злаков, яйца, молоко, мясо, свежие фрукты, овощи. Суточная потребность 2-4 мг.

При добавлении к раствору рибофлавина концентрированной соляной кислоты и металлического цинка происходит бурное выделение водорода, и в конце реакции желтая окраска жидкости меняется. Реакция обусловлена восстановлением рибофлавина сначала в лейкофлавин.



По мере насыщения раствора водородом окислительно-восстановительный потенциал смеси постепенно снижается и происходит восстановление рибофлавина и метиленового синего. Восстановление всего объема метиленового синего происходит раньше, чем восстановление значительной части внесенного в пробирку рибофлавина, поэтому цвет жидкости переходит последовательно в зеленый, желто-зеленый, желтый, бледно-желтый или розовый и, наконец, жидкость обесцвечивается за счет восстановления рибофлавина в лейкосоединение.



Розовую жидкость сливают в другую пробирку и наблюдают за изменением окраски. Водород в жидкость больше не поступает, а уже растворенный в ней уходит в воздух и переносится через рибофлавин и метиленовый синий на кислород воздуха.

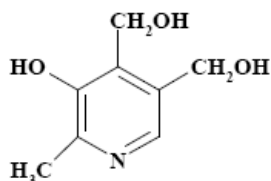
Ход работы

В пробирку вносят 4-6 капель воды, 1 каплю взвеси рибофлавина и по каплям

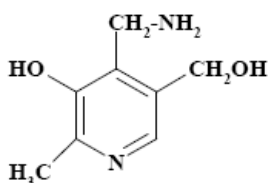
метиленовой сини - до синего или зеленоватого окрашивания раствора. Внести в пробирку кусочек цинка и 2-3 капли концентрированной соляной кислоты (начинается выделение пузырьков водорода). Отметить окраску через 10-15 минут.

7.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРИДОКСИНА (ВИТАМИН В₆)

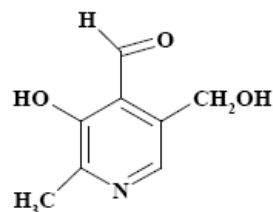
Пиридоксин - витамин В₆. Пиридоксаль (витамин В₆) - альдегидное производное пиридоксина. В виде фосфорного эфира - пиридоксальфосфата - входит в состав ряда ферментов, катализирующих реакции переаминирования и декарбоксилирования α-аминокислот. Термин "витамин В₆" применяется ко всем трем производным 3-оксипиридоксина, которые обладают витаминной активностью: пиридоксину, пиридоксалу и пиридоксамину.



(пиридоксин)



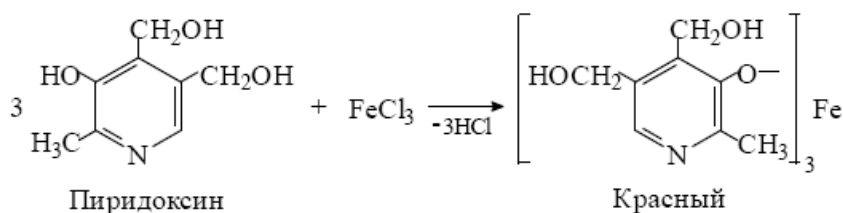
(пиридоксамин)



(пиридоксаль)

Витамин В₆ широко распространен в продуктах растительного и животного происхождения. Источником этого витамина для человека могут быть: горох, фасоль, хлеб, картофель и мясо.

При добавлении к раствору витамин В₆ раствора хлорного железа жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа.



Ход работы

К 5 каплям раствора витамин В₆ прибавляют 1 каплю 5% раствора хлорного железа. Встряхивают, жидкость приобретает красную окраску.

7.4. РЕАКЦИЯ НА ЦИАНОКОБАЛАМИН (ВИТАМИН В₁₂)

При действии сильного окислителя на витамин В₁₂ происходит его разрушение. Витамин В₁₂ — это единственный витамин, в молекуле которого содержится кобальт (4,5%). Его можно обнаружить после минерализации раствора витамина и последующей обработки тиомочевинной.

Витамин В₁₂ находится главным образом в продуктах животного происхождения. Наиболее богата им печень рогатого скота и цыплят.

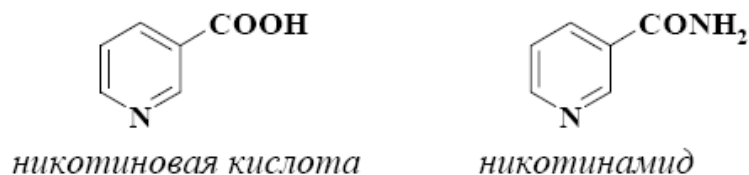
Ход работы

Половину содержимого витамина В₁₂ из ампулы переносят в фарфоровый тигель, выпаривают досуха и прокалывают на небольшом огне. После охлаждения доливают 1 мл концентрированной азотной кислоты и 3 мл концентрированной соляной кислоты и кипятят в вытяжном шкафу до полного испарения жидкости и охлаждают. Растворяют осадок в капле воды, прибавляют 1 каплю ацетонового раствора α-нитрозо-β-нафтола и каплями раствор гидрофосфата натрия до слабощелочной реакции (по лакмусу). При наличии ионов кобальта появляется буро-красное окрашивание, если ионов кобальта нет, окрашивание - желто-зеленое.

7.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИН РР)

Никотиновая кислота (витамин РР) - в виде амида никотиновая кислота входит в

состав коферментов дегидрогеназ - НАД и НАДФ. Содержится в продуктах растительного и животного происхождения (молоко, мясо, рыба, дрожжи). Никотиновая кислота может синтезироваться из триптофанов. Суточная потребность человека в никотиновой кислоте - 15-20 мг.



При нагревании никотиновой кислоты с раствором уксуснокислой меди образуется синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

7.5.1. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ С УКСУСНОКИСЛОЙ МЕДЬЮ

Реакция основана на том, что никотиновая кислота, имея в своей молекуле карбоксильную группу, образует соли. Медная соль никотиновой кислоты является труднорастворимым веществом голубого или синего цвета. Свинцовая соль имеет белый цвет.

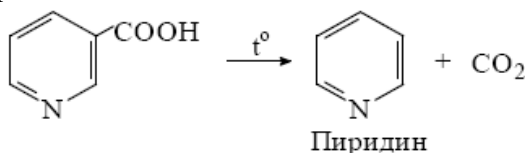
Ход работы

5—10 мг никотиновой кислоты растворяют при нагревании в 10—20 каплях 10% раствора уксусной кислоты.

К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем раствора уксуснокислой меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает осадок синего цвета медной соли никотиновой кислоты.

7.5.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ПИРИДИНОВОГО КОЛЬЦА В МОЛЕКУЛЕ ВИТАМИНА РР

Никотиновая кислота является производным пиридина. Реакция основана на разрушении никотиновой кислоты при нагревании ее с содой с образованием свободного пиридина, имеющего своеобразный запах.



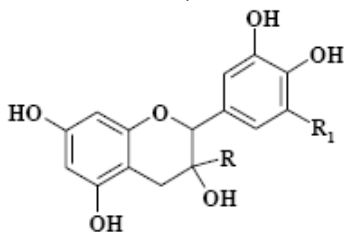
Ход работы

В пробирку помещают немного соды в порошок (на кончике стеклянной лопаточки) и добавляют равное количество никотиновой кислоты.

Нагревают смесь в пламени горелки в вытяжном шкафу при включенной тяге. Устанавливают выделение пиридина по появлению характерного запаха.

7.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА (ВИТАМИН Р)

Известно несколько соединений, обладающих Р-витаминной активностью.



R и R₁ – H или OH

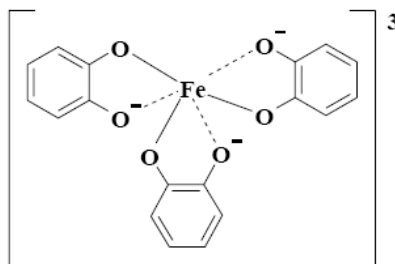
Витамин Р (цитрин)

В основе их лежит скелет флавонола. Рутин - кристаллическое вещество желто-оранжевой окраски. Содержится во всех продуктах, в которых обнаруживается витамин С. Много его в чае, фруктах, ягодах (бруснике, клюкве, сливе, винограде). Рутин участвует в

окислительно-восстановительных процессах. Его присутствие усиливает окислительно-восстановительный эффект витамина С.

7.6.1. РЕАКЦИЯ С ХЛОРИДОМ ЖЕЛЕЗА

Хлорид железа образует с рутином комплексное соединение, окрашенное в изумрудно-зеленый цвет.



Ход работы

1) К 12 мл насыщенного водного раствора рутина прибавляют несколько капель 1% раствора хлорида железа. Возникает зеленое окрашивание.

2) Налейте в пробирку 1 мл чайной заварки (в ней содержится витамин Р) и добавьте к ней 5 капель водного раствора хлорного железа FeCl₃. Осторожно встряхните пробирку и разбавьте полученный раствор, добавив 2мл дистиллированной воды. Как изменяется окраска раствора?

7.6.2. РЕАКЦИЯ С СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

Концентрированная серная кислота образует с флавонами и флавоноидами оксониевые соли, растворы которых имеют ярко-желтую окраску.

Ход работы

К 1-2 мл насыщенного водного раствора рутина осторожно по стенке пробирки добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей возникает окрашенное в желтый цвет кольцо.

7.6.3. РЕАКЦИЯ С РЕАКТИВом ФЕЛИНГА

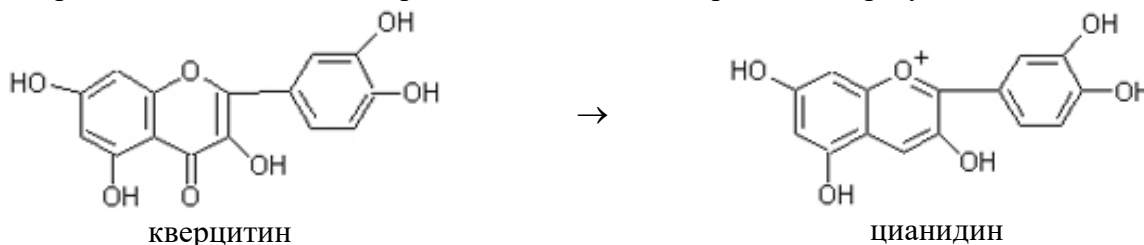
При кислотном гидролизе рутина отщепляется молекула рутинозы, которая распадается на глюкозу и рамнозу, обладающих восстанавливающими свойствами.

Ход работы

К 0,5 г рутина добавляют 5 мл 0,5 % раствора соляной кислоты. Смесь доводят до кипения, кипятят в течение 1 мин, затем отфильтровывают. К полученному фильтрату приливают 3 мл 10 % раствора едкого натра и 3 мл Фелинговой жидкости, нагревают до кипения. Выпадает красный осадок оксида меди.

7.6.4. РЕАКЦИЯ С МАГНИЕМ И СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

Флавоноиды реагируют с магнием и соляной кислотой, легко восстанавливаются, давая окрашенные соединения. При восстановлении кверцетина образуется цианидин.



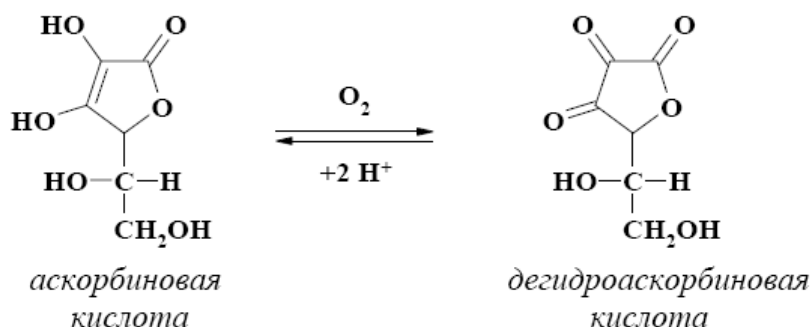
К 1 мл насыщенного спиртового раствора кверцетина на кончике скальпеля добавляют порошок металлического магния и 3-4 капли концентрированной соляной кислоты. Жидкость сначала окрашивается в розовый цвет, при стоянии интенсивность окраски усиливается.

7.7. КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Витамин С – водорастворимое соединение, содержащее шесть атомов углерода. Представляет собой лактон.

При недостатке витамина С в пище у человека развивается цинга. При цинге

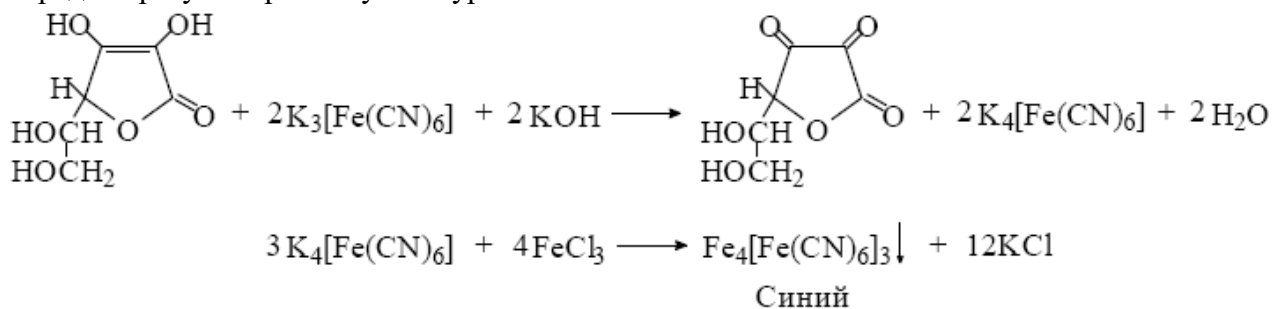
повышается хрупкость сосудов, возникают кровоизлияния, повреждаются кости особенно зубы. Суточная потребность в аскорбиновой кислоте взрослого человека при средних затратах физического труда — 50 мг. Богаты витамином С лимоны, черная смородина, шиповник, хвоя, из животных продуктов — печень.



В основе качественных реакций и количественных методов определения аскорбиновой кислоты лежит окислительно-восстановительный процесс: аскорбиновая кислота окисляется дегидроаскорбиновую, а другое вещество восстанавливается.

7.7.1. РЕАКЦИЯ С ЖЕЛЕЗОСИНЕРОДИСТЫМ КАЛИЕМ

Реакция основана на том, что аскорбиновая кислота, окисляясь в дегидроаскорбиновую в щелочной среде, может восстанавливать железосинеродистый калий до железистосинеродистого, последний в взаимодействию с хлорным железом в кислой среде образует берлинскую лазурь.



Ход работы

В пробирку отмеривают 10 капель вытяжки из шиповника, добавляют 2 капли 10% раствора гидроксида натрия, 2 капли 5% раствора железосинеродистого калия и перемешивают.

К содержимому пробирки добавляют 6 капель 10% раствора соляной кислоты и 2 капли 1% раствора хлорного железа. Выпадает синий осадок берлинской лазури, свидетельствующий о присутствии аскорбиновой кислоты в вытяжке из шиповника.

Для контроля проделывают ту же реакцию, беря вместо вытяжки из шиповника дистиллированную воду. Появляется бурое окрашивание жидкости, обусловленное образованием железосинеродистой соли окиси железа.

7.7.2. РЕАКЦИЯ С МЕТИЛЕНОВОЙ СИНЬЮ

Реакция обусловлена окислением аскорбиновой кислоты и восстановлением метиленовой сини в бесцветную лейкоформу.

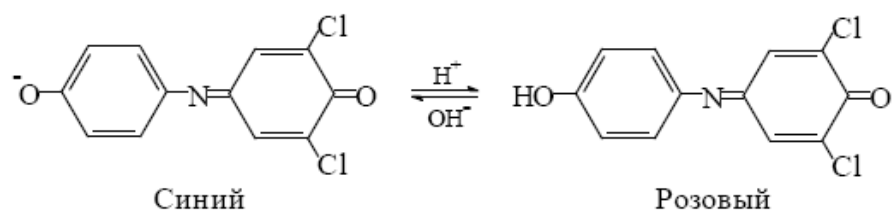
Ход работы

В пробирку наливают 2 капли 10% раствора метиленовой сини, 2 капли 10% раствора соды, 10 капель вытяжки из шиповника и нагревают. Жидкость обесцвечивается.

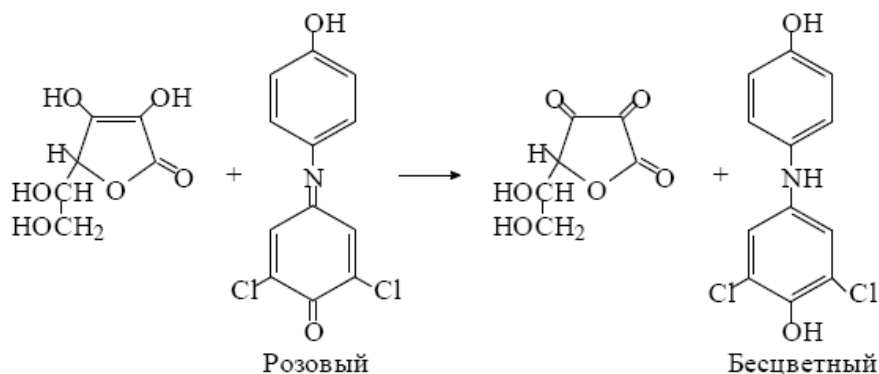
Для контроля проделывают ту же реакцию, беря вместо вытяжки из шиповника дистиллированную воду. Обесцвечивания жидкости не происходит.

7.7.3. РЕАКЦИЯ С 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛОМ

Титрование аскорбиновой кислоты 6-дихлорфенолиндофенолом (метод Тильманса) осуществляют в кислой среде, в которой 2,6-дихлорфенолиндофенол имеет розовую окраску, а в щелочной среде — синюю:



За счет окисления аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую происходит восстановление индикатора 2,6-дихлорфенолиндофенола в бесцветное лейкосоединение.

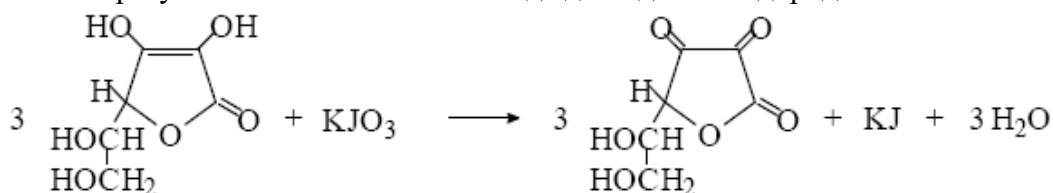


Ход работы

В две пробирки наливают по 10 капель 0,02% раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. В одну из пробирок добавляют 10 капель вытяжки из шиповника, в другую 10 капель воды. Жидкость в пробирке с вытяжкой шиповника, обесцвечивается.

7.7.4. РЕАКЦИЯ С РАСТВОРОМ ЛЮГОЛЯ

При взаимодействии аскорбиновой кислоты с раствором Люголя происходит обесцвечивание в результате восстановления йода до йодисто-водородной кислоты.

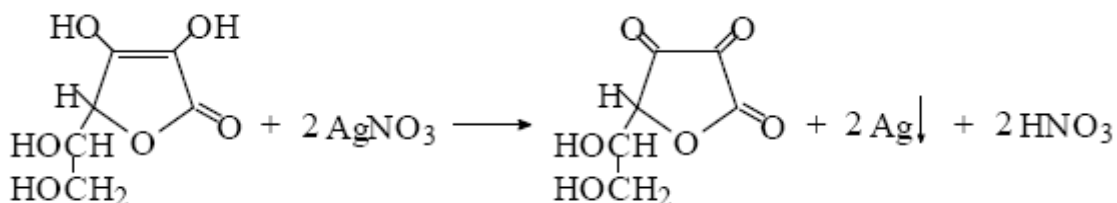


Ход работы

В 2 пробирки внести по 5 капель дистиллированной воды и по 2 капли раствора Люголя. В 1-ю пробирку добавить 10 капель сока картофеля, во 2-ю 10 капель раствора аскорбиновой кислоты. Что наблюдается?

7.7.5. СЕРЕБРЯНАЯ ПРОБА НА ВИТАМИН С

При добавлении витамина С к нитрату серебра выпадает в осадок в виде металлического серебра:



Ход работы

В две пробирки (опыт и контроль) вносят по 5 капель 1%-го раствора аскорбиновой кислоты; затем в опытную пробирку добавляют 1-2 капли 1%-го раствора азотно-кислого серебра, а в контрольную – 1-2 капли дистиллированной воды. В опытной пробе наблюдается появление темного осадка металлического серебра.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

№ п/п	Материал, содержащий витамин	Название витамина	Употребляемые реактивы и материалы	Наблюдаемые окраски жидкости, осадка, появление запаха, обесцвечивание жидкости	На чём основана реакция

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Витамины. История их открытия. Витамеры.
2. Номенклатура и классификация витаминов.
3. Витамин В₁. Химическая природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
4. Витамин В₂. Строение и участие его в окислительно-восстановительных реакциях. Содержание в продуктах, суточная потребность.
5. Витамин В₆. Формы и значения. Содержание в продуктах, суточная потребность.
6. Витамин В₁₂. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
7. Витамин С. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
8. м Р. Взаимообусловленность действия вит. С и Р. Содержание в продуктах, суточная потребность.
9. Витамин Н. Его строение и роль. Содержание в продуктах, суточная потребность.
10. Витамин РР. Содержание в продуктах, суточная потребность.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8.

ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

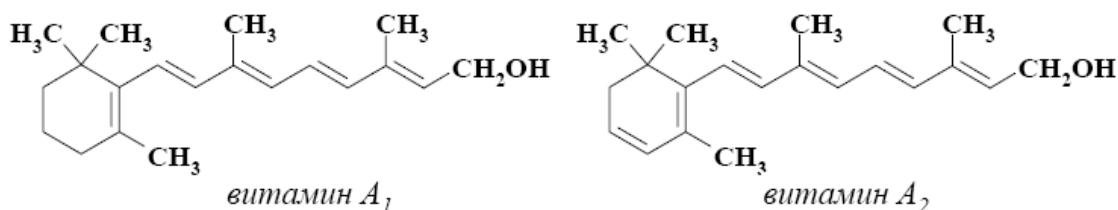
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить знания о строении и биологической роли жирорастворимых витаминов. Научиться определять присутствие витаминов в биологических материалах при помощи качественных реакций.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Жирорастворимые витамины участвуют в ряде окислительно-восстановительных реакций, регуляции проницаемости мембран и многих биохимических процессов. Отсутствие или недостаток в пище витаминов приводят к нарушениям обмена веществ и, в конечном счете, заболеваниям, получившим название гиповитаминозов и авитаминозов.

8.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕТИНОЛА (ВИТАМИН А)

Ретинол (витамин А) - жирорастворимый витамин, молекула которого состоит из β-ионового ядра и боковой изопреноидной цепи:



Ретинол обладает высокой специфичностью строения. Изменения в боковой цепи приводят к снижению или полной потере витаминной активности у полученных производных. Действие света, нагревание раствора, плавление кристаллов ретинола, контакт с поверхностно-активными веществами приводит к цис-транс-изомерным переходам. Витамин обладает противомикробным действием, участвует в процессе восприятия света. Наибольшее содержание каротиноидов в моркови, перце, томате. Суточная потребность в витамине А для взрослого человека составляет 1—2,5 мг витамина А.

Ход работы

8.1.1. РЕАКЦИЯ С ТРЕХХЛОРИСТОЙ СУРЬМОЙ

В сухую пробирку вносят две капли масляного раствора витамина А (свежего рыбьего жира) и добавляют 2-3 капли 33% хлороформного раствора треххлористой сурьмы; при смешивании содержимое пробирки окрашивается в синий цвет.

8.1.2. РЕАКЦИЯ ДРУММОНДА С КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

В сухую пробирку по стенке опускают 3 капли масляного раствора витамина А или рыбьего жира. Вслед за этим сюда же осторожно опускают каплю серной кислоты. В месте соприкосновения витамина А с серной кислотой появляется фиолетовое окрашивание, переходящее в вишнево-красное.

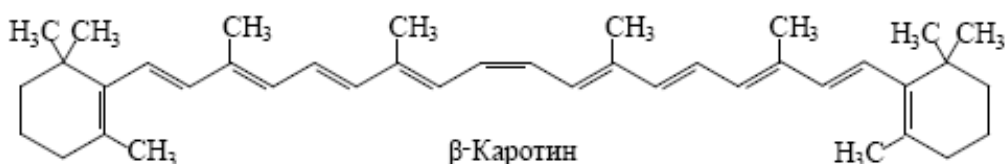
8.1.3. РЕАКЦИЯ С СУЛЬФАТОМ ЖЕЛЕЗА (II)

В пробирку к 2-3 каплям масляного раствора витамина А или рыбьего жира приливают 5-10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II), 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в красно-розовое. Каротины дают при этой реакции зеленое окрашивание.

8.2. ОБНАРУЖЕНИЕ КАРОТИНА В ШИПОВНИКЕ

Каротин открывается по появлению окраски при взаимодействии с треххлористой сурьмой или концентрированной серной кислотой.

Наличие в его молекуле ненасыщенных связей можно обнаружить по обесцвечиванию бромной воды, т. е. по способности каротина как соединения, имеющего двойные связи, присоединять бром по месту их разрыва:



Ход работы

1. Одну-две сухие ягоды шиповника растирают в ступке, затем добавляют 2—3 мл хлороформа и растирание продолжают еще 1 минуту.

2. Содержимое ступки фильтруют через заранее приготовленный фильтр в сухую пробирку. Фильтрат окрашен каротинами в оранжевый цвет.

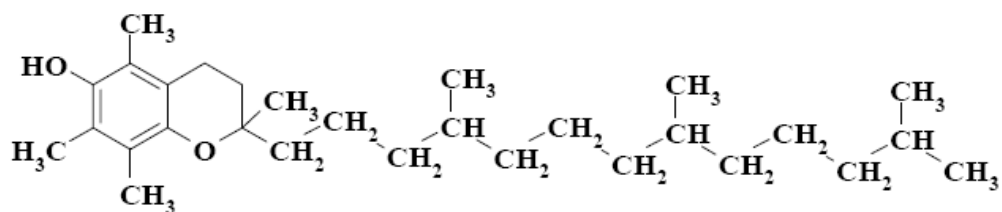
3. В сухой пробирке к нескольким каплям хлороформной вытяжки, содержащей каротин, добавляют около 20 капель раствора хлористой сурьмы в хлороформе. Появляется голубая окраска, которая даже при длительном стоянии не переходит в розово-фиолетовую.

4. В сухую пробирку вносят несколько капель хлороформной вытяжки и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется синяя окраска, переходящая в зеленую.

5. К нескольким каплям хлороформной вытяжки добавляют 1—2 капли бромной воды и встряхивают. Бромная вода обесцвечивается. В ходе реакции происходит не только обесцвечивание брома, но и обесцвечивание самого каротина. Избыток бромной воды добавлять не следует, так как он вызывает окрашивание хлороформного слоя.

8.3. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА α-ТОКОФЕРОЛ

Под общим названием витамина Е известен ряд веществ, дающих витаминными свойствами и являющихся производными хромана. Самым активным из них является α-токоферол.



α-токоферол

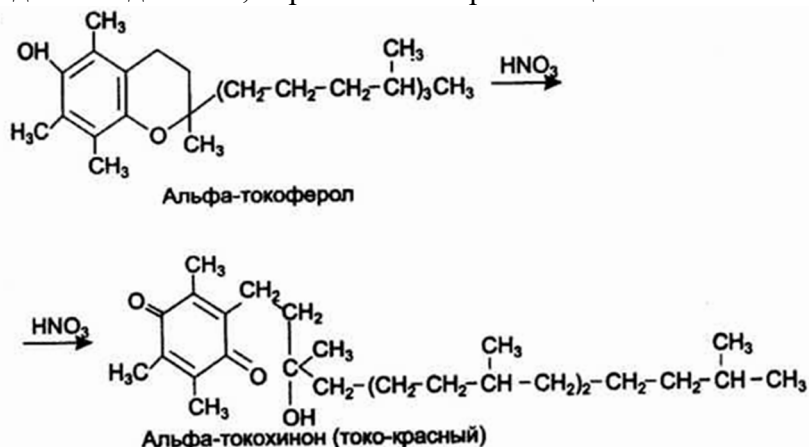
Наиболее богаты витамином Е масла из зародышей пшеницы, семян яблок, шиповника, из облепихи, кукурузы, сои. Он содержится в семенах злаков, в мясе, жире, печени, в яичном желтке, масле, молоке. Для усвоения организмом витамина Е необходимо наличие желчи в кишечном содержимом.

Витамин Е обладает противooksидлительным действием: он тормозит окисление ненасыщенных жирных кислот и тем самым предохраняет от разрушения ненасыщенные липиды, входящие в состав таких важных клеточных структур, как митохондрии.

Взаимодействие α-токоферола с концентрированной азотной кислотой приводит к окрашиванию реакционной смеси в красный цвет. Это обусловлено тем, что продукт окисления α-токоферол имеет хиноидную структуру. При взаимодействии с хлорным железом (III) α-токоферол окисляется до α-токоферилхинона - соединения, окрашенного в красный цвет.

8.3.1. РЕАКЦИЯ С АЗОТНОЙ КИСЛОТОЙ

Спиртовой раствор витамина Е в присутствии концентрированной азотной кислоты окисляется в хиноидное соединение, окрашенное в красный цвет.



Ход работы

В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора витамина Е и добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты. Пробирку интенсивно встряхивают и наблюдают постепенное появление красного окрашивания. Эмульсию оставляют стоять до расслоения. Окраска остается в верхнем масляном слое.

8.3.2. РЕАКЦИЯ С ХЛОРНЫМ ЖЕЛЕЗОМ

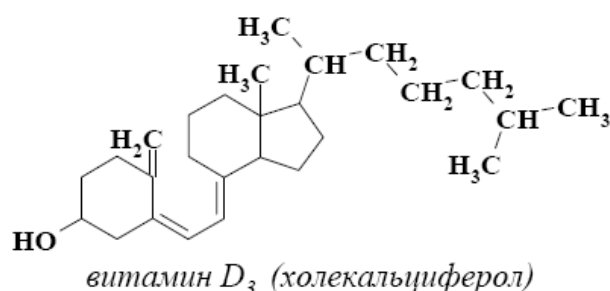
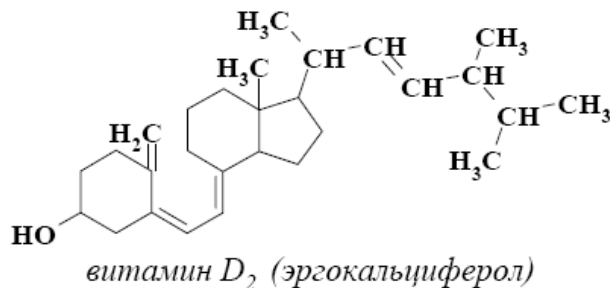
Ход работы

В сухую пробирку вносят 0,5 мл спиртового раствора α-токоферола, затем 0,5 мл 1% раствора хлорного железа (III) и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдают появление красного окрашивания.

8.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИФЕРОЛА (ВИТАМИН D)

Известно несколько витаминов группы D (кальциферолы). Они образуются из провитаминов путем воздействия ультрафиолетового света. Провитаминами являются стерин, у которых в кольце В имеются две двойные связи. Естественным витамином, находящимся в тканях животного и человека, а также в рыбьем жире, является витамин D₃ (холекальциферол), который образуется из 7-дегидрохолестерина в коже под влиянием ультрафиолетовых солнечных лучей.

Основные проявления недостаточности этого витамина касаются костной системы. Недостаток витамина D у детей приводит к возникновению рахита. Это приводит к деминерализации костей, их размягчению и искривлению. Суточная потребность маленьких детей в витамине D — 13-25 мкг, что составляет 500—1000 ме (1 ме = 0,025 мкг витамина D₂ или D₃). Богаты витамином D печеночный жир морских рыб, сливочное масло, желтки яиц.



Витамин D при взаимодействии с анилиновым реактивом при нагревании окрашивается в красный цвет, при взаимодействии с раствором брома в хлороформе в зеленовато-голубой.

8.4.1. РЕАКЦИЯ С АНИЛИНОМ

В сухую пробирку вносят 2 капли масляного раствора эргокальциферола, 10 капель хлороформа и 1-2 капли анилинового реактива, осторожно нагревают при постоянном помешивании. Отмечают результат реакции.

8.4.2. РЕАКЦИЯ С БРОМОМ

В сухую пробирку вносят 2-3 капли раствора эргокальциферола и 2-4 капли раствора брома в хлороформе. Отмечают полученный результат.

8.4.3. РЕАКЦИЯ С УКСУСНЫМ АНГИДРИДОМ И СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

Эргостерол по строению близок к холестерину, поэтому дает характерную для него реакцию с уксусным ангидридом и серной кислотой (синее или зеленое окрашивание).

Немного сухих дрожжей помещают в пробирку, затем добавляют 15 капель хлороформа, встряхивают. Полученный экстракт отфильтровывают. К нему добавляют по 5 капель уксусного ангидрида и серной кислоты. Отмечают результат реакции.

8.5. КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ ФИЛЛОХИНОНА

К группе витаминов К относятся два типа хинонов (витамины К₁ и К₂) с боковыми цепями, представленными изопреновыми звеньями, в основе циклической структуры которых лежит кольцо 1,4-нафтохинона. Витамин К₁ - это филлохинон-4, а витамин К₂ - менахинон-6.

Витамин К необходим для синтеза клетками печени ряда факторов свертывания крови. В остатки глутаминовых кислот белковых молекул этих факторов вводится еще одна карбоксильная группа. Образуются остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты, через которые происходит присоединение ионов кальция. Поэтому после введения в организм антагонистов витамина К время свертывания крови увеличивается.

При авитаминозе К появляются подкожные и внутримышечные кровоизлияния, содержание протромбина в крови понижается. Наиболее богаты витамином К капуста, шпинат, рябина, печень.

8.5.1. РЕАКЦИЯ С ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТОМ

Ход работы

В пробирку вносят 4 капли спиртового раствора витамина К, добавляют 8 капель 5% раствора диэтилдитиокарбамата натрия и 4 капли 4 % спиртового раствора гидроксида натрия.

Содержимое пробирки встряхивают. Постепенно появляется окраска.

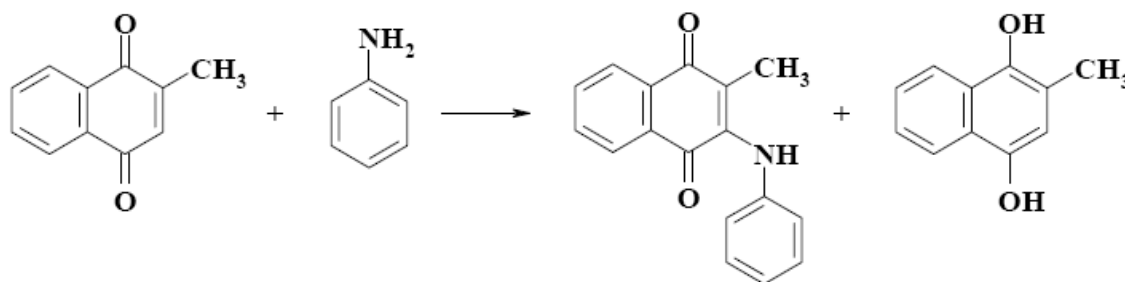
8.5.2. РЕАКЦИЯ СО ЩЕЛОЧНЫМ РАСТВОРОМ ЦИСТЕИНА

Ход работы

В пробирку вносят 5 капель 0,1% спиртового раствора викасола, добавляют 2 капли 0,02% раствора цистеина и 2 капли 10% раствора гидроксида натрия и тщательно перемешивают. Раствор в пробирке становится лимонно-желтого цвета.

8.5.3. РЕАКЦИЯ С АНИЛИНОМ

В основе метода лежит образование окрашенного 2-метил-3-фениламино-1,4-нафтохинона при реакции с анилином:



Ход работы

В пробирку вносят 10 капель 0,1% спиртового раствора викасола, добавляют 5 капель раствора анилина и перемешивают. Раствор в пробирке приобретает красный цвет.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица - Результаты лабораторной работы

№ п/п	Материал, содержащий витамин	Название витамина	Употребляемые реактивы и материалы	Наблюдаемые окраски, осадки, запах, обесцвечивание	На чём основана реакция

ЗНАЕТЕ ЛИ ВЫ ЧТО

Изменение витаминов при кулинарной обработке. Потери при кулинарной обработке водорастворимых витаминов (группы В, витамин С) вызваны либо переходом их в воду (отвар), либо разрушением за счет окисления или других деструкционных процессов. Содержание жирорастворимых витаминов (А, D, Е и др.), в свою очередь, снижается только за счет их разрушения. Например, при оттаивании мороженого мяса потери витаминов группы В составляют 4-10%, а при промывании риса - 30%. Большое количество витаминов группы В извлекается при варке растительных продуктов (круп, овощей): в отвар переходит до 40% витаминов, поэтому отвары желательно использовать.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Жирорастворимые витамины.
2. Витамин F. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
3. Витамин Q (убихинон). Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
4. Витамин E. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
5. Каротин. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная

потребность.

6. Витамин А. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.

7. Витамин Д. Химическая структура витаминов Д₂ и Д₃, роль в фосфорнокальциевом обмене. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.

8. Витамин К. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Научиться определять количественный состав витаминов в пищевых продуктах и биологических жидкостях.

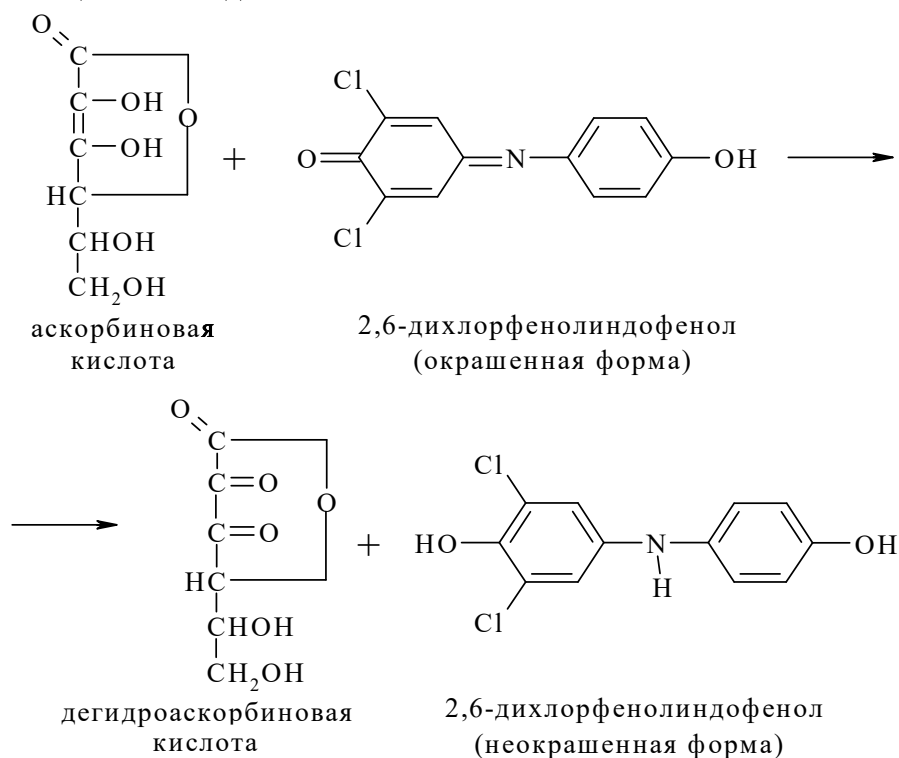
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Обнаружение витаминов в пищевых продуктах и биологических объектах преимущественно основано на их способности давать цветные реакции с определенными химическими веществами.

9.1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С ПО МЕТОДУ ТИЛЬМАНСА

Человек, приматы и морские свинки не способны синтезировать аскорбиновую кислоту и должны получать ее с пищей. Большинство других видов животных и, растения могут синтезировать это соединение из глюкозы. Микроорганизмы не содержат аскорбиновой кислоты и не нуждаются в ней.

Витамин С представляет собой лактон, характерным свойством которой является способность к окислению. Способность витамина С к окислению используется для его количественного определения. Он может восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, превращая его в бесцветное соединение:



Расчет можно вести следующим способом. 1 мл 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты.

$$X = \frac{0.0088 \times A \times \Gamma \times 100}{B \times V} \quad (\text{мг/кг})$$

где 0,088 - количество аскорбиновой кислоты (мг на 100 г продукта), соответствующее 1 мл 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола; *a* - количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованное на титрование, мл; *б*- общее количество вытяжки, мл; *в* - масса вещества, взятого для анализа, *г* - количество вытяжки, взятое для титрования, мл; 100 - коэффициент пересчета на 100 г продукта.

9.1.1.ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В ШИПОВНИКЕ ИЛИ ХВОЕ

Ход работы

Сухую хвою или шиповник (0,5 г) тщательно растирают в фарфоровой ступке с 2 мл раствора соляной кислоты, перемешивают и осторожно, без потерь (на палочке), через воронку переносят содержимое ступки в мерную колбу емкостью 50 мл. Ступку и пестик обмывают раствором соляной кислоты, и промывную жидкость присоединяют к общей порции вытяжки. Объем жидкости в мерной колбе доводят дистиллированной водой до метки, колбу закрывают пробкой и содержимое ее несколько раз перемешивают. Небольшую порцию вытяжки отфильтровывают через бумажный фильтр (фильтрат используют для титрования). В две колбочки емкостью 50 мл отмеривают по 2 мл вытяжки из шиповника или по 10мл вытяжки из хвои (к вытяжке из шиповника добавляют 8 мл раствора соляной кислоты). Содержимое колбочек титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты.

9.1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С В КАРТОФЕЛЕ

Ход работы

Картофель (5 г) измельчают и растирают в фарфоровой ступке, приливая постепенно 1 мл соляной кислоты и 15 мл дистиллированной воды. Полученную массу сливают в коническую колбочку. Ступку ополаскивают водой и сливают по стеклянной палочке в колбу. Титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты.

9.1.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В КАПУСТЕ

Ход работы

Взвешивают 1 г капусты, растирают в ступке с 2 мл соляной кислоты, приливают 8 мл воды и отфильтровывают. Для титрования отмеряют 2 мл фильтрата, добавляют 10 капель соляной кислоты и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски. Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты.

9.1.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В МОЛОКЕ

Ход работы

К 10 мл молока добавляют 10 капель соляной кислоты и 10 мл воды. Титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски. Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты.

9.1.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В ЛУКЕ

Ход работы

Лук (0,5 г) растирают в ступке с 2 мл соляной кислоты и 20 мл воды. Отфильтровывают и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розовой окраски. Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты.

9.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ВИТАМИНА С В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ

Витамин С легко разрушается при нагревании. Для определения устойчивости витамина С наблюдают результаты действия высокой температуры на него в присутствии различных веществ.

Ход работы

В три колбочки наливают по 5 мл настойки шиповника (или по 10 мл настойки

хвои). Потом доливают: в первую колбочку 5 мл 1 М НСl, во вторую - 10 капель 3% Н₂О₂, в третью - 0,5 мл 10% раствора СuSO₄. Все колбочки кипятят на электрической плитке в течение 2-3 минут. После охлаждения во все три колбочки доливают по 5 мл 1 М раствора НСl и по 20 капель крахмала. Титруют каждую пробу раствором йода (Сн=0,01 моль) до стойкого, не исчезающего в течение 30 секунд синего цвета. Сравнивают цифры титрования после нагревания в разных условиях с исходными цифрами титрования настойки шиповника или хвои.

Делают выводы, при каких условиях витамин С сохраняется в наибольшей степени. Полученные результаты записывают в виде таблицы.

Таблица Устойчивость витамина С при нагревании в разных условиях

Объем в мл 0,01М раствора йода, пошедшего на титрование	Условия нагревания		
	НСl	Н ₂ О ₂	СuSO ₄
Выводы:			

9.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С ЙОДОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Сущность метода заключается в изменении окраски йода при добавлении гипоиодита калия в зависимости от содержания витамина С (аскорбиновой кислоты). Метод предназначен для анализа содержания витамина С в пищевых продуктах растительного, животного и другого происхождения в сильно окрашенных растворах.

Ход работы

10 г измельченной навески (молока, картофеля или капусты) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, заливают 20 мл 1% раствора соляной кислоты, смесь встряхивают, доводят объем до метки 2% раствором метафосфорной кислоты, выдерживают в течение 10 мин для более полного растворения витамина С. Содержимое колбы фильтруют через бумагу.

По 10 мл фильтрата отбирают в 3 конические колбы вместимостью 100 мл. В две колбы добавляют по кристаллику KI и 3 капли 1 % раствора крахмала, полученные растворы титруют 0,001 н раствором гипоиодита калия из микробюретки. Даже в интенсивно-розовых растворах заметна фиолетовая окраска, появляющаяся от добавления 1 капли титранта. Для сравнения окраски третья колба должна стоять рядом.

Параллельно проводят титрование 10 мл 2% раствора Н₃РО₄ (контрольное титрование).

Расчет. Содержание витамина С (Х, мг/100 г продукта) вычисляют по формуле:

$$X = V_1 \cdot V_2 \cdot K \cdot 0,088 \cdot 100 / V_3 \cdot g$$

где V₁ - объем раствора 0,001 н раствора гипоиодита калия, израсходованного на титрование за вычетом поправки на контрольное титрование, мл; V₂ - объем испытуемой пробы, мл; g - навеска образца, взятого для анализа, г; V₃ - объем анализируемого раствора, взятого на титрование, мл; 0,088 - количество аскорбиновой кислоты, точно соответствующей 1 мл 0,001 н раствора гипоиодита калия; К - поправка на титрование раствора.

Поправочный коэффициент устанавливают по 0,01 н раствору соли Мора. Титр соли Мора определяют по 0,01 н КМnО₄, а титр раствора перманганата по 0,01 н раствору Н₂С₂О₄. Для этого 1 мл концентрированной серной кислоты добавляют к 10 мл 0,01 н раствора Н₂С₂О₄. Смесь нагревают до 80°С и титруют до слабо-розового окрашивания 0,01 н раствором КМnО₄ (расход раствора В, мл). Затем титруют соль Мора, для этого к 10 мл раствора соли Мора добавляют 3 капли концентрированной серной кислоты и титруют 0,01 н КМnО₄ (расход раствора V₁, мл) до появления устойчивой слабо-розовой окраски. Далее титруют 0,001 н раствор гипоиодита калия. Для этого к 10 мл добавляют 5 мл насыщенного раствора оксалата натрия и титруют из микробюретки раствором соли Мора до перехода окраски в соломенно-желтую (расход раствора V₂, мл). Поправку К рассчитывают по формуле:

$$K = V_1 \cdot V_2 / B$$

Результаты определений рассчитывают до второй значащей цифры и округляют до первого знака после запятой.

За окончательный результат испытаний принимают среднее арифметическое результатов (X) двух параллельных определений, расхождение между которыми не должно превышать 25 % по отношению к среднему арифметическому при $P=0,95$. (При независимом определении 60%).

Пределы возможных значений систематической составляющей погрешности измерений содержания витамина любой пробы при допускаемых методом изменения влияющих факторов $\pm 0,125 X$. Минимальный уровень титриметрического обнаружения витамина С составляет 10 мкг в титруемом объеме, что соответствует 0,4 мкг/мл при степени извлечения витамина из пробы >80-90 %.

9.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА С МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Можно использовать несколько различных систем определения для аскорбиновой методом ТСХ (таблицу 17). Проявление хроматограмм с аскорбиновой кислоты проводится фосфорномолибденовым реактивом или в парах йода.

Ход работы

На пластинке силифола на расстоянии 1 см от нижнего края намечают линию старта. На стартовую линию капилляром наносят пробы 1% раствора аскорбиновой кислоты в качестве метчика и соки лимона и апельсина так, чтобы расстояние пятен от боковых краев и между собой было не менее 1 см. Когда пятна подсохнут, пластинку помещают в камеру, на дно которой налито 5 мл смеси для разделения.

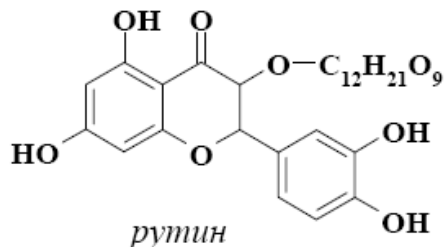
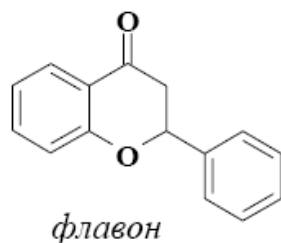
После достижения растворителем верхней границы, вынимают пластинку, отмечают линию фронта растворителя и высушивают пластинку. Для обнаружения соединений помещают пластинку в эксикатор с парами йода или обрабатывают пластинку фосфорномолибденовым реактивом. Отмечают проявившиеся пятна и определяют R_f аскорбиновой кислоты (табл.).

Таблица Хроматографирование аскорбиновой кислоты

№	Элюент	R_f
1	Этанол — гексан (3:1)	0,86
2	Этилацетат — кислота уксусная ледяная (8:2)	0,88
3	бензол — этанол — уксусная кислота — ацетон (70:20:5:5)	0,75

9.5. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИН Р (РУТИНА) В ЧАЕ ПО ЛЕВЕНТАЛЮ

Известно несколько соединений, обладающих Р-витаминной активностью. В основе их лежит скелет флавона.



Наиболее изучены строение и свойства рутина.

Рутин - кристаллическое вещество желто-оранжевой окраски. Содержится во всех продуктах, в которых обнаруживается витамин С. Много его в чае, фруктах, ягодах (бруснике, клюкве, сливе, винограде). Рутин участвует в окислительно-восстановительных процессах. Его присутствие усиливает окислительно-

восстановительный эффект витамина С.

Количественное определение рутина основано на его способности окисляться перманганатом калия.

В качестве индикатора применяют индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом после полного окисления всего рутина. Экспериментально установлено, что 1 мл 0,05 н. раствора перманганата калия окисляет 3,2 мкг (0,00506 мкмоль) рутина. В черном чае содержится 300-500 мг/кг (474-790 мкмоль/кг) рутина.

Ход работы

К 0,1 г черного и зеленого чая приливают по 50 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию в течение 5 мин. Отмеривают в конические колбочки по 10 мл экстракта, добавляют по 10 мл дистиллированной воды и 10 капель индигокармина (появляется синяя окраска). Титруют раствором перманганата калия до появления устойчивой желтой окраски. Расчеты производят по формуле:

$$X = 3,2 \cdot (0,00506) \cdot a \cdot 50 \cdot 1000 / 10 \cdot 0,1 \text{ (мкг(мкмоль)/кг)}$$

где $3,2 \cdot (0,00506)$ - количество рутина (мкг, мкмоль), соответствующее 1 мл 0,05 н раствора перманганата калия; a - количество 0,05 н раствора перманганата калия, израсходованное на титрование, мл; 10 - количество вытяжки, взятое для титрования, мл; 50 - общий объем экстракта; 0,1 - масса сухого вещества, мг; 1000- коэффициент пересчета на 1 кг сухого вещества.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что происходит в организме человека при отсутствии или недостатке витаминов в пище? Совместимые и несовместимые витамины. Примеры.
2. Использование витаминов в пищевой промышленности.
3. Количественное определение витамина С. Принцип метода.
4. Количественное определение витамина Р. Принцип метода.
5. Что происходит с витаминами при нагревании?
6. Какова устойчивость витаминов под действием света?
7. Что такое явление синергизма? Поясните на примере витаминов С и Р.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №10. ФЕРМЕНТЫ, ОБЩИЕ СВОЙСТВА, ВЫДЕЛЕНИЕ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Выделить ферменты разных классов из различных биологических объектов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Ферменты — это белки, обладающие каталитической активностью. В клетках и жидкостях организма они выполняют роль биологических катализаторов, осуществляя свое действие путем снижения энергии активации.

Источником для получения ферментов служат различные биологические объекты: свежие и свежемороженые животные и растительные ткани, семена растений, биологические жидкости, микроорганизмы. Извлекают ферменты из этих объектов посредством экстрагирования водой, водными растворами глицерина, нейтральных солей, буферными растворами при одновременном механическом разрушении клеточных структур.

10.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ПО МЕТОДУ ВОЛЬГЕМУТА

Метод заключается в том, что слюну разводят в определенной последовательности, после чего одно и то же крахмала приливают, находят наименьшее содержание фермента, которое полностью расщепляет все количество добавленного крахмала, затем производят расчет на 1 мл слюны.

Амилазная активность слюны выражается количеством 1% раствора крахмала в мл, которое может расщепить 1 мл слюны при температуре 37 °С в течение 30 мин.

Ход работы

В 10 пронумерованных пробирок наливают по 1 мл воды. В 1 добавляют 1 мл слюны, разведенной в 10 раз, перемешивают несколько раз, втягивая и выпуская жидкость из пипетки. Набирают в пипетку 1 мл смеси из одной пробирки, переносят ее во 2-ю; из 2-й таким же образом в 3-ю и т.д. до 10 пробирки, из последней пробирки 1 мл смеси выливают. В каждой последующей пробирке, таким образом, содержание фермента вдвое меньше, чем в предыдущей.

Во все 10 пробирок приливают по 1 мл воды и по 2 мл 0,1% раствора крахмала. Перемешивают, встряхивают пробирки и помещают в термостат при температуре 37 °С на 30 мин. Затем пробирки вынимают, охлаждают, во все добавляют по 1 капле раствора йода, перемешивают и отмечают окраску.

Данные занести в таблицу.

Таблица Определение активности амилазы

№ пробирки	Разведение слюны	Окрашивание йодом	Активность амилазы
1	1:10		
2	1:20		
3	1:40		
4	1:80		
5	1:160		
6	1:320		
7	1:640		
8	1:1280		
9	1:2560		
10	1:5120		

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

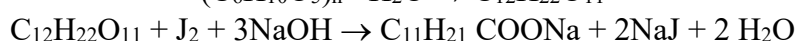
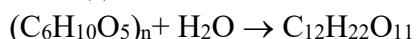
Активность α -амилазы выражают количеством миллилитров 0,1% раствора крахмала, которое может расщепить 1 мл неразведенной слюны при 37 °С в течение 30 минут до стадии эритродекстрина. Рассчитывают количество слюны в последней пробирке с желтоватой окраской.

Например, если с красно-бурой окраской жидкость была отмечена в 5 пробирке, где слюна разбавлена в 160 раз и куда было прибавлено 2 мл 0,1% раствора крахмала, то 1 мл неразбавленной слюны расщепил бы в 160 раз больше 0,1% раствора крахмала: 1/160 мл слюны расщепляет 2 мл — 0,1% раствора крахмала, 1мл слюны расщепляет x мл 0,1% раствора крахмала, т. е. $x = 2 \cdot 1:1/160 = 320$ мл 0,1% раствора крахмала. Следовательно, 1 мл неразбавленной слюны расщепляет за 30 минут при 37 °С 320 мл 0,1% раствора крахмала. Условно это принимают за 320 единиц α -амилазы по Вольгемуту. Результат принято изображать следующим образом: $A_{37^\circ/30'} = 320$ ед.

10.2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ ПО ПРИРОСТУ МАЛЬТОЗЫ

Данный метод определения активности амилазы основан на измерении прироста количества мальтозы, которая образуется при действии амилазы на полисахариды — крахмал и гликоген.

Крахмал и гликоген не обладают восстанавливающей способностью, тогда как продукт их гидролиза мальтоза — обладает этим свойством. Реакция идет по уравнению:



В результате реакции йод, добавленный в реакционную смесь, в щелочной среде восстанавливается под действием образующейся мальтозы, превращаясь в бесцветное соединение — соль NaJ. Путем титрования определяют количество йода, эквивалентное данной величине мальтозы, и рассчитывают активность амилазы.

Ход работы

В две колбочки (опытную и контрольную) вносят по 0,1 мл слюны, разведенной в 5 раз, по 0,5 мл фосфатного буфера pH 6,8 и по 0,1 мл 1% раствора NaCl. В контрольную пробу вносят 0,5 мл 5% раствора HCl и кипятят.

В обе колбочки наливают 2 мл 2% раствора крахмала, перемешивают и ставят на 30 минут в термостат при 37 °С.

Спустя 30 минут в опытную колбочку вносят 0,5 мл 5% HCl и нагревают до кипения. Затем в обе колбы, добавляют по 15 мл 0,1 н. раствора J₂ и по каплям, все время перемешивая, добавляют 0,5 мл 40% раствора NaOH.

Оставляют пробы стоять 15 минут, а затем в обе колбочки вносят по 10 мл 5% раствора HCl и выделившийся J₂ титруют 0,05 н. раствором Na₂S₂O₃ до исчезновения сине-фиолетового окрашивания.

Рассчитывают активность амилазы: 1 мл 0,05 н. раствора J₂ эквивалентный 1 мл 0,05 н. раствора Na₂S₂O₃, соответствует 8,57 мг мальтозы. Количество образовавшейся мальтозы

$$C = (B-D) \cdot 8,57,$$

где В — количество 0,05 н. раствора Na₂S₂O₃, пошедшее на титрование контрольной пробы; D — количество 0,05 н. раствора Na₂S₂O₃, пошедшее на титрование опытной пробы; 8,57 коэффициент поправки на 0,05 н. раствора Na₂S₂O₃.

Активность амилазы А будет равна:

$$A = C/n,$$

где n — разведение пробы.

10.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ

Предлагаемый метод основан на учете образующегося в процессе реакции аммиака при гидролизе мочевины NH₂—CO—NH₂. При этом уреазы не действуют на тиомочевину, структурно сходное вещество NH₂—CS—NH₂.

Препарат уреазы приготовить заранее (8 г соевой муки или муки семян бобовых растений) заливают 46 мл дистиллированной воды, прибавляют 2 мл 0,1н. раствора HCl и несколько капель толуола, перемешивают и оставляют на ночь, затем фильтруют или центрифугируют, объем фильтрата доводят промывными водами до 50 мл).

Ход работы

В две колбы на 50 мл вносят по 5 мл препарата уреазы и по 5 мл 2% раствора мочевины в фосфатном буфере (pH 7), перемешивают. В одной из колб фермент инактивируют путем нагревания до кипения; обе колбы ставят на 1 час в термостат при 37 °С, после чего в колбы добавляют по 1 мл 0,1%-ного раствора HgCl₂, несколько капель 0,2%-ного метилового красного и выделившийся аммиак титруют 0,1 н. раствором HCl.

1 мл 0,1 н. раствора HCl соответствует 1,4 мг азота.

Расчет активности уреазы производят по формуле:

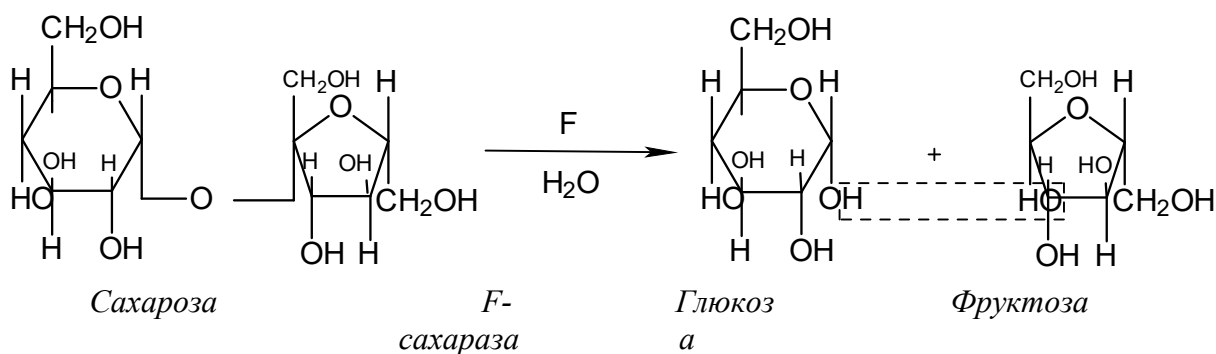
$$v = \frac{(A - B) \cdot T \cdot 1,4 \cdot 1,25 \cdot 5}{t}$$

где А и В — количество 0,1н. раствора HCl, пошедшее на титрование соответственно опытной пробы и контрольной, мл; Т — поправка к титру раствора HCl; t — время, в течение которого действовал фермент, мин; 1,25 — коэффициент для пересчета количества фермента на 1 г навески муки.

За единицу активности уреазы принимают такое количество фермента, которое за 5 минут при 37 °С и pH 7 образует из мочевины 1 мг азота аммиака.

10.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ САХАРАЗЫ

Сахараза вызывает гидролитическое расщепление сахарозы на глюкозу и фруктозу. Сахарозу обычно получают из дрожжей.



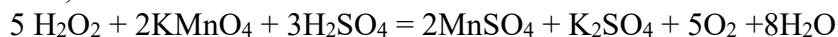
Ход работы

5 г высушенных на воздухе пивных или прессованных дрожжей растирают в течение 20 минут с кварцевым песком и 25 мл воды, подогревают до 60 °С, затем фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным, для чего первые порции мутного фильтрата снова выливают в воронку для фильтрования.

Берут 4 пробирки, в первые две приливают по 1 мл инвертазы, по 2 мл 5 % раствора NaOH и нагревают до кипения. В две другие приливают по 1 мл инвертазы. Затем во все 4 пробирки приливают по 5 мл 1% раствора сахарозы. Пробирки №3 и 4 ставят на 15 минут в термостат при 37 °С. По истечении указанного времени в пробирки № 3 и 4 приливают по 2 мл 5% раствора щелочи. После охлаждения во все пробирки добавляют по 5 мл Фелинговой жидкости и нагревают до кипения. Выпадает красный осадок гидрата закиси меди. По количеству осадка судят об активности инвертазы.

10.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ (ПО А.Н. БАХУ И А.И. ОПАРИНУ)

Метод определения активности каталазы основан на определении количества пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом. Количество H₂O₂ в реакционной смеси определяют титрованием в кислой среде раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л:



На основании приведенного уравнения реакции можно рассчитать, что 1 мл раствора с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л соответствует 1,7 мг (50 мкмоль) пероксида водорода.

10.6. ЗАВИСИМОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ОТ pH РЕАКЦИИ СРЕДЫ

Скорость ферментативных реакций зависит от содержания водород ионов в среде. Концентрация ионов водорода, при которой наблюдается максимальная скорость реакции, называется оптимальной (оптимум pH). При небольшом отклонении от оптимума pH скорость ферментативной реакции замедляется, при резком отклонении - реакция прекращается полностью.

Влияние pH на активность ферментов объясняется тем, что белковая молекула фермента является амфотерным полиэлектролитом, каталитический эффект которого зависит от степени ионизации функциональных групп, которые входят в активный центр.

Ход работы

Готовят 5 буферных растворов с pH от 5,6 до 7,8, как указано в таблице.

Таблица Приготовление буферных растворов

№	pH	Количество 0,2 М раствора Na ₂ HPO ₃ , мл	Количество 0,1 М раствора лимонной кислоты, мл
1	5,6	2,90	2,10
2	6,4	3,45	1,55
3	6,8	3,65	1,15
4	7,2	4,35	0,63

5	7,8	4,80	0,20
---	-----	------	------

К 5 мл приготовленных смесей добавляют по 0,5 мл слюны, разбавленной водой в 10 раз и 0,5 мл крахмала. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и ставят в термостат при 37 °С на 10 минут. После чего из пробирки 3 отбирают несколько капель жидкости и на стекле смешивают с I₂ в KI. Если получается синее окрашивание, то реакцию с йодом повторяют каждые 5 минут до тех пор, пока не будет красного или оранжевого окрашивания, которое указывает на близкий конец гидролиза. Через 2-3 минуты после появления подобной окраски все пробирки вынимают из термостата и помещают в стакан со льдом. После этого быстро добавляют в каждую пробирку по 2-3 капли раствора йода, перемешивают и отмечают окраску. Оптимальная pH для амилазы слюны будет в той пробирке, в которой крахмал полностью расщепился (при реакции с йодом окраска будет желтой). Фиолетовое, красно-фиолетовое и бурое окрашивание показывает меньшую степень расщепления крахмала.

Результаты опыта занести в таблицу.

Таблица Зависимость активности амилазы слюны от pH среды

№ пробы	pH среды	Окраска с йодом	Оптимум pH
1	5,6		
2	6,4		
3	6,8		
4	7,2		
5	7,8		

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Зависимость активности амилазы от pH среды представить графически, откладывая по оси абсцисс значение pH среды, а по оси ординат — время в минутах, необходимое для гидролиза крахмала до стадии эритродекстрина.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Методы определения ферментативной активности. Особые приемы, применяемые при выделении ферментов.
2. В каких единицах измеряется ферментативная активность?
3. Способы определения активности ферментов.
4. Как можно обнаружить фермент в биологическом материале?
5. Дайте определение удельной активности фермента
6. Факторы, определяющие активность ферментов.
7. Химическая природа ферментов, их строение и структура.
8. Основные этапы и условия выделения ферментов из биоматериала.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11. ВЫДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с методами выделения углеводов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Углеводы - обширный класс соединений широко распространенных в природе. По химической природе это органические вещества, представляющие собой альдегиды или кетоны многоатомных спиртов. В зависимости от числа атомов углерода в цепи моносахариды делят на тетразы (C₄), пентозы (C₅), гексозы (C₆) и т.д. В каждую из этих групп включают и альдозы и кетозы.

Углеводы широко распространены в природе, они встречаются в свободной или связанной форме в любой растительной, животной или бактериальной клетке. Наиболее распространенный углевод – целлюлоза, структурный компонент деревьев и других растений. Главный пищевой ингредиент – крахмал.

Углеводы образуются в растениях в процессе фотосинтеза (80% сухого вещества растений составляют углеводы) и служат источником энергии для животных, питающихся этими растениями. Кроме этого, углеводы являются основным структурным материалом

растений, составной частью нуклеиновых кислот, играющих важную роль в процессе биосинтеза белка.

1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УГЛЕВОДОВ

Метод основан на неодинаковой способности углеводов адсорбироваться на тех или иных адсорбентах и различной растворимости в смешивающихся жидкостях.

Ход работы

На пластинах наносят 1 мл 5% водного раствора сахаров в виде сплошной полосы длиной 2-5 мм, отступая от бокового и нижнего краев пластины на расстоянии 1 см. Пластинку вертикально помещают в камеру, которая заполнена разделяющей смесью до высоты 0,5 см. Состав разделяющей смеси можно взять любой из таблицы 32, например: н-бутанол - уксусная кислота - вода (60 мл-15 мл-25 мл). Пластинку выдерживают в камере до тех пор, пока высота подъема фронта восходящего растворителя не достигнет отмеченной длины разделительного пути, составляющая 9 см. По окончании разделения пластинку вынимают из камеры и сушат при комнатной температуре в вытяжном шкафу до испарения остатков растворителя.

Высушенные пластинки погружают в реагент, представляющий собой следующую смесь: н-бутанол - вода - уксусная кислота - фосфорная кислота – анилин - дефиниламин (60 мл-25 мл-15 мл- 10 мл- 1 мл- 2 г). Пластинки снова высушивают и проявляют в термостате при температуре 120 °С в течение 5 минут.

После проявления сопоставляют расположение пятен сахаров, которое будет различным в силу разной степени подвижности веществ (табл.). Степень подвижности сахаров на хроматограмме выражают через соотношение пути, пройденного данным соединением от линии старта к расстоянию, пройденному фронтом растворителя (R_f):

$$R_f = a/b$$

где, а- расстояние от линии старта до центра пятна;

б- расстояние от старта до финиша.

Таблица. Значения R_f некоторых углеводов

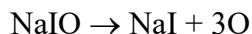
Вещество	А		Б		В	Г		Д	Е		Ж		З
	С1	С2	С3	С4	С5	С6	С7	С8	С9	С10	С11	С12	С13
Глюкоза	17	14	42	46	37	13	100	74	45	39	32	100	34
Ксилоза	39	45	39	54	100	27	126	-	57	49	-	155	56
Галактоза	18	11	32	40	30	12	-	67	42	35	37	83	-
Лактоза	4	-	25	23	8	-	47	43	34	26	12	36	33
Рамноза	62	78	52	60	140	49	-	-	60	55	-	210	66
Манноза	23	-	32	60	46	19	-	-	47	42	37	115	43
Мальтоза	6	-	-	32	10	34	61	55	39	30	-	53	-
Сахароза	8	-	29	36	-	40	74	59	44	39	-	66	-

Обозначения: А - кремнезем, обработанный буфером; Б - силикагель; В - силикагель (готовые пластинки); Г - силикагель, обработанный буфером; Д - силикагель, борная кислота; Е - алусил; Ж - целлюлоза; З - тальк.

С1 этилацетат - 65%-й пропанол-2(65:35); С2 этилацетат - 65%-й пропанол-2 - вода (4:1:0,5); С3 метилэтилкетон - уксусная кислота - метанол (1:1:3); С4 бутанол - этилацетат - пропанол-2 - уксусная кислота - вода (35:100:60:35:30); С5 ацетонитрил - сероуглерод - вода (85:5:10); С6 бутанол - ацетон - вода (4:5:1); С7 хлороформ - уксусная кислота - вода (3:3,5:0,5); С8 метилэтилкетон - уксусная кислота - метанол (6:2:2); С9 пропанол - этилацетат - вода - 25%-й аммиак (5:1:1:3); С10 пропанол - этилацетат - вода - 25%-й аммиак (6:1:3:1); С11 бутанол - пиридин - вода (10:3:3); С12 вода - этилацетат - пиридин (25:100:35); С13 бутанол - вода - муравьиная кислота (5:5:1).

2. ЙОДОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТОЗЫ

Сущность метода заключается во взаимодействии между альдегидной группой молочного сахара или глюкозы с йодом в щелочной среде, в которой йод окислитель:



Выделившийся атомарный кислород окисляет молочный сахар в лактобионовую кислоту:



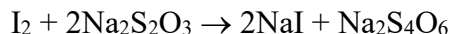
лактобионовая кислота

глюкозу, образовавшуюся при инверсии сахарозы, в глюконовую кислоту:



глюконовая кислота

При определении сахаров берут избыток йода и по разнице между количеством взятого и не прореагировавшего йода титрованием раствором гипосульфита натрия находят содержание сахара:



Молочный сахар имеет одну альдегидную группу и при переходе в лактобионовую кислоту присоединяет 1 атом кислорода.

Это эквивалентно 2 атомам йода или 1 мл 0,1 н раствора, окисляющего 18,01 мг молочного сахара (360,2:2). Грамм-эквивалент сахарозы при йодометрическом определении равен 171,0 (молекулярному весу, делённому на 2 (342:2)), так как одна молекулы глюкозы, полученной из сахарозы, соответствует 2 атома йода, то 1 мл 0,1 н раствора окисляет 17,1 мг сахарозы (фруктоза йодом практически не окисляется).

Ход работы

Отмеряют 5 мл молока в мерную колбу на 200 мл, прибавляют до половины колбы дистиллированную воду, 5 мл раствора медного купороса и 2 мл 1 н раствора едкого натра, перемешивая жидкость после прибавления каждого реактива.

Доливают до 200 мл водой, снова перемешивают и оставляют для отстаивания на 20 минут в темноте.

Отстоявшуюся жидкость профильтровывают в сухую колбу через складчатый фильтр.

25 мл фильтрата переносят в коническую колбу на 250 мл с притёртой или резиновой пробкой, приливают 12,5 мл 0,1 н раствора йода и сейчас же при непрерывном перемешивании добавляют из бюретки 18 мл 0,1 н раствора едкого натра.

Закрывают колбу пробкой и оставляют в темноте на 20 минут при комнатной температуре.

Прибавляют в колбу 4 мл 0,5 н раствора соляной кислоты, оттитровывают выделившийся йод 0,1 н раствором гипосульфита натрия в присутствии 1% раствора крахмала. Титрование ведут медленно, сначала без прибавления индикатора (до получения светло-жёлтой окраски), затем прибавляют 1 мл 1% раствора крахмала и продолжают титрование до момента, когда от 1 капли раствора гипосульфита исчезнет синяя окраска.

Проводят холостую пробу, для чего в другую такую же колбу отмеривают 12,5 мл 0,1 н раствора йода, добавляют при непрерывном помешивании 18 мл 0,1 н раствора едкого натра и, закрыв колбу пробкой, оставляют в темноте на 20 минут, а затем проводят определение как в первой колбе.

Содержание лактозы в % находят по формуле:

$$Л = 0,873 \cdot (a - б)$$

где Л – содержание лактозы; а - количество 0,1 н раствора гипосульфита, пошедшего на титрование йода в холостой пробе, мл; б - количество 0,1 н раствора гипосульфита, пошедшего на титрование йода при определении в фильтрате, мл; 0,873 – поправка на количество лактозы, реагирующее с 1 мл 0,1 н раствора йода, г.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Физико-химические свойства глюкозы и других углеводов, на которых основаны методы их качественного и количественного определения в биологических жидкостях.

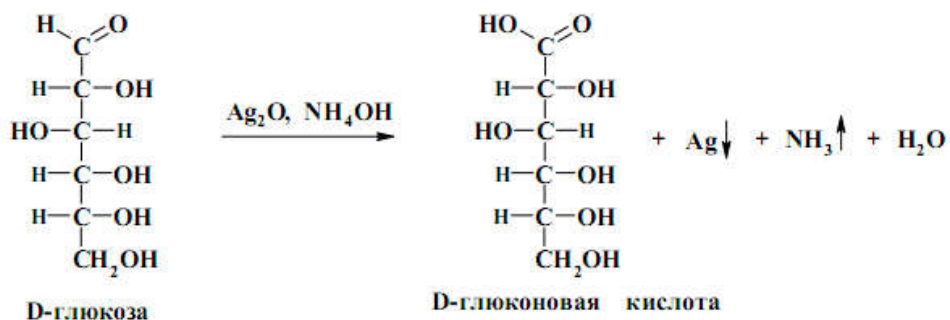
2. Сущность йодометрического определения лактозы.
3. Метод ТСХ для определения углеводов.
4. Фотосинтез, его значение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12. УГЛЕВОДЫ, ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Моносахариды являются гетерофункциональными соединениями. В их молекулах одновременно содержатся и карбонильная (альдегидная или кетонная), и несколько гидроксильных групп, т.е. моносахариды представляют собой полигидроксикарбонильные соединения - полигидроксиальдегиды и полигидроксикетоны.

12.1. РЕАКЦИЯ «СЕРЕБРЯНОГО ЗЕРКАЛА»

Как и у всех альдегидов, окисление моносахаридов приводит к соответствующим кислотам. Так, при окислении глюкозы аммиачным раствором гидрата окиси серебра образуется глюконовая кислота.

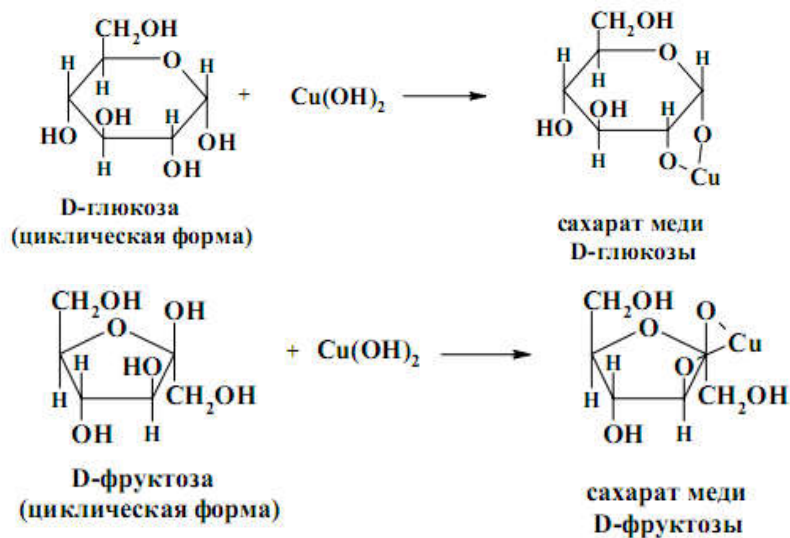


Ход работы

В большую пробирку поместите 3 капли 0,2 н раствора AgNO_3 , 5 капель 2 н NaOH и добавляйте по каплям 2 н NH_4OH до полного растворения образующегося осадка. Полученный бесцветный раствор - аммиачный раствор гидрата окиси серебра. Затем к аммиачному раствору гидрата окиси серебра добавьте 3-4 капли 0,5% раствора глюкозы и слегка подогрейте. Металлическое серебро выделится либо в виде осадка черного цвета, либо в виде блестящего зеркального налета, если стенки пробирки химически чисты. Запишите уравнения реакций. Аналогичный опыт проделайте с 0,5% раствором фруктозы.

12.2. РЕАКЦИЯ ТРОММЕРА

У восстанавливающих углеводов имеется свободный полуацетального гидроксил, который определяет восстанавливающие свойства и реакции, свойственные моносахаридам. У невосстанавливающих углеводов не содержится свободного полуацетального гидроксила и не проявляются характерные реакции для альдегидной группы.



Ход работы

В большую пробирку поместите 0,5 мл 0,5 % раствора глюкозы и 6-8 капель 2 н NaOH. Затем по каплям добавляйте 0,2 н раствор CuSO_4 , пока не прекратится его растворение. Осторожно нагрейте пробирку. Голубой не растворимый в воде осадок гидрата окиси меди постепенно переходит в желтый, а затем в красный осадок закиси меди. Аналогичный опыт проделайте с 0,5% раствором фруктозы.

12.3. ОТКРЫТИЕ ФРУКТОЗЫ (РЕАКЦИЯ СЕЛИВАНОВА)

Фруктоза (моноза, гексоза, кетоза, левулеза, плодовый сахар) содержится во всех зеленых растениях и нектаре цветов.

Реакция Селиванова является специфической на кетозы. При нагревании фруктозы с соляной кислотой образуется оксиметилфурфурол. При его взаимодействии с резорцином, образуется соединение, окрашенное в красный цвет.



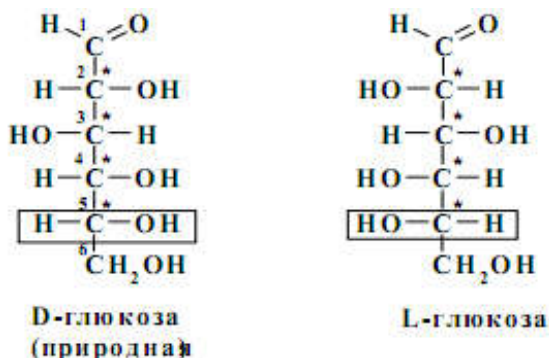
Ход работы

В первую пробирку вносят 10 капель 0,5% раствора фруктозы, во вторую пробирку - 10 капель 0,5% раствора глюкозы. В обе пробирки добавляют в равных объемах свежеприготовленный реактив Селиванова (0,5% раствор резорцина в 20% соляной кислоте). Осторожно нагрейте. Что наблюдаете?

12.4. ПРОБА БЕНЕДИКТА НА ГЛЮКОЗУ

Глюкоза — самая распространенная из моноз как в растительном, так и в животном мире. Содержится в свободном виде в зеленых частях растений, семенах, различных фруктах и ягодах. В больших количествах содержится в винограде — отсюда происходит ее другое название — виноградный сахар.

Реактив Бенедикта: В колбу на 1 л наливают 700 мл дистиллированной воды, добавляют 173 г лимоннокислого натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 11 \text{H}_2\text{O}$), 100 г безводного (или 200 г кристаллического) углекислого натрия. Нагревают до растворения. Отдельно растворяют 17,3 г сернокислой меди в 100 мл воды. Смешивают оба раствора, непрерывно взбалтывая, и после охлаждения доливают до 1 л дистиллированной водой в мерной колбе.

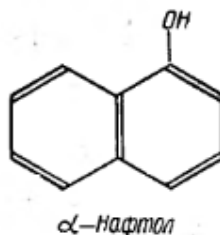


Ход работы

В пробирку наливают 5 мл реактива Бенедикта и прибавляют 0,5 мл 5% раствора глюкозы. Перемешивают и нагревают 1 мин на пламени или 5 мин на водяной бане. Раствор охлаждают и через 5 минут отмечают результаты. При наличии глюкозы раствор окрашивается в зеленый, желтый или красный цвет, на дне образуется осадок.

12.5. РЕАКЦИЯ МОЛИША

Пентозы с α -нафтолом в присутствии серной кислоты образуются продукты конденсации, имеющие окраску от красной до синей.

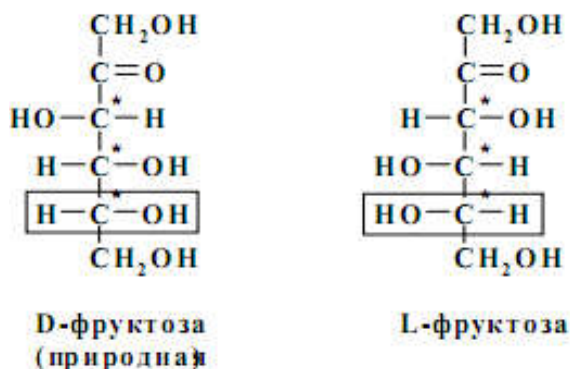


Ход работы

К 1 мл раствора рибозы добавляют 1-2 капли спиртового раствора α -нафтола, затем по стенке пробирки к смеси осторожно приливают 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы кислота не смешивалась с водным слоем. Появление темно-фиолетового кольца на границе двух слоев указывает на присутствие углевода или вещества, содержащего углеводов.

12.6. ЦВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ С ВАНИЛИНОМ НА ФРУКТОЗУ

Эта реакция основана на конденсации продуктов расщепления фруктозы с ванилином, причем, в зависимости от концентрации сахара, получается слабо розовое и красное окрашивание.



Ванилиновый реагент готовят, растворяя 0,2 г ванилина в смеси 25 мл концентрированной соляной кислоты 75 мл 85% фосфорной кислоты. Такой раствор хранят в хорошо, закрытой темной склянке.

Ход работы

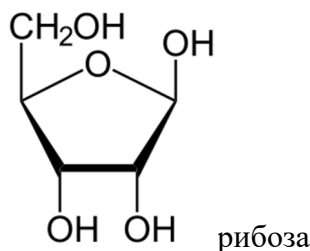
1 мл исследуемого раствора (1% фруктозы)- смешать с 5 мл ванилинового реагента и нагреть две минуты на водяной бане, после чего быстро охладить в ледяной воде.

12.7. РЕАКЦИЯ НА КАРБОНИЛЬНЫЕ ГРУППЫ

В одну пробирку наливают 2 мл 10% раствора формальдегида, а во вторую 2 мл 1% раствора глюкозы. Затем в обе пробирки добавляют по 2 мл фуксинсернистой кислоты и перемешивают. Через несколько минут в пробирке с формальдегидом появляется фиолетовое окрашивание, а раствор с глюкозой остается бесцветным. Почему глюкоза не дает реакцию на карбонильную группу?

12.8. РЕАКЦИЯ ПОДОБЕДОВА-МИЛЫША

Рибоза - моносахарид (альдопентоза), входит в состав РНК, динуклеотидов и др. биологически активных веществ.

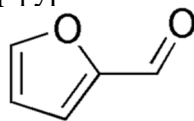


Ход работы

В 2 пробирки налить по 2 мл раствора рибозы. В 1-ю добавить 1 мл α -нафтола, во 2-ю 1 мл тимола. В обе пробирки осторожно по стенке добавить концентрированной серной кислоты. На границе раздела фаз жидкостей образуется красное кольцо.

12.9. РЕАКЦИЯ ПЕНТОЗ С УКСУСНОКИСЛЫМ АНИЛИНОМ

В ходе реакции образуется фурфурол.



фурфурол

Ход работы

В пробирку поместить несколько крупинок любой пентозы и прилить 2 мл раствора соляной кислоты (1:1). На фильтровальную бумагу нанести 2 капли анилина и 2 капли уксусной кислоты. Затем подносят эту бумажку у отверстию пробирки со смесью пентозы с соляной кислотой и кипятят реакцию смесь. Через 1-2 минуты на бумаге появляется розово-красное пятно.

12.10. ПРОБА ГАЙНЕСА

Проба основана на свойстве глюкозы восстанавливать гидрат окиси меди в гидрат закиси меди (желтый цвет) или закись меди (красный цвет).

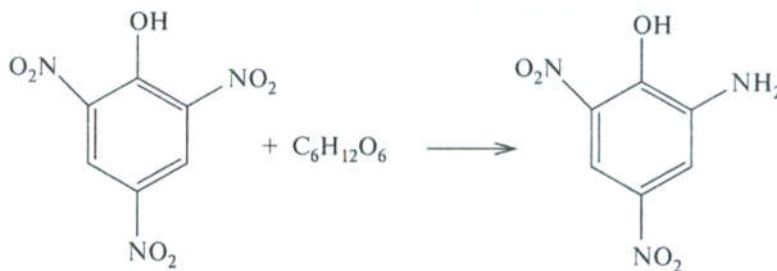
Реактив Гайнеса: 1) 13,3 г кристаллического сульфата меди растворяют в 400 мл воды; 2) 15 г глицерина разводят в 200 мл воды; 3) 50 г NaOH растворяют в 400 мл воды. Смешивают первый и третий растворы и тотчас приливают второй. Реактив стойкий.

Ход работы

К 1-2 мл реактива Гайнеса приливают 10 капель 5% раствора глюкозы, кипятят или ставят на кипящую водяную баню. В присутствии глюкозы появляется желтая или красная окраска жидкости и осадок.

12.11. РЕАКЦИЯ С ПИКРИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Раствор глюкозы при взаимодействии с пикриновой кислотой приобретает темно-красное окрашивание вследствие превращения пикриновой кислоты в пикраминую.



Ход работы

К 1 мл 1% раствора глюкозы приливают 0,5 мл 10% раствора гидроксида натрия и 1 мл раствора 1% пикриновой кислоты. Смесь нагревают на водяной бане. Что происходит?

12.12. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УГЛЕВОДОВ С КОНЦЕНТРИРОВАННЫМИ КИСЛОТАМИ

При действии концентрированных минеральных кислот молекулы углеводов постепенно расщепляются, образуя смесь различных продуктов: фурфурол и его производные и так называемые гуминовые вещества. Они окрашены в темно-бурый или черный цвет, плохо растворимы в воде и в условиях опыта выделяются на границе слоев жидкости.

Ход работы

12.12.1. РЕАКЦИЯ С СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

Несколько крупинок глюкозы или фруктозы растворяют в 1-2 мл воды. К холодному раствору осторожно, по стенкам пробирки, добавляют равный объем концентрированной серной кислоты, стараясь не взболтать смесь. Серная кислота образует нижний, тяжелый,

слой под раствором сахара. На границе этих слоев постепенно появляется темно-бурое кольцо. Если на холоду кольца не образуется, слегка подогревают содержимое пробирки, не взбалтывая.

12.12.2. РЕАКЦИЯ С СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

Небольшое количество глюкозы кипятят 20-30 сек с 2 мл концентрированной соляной кислоты, раствор охлаждают и добавляют воду до 2/3 высоты пробирки. Повторяют этот же опыт, заменив глюкозу фруктозой. Что наблюдаете?

12.13. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ САХАРОВ СО ЩЕЛОЧАМИ

Все сахара, имеющие свободную карбонильную группу, т.е. все моносахариды и некоторые дисахариды при нагревании в щелочном растворе легко осмоляются, образуя коричневый или черный раствор. Опыт одновременно проводят с несколькими различными сахарами, применяя готовые 5-10%-ные их растворы или растворяя 0,1-0,2 г сахара в 1-2 мл воды.

Ход работы

К 1-2 мл раствора исследуемого сахара (моносахариды (глюкоза, галактоза, фруктоза), дисахариды (сахароза, лактоза, мальтоза)) добавляют вдвое меньший объем концентрированного раствора щелочи, нагревают смесь до кипения и поддерживают в таком состоянии в течение 2-3 мин. Отметив изменение окраски раствора, если оно наблюдается, охлаждают жидкость и подкисляют ее разбавленной серной кислотой. Окраска бледнеет и появляется отчетливый запах карамели (жженого сахара).

12.14. ОКИСЛЕНИЕ АЛЬДОЗЫ И КЕТОЗЫ ЙОДОМ

Ход работы

Опыт проводят параллельно с растворами (2%-ные растворы) глюкозы и фруктозы. К 3 мл каждого из растворов добавляют по 0,5 мл раствора йода и затем разбавленную щелочь (одинаковое число капель) до обесцвечивания смеси. Отмечают время добавления щелочи и ставят обе пробирки в штатив.

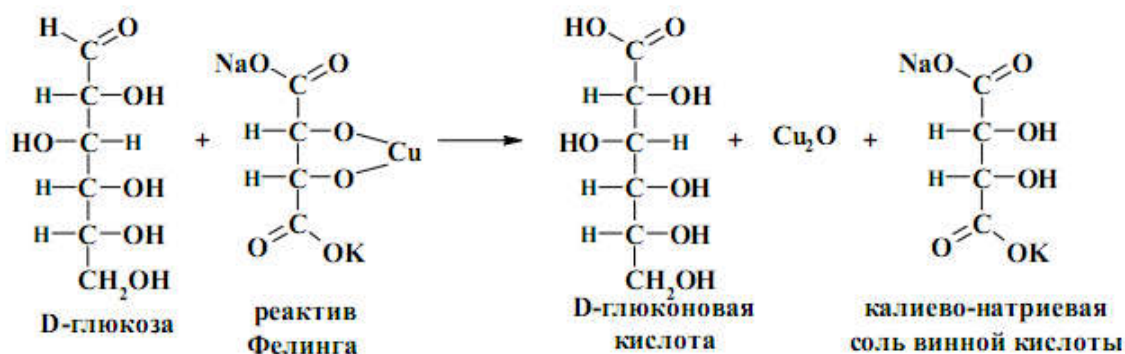
Через 7-8 минут приливают в обе пробирки по 0,5 мл разбавленной серной кислоты и сравнивают появляющуюся окраску.

12.15. ДЕЙСТВИЕ НА УГЛЕВОДЫ РЕАКТИВА ФЕЛИНГА

В присутствии восстановителей после нагревания осаждается оксид или гидроксид меди(I); цвет осадка от желтого до красного, иногда зеленого в зависимости от степени дисперсности и размера его частиц.

Аналогично реагируют кетозы (последние в щелочной среде легко изомеризуются в альдозы), многоатомные фенолы, фенилгидразин и др. органические производные гидразина, а также гидразиды карбоновых кислот.

Кетоны (за исключением кето-спиртов), одноатомные фенолы и большинство ароматических альдегидов не восстанавливают реактив Фелинга. Для обнаружения углеводов иногда используют так называемый нейтральный реактив Фелинга, который вместо NaOH содержит Na_2CO_3 .



При добавлении к осадку гидроксида меди (II) раствора, содержащего глюкозу, осадок сначала растворяется, затем при нагревании раствор приобретает окраску от бурой до желто-оранжевой.

Ход работы

Пронумеровать 3 пробирки. В 1-ю налить 1 мл раствора глюкозы, во 2-ю 1 мл раствора формалина, в 3-ю 1 мл воды. В каждую пробирку добавить 1 мл реактива Фелинга. Нагреть все пробирки и сделайте выводы.

12.16. РЕАКЦИЯ БИАЛЯ (ОТКРЫТИЕ ПЕНТОЗ)

Пентозы в кислой среде образуют фурфурол, который конденсируется с орцином в присутствии следов хлорида железа (III).

Ход работы

В 125 мл 25%-ной соляной кислоты растворяют 0,25 г орцина и добавляют 5 капель хлорида железа (III). Около 5 мл 0,1%-ного раствора пентозы смешивают с двойным объемом реактива, приготовленного описанным способом, и кипятят 1—2 мин. Появляется сине-зеленая окраска, которая извлекается амиловым спиртом. Глюкоза, галактоза и фруктоза дают коричневое окрашивание.

12.17. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ ВО ФРУКТАХ И ЯГОДАХ

С помощью реакции восстановления гидроксидом меди $\text{Cu}(\text{OH})_2$ проверяют наличие глюкозы в виноградном соке, меде, в спелых яблоках и т.п.

12.18. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АРГИНИНА И ФРУКТОЗЫ

Аргинин взаимодействует с карбонильным кислородом молекулы фруктозы как α -аминогруппой, так и гуанидиновой группой. При этом раствор в пробирке, где находилась смесь аргинина и фруктозы, приобретает красно-бурый оттенок. Реакцию ведут в растворе борной кислоты для предупреждения осмоления фруктозы, которое маскирует сахароаминную реакцию.

Ход работы

В две пробирки берут по 2 мл 5% раствора фруктозы в 2,5% растворе борной кислоты и прибавляют в первую из них 2 мл 3% раствора аргинина, а во вторую 2 мл дистиллированной воды. В третью пробирку берут 2 мл 3% раствора аргинина и 2 мл 2,5% раствора борной кислоты. Ставят пробирки на несколько минут в кипящую водяную баню. Отмечают различие во времени появления окраски и ее интенсивности в каждой из проб.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какие моносахариды вам известны. Напишите их формулы.
2. Перечислите виды изомерии моносахаридов.
3. Укажите качественные реакции на открытие альдоз и кетоз. Напишите в структурном виде известные вам реакции на примере глюкозы.
4. В реакцию какого типа вступают моносахариды с аммиачным раствором оксида серебра? Является ли данная реакция качественной, как она называется?
5. Наличие какой функциональной группы в молекуле моносахарида обеспечивает протекание данной реакции? Что окисляется, а что восстанавливается в результате данного процесса?
6. В какой таутомерной форме моносахариды вступают в данную реакцию?
7. К какому типу окислителей относится реактив Фелинга? Ион какого металла является действующим началом реактива Фелинга?
8. В реакцию какого типа вступают моносахариды с реактивом Фелинга? Наличие какой функциональной группы в молекуле моносахарида способствует протеканию данной реакции? Что окисляется, а что восстанавливается в результате данного процесса?
9. Является ли взаимодействие с реактивом Фелинга качественной реакцией? На какую функциональную группу?
10. Что является действующим началом реактива Селиванова? Расщепление каких моносахаридов (фруктозы или глюкозы) идет быстрее под действием реактива Селиванова? Является ли взаимодействие с реактивом Селиванова качественной реакцией на кетозы и, в частности, на фруктозу? Можно ли по глубине окраски раствора количественно определять кетозы (при использовании равных количеств реактива

Селиванова)? Напишите уравнение реакции получения гидроксида меди (II).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13.

ЛИПИДЫ. ВЫДЕЛЕНИЕ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Научиться выделять и идентифицировать липиды.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Запасные липиды широко распространены в природе. В растениях они синтезируются в наиболее высоких концентрациях в семенах растений. Семена подсолнечника, хлопчатника, сои, льна и других культур, отличающиеся высокой массовой долей липидов, являются масличным сырьем и служат для промышленного получения растительных масел.

1. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА

1.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА В ЖЕЛТКЕ КУРИНОГО ЯЙЦА

Лецитины, относящиеся к группе фосфолипидов, не растворяются в воде и ацетоне, но хорошо растворяются в спирте, эфире, хлороформе.

В сухую пробирку вносят 10 капель ацетона и 2 капли спиртового раствора лецитина (в стакан помещают половину куриного желтка и, помешивая, прибавляют 40 мл горячего спирта, раствор охлаждают и фильтруют в сухую пробирку). Выпадает белый осадок. В другую пробирку прибавляют к 10 каплям лецитина несколько капель дистиллированной воды до образования устойчивой эмульсии.

1.2. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЛЕЦИТИН С ХЛОРИДОМ КАДМИЯ

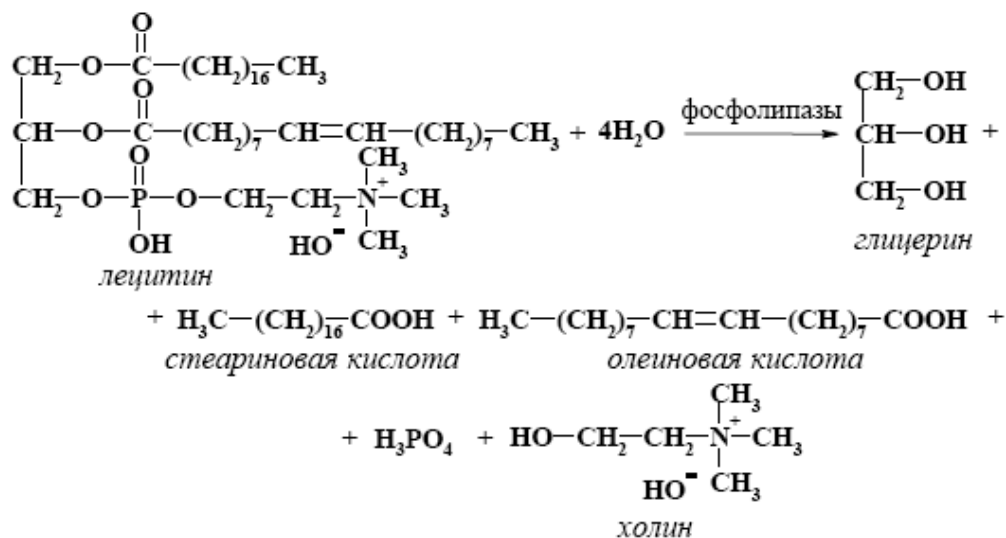
Эту реакцию не дают растворы холестерина и растительных масел.

Ход работы

К 2—3 мл спиртового раствора лецитина, полученного в предыдущем опыте, добавляют 1 мл насыщенного спиртового раствора хлорида кадмия. Выпадает белый хлопьевидный осадок комплексного соединения лецитина с хлоридом кадмия.

2. ГИДРОЛИЗ ЛЕЦИТИНОВ И ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА

В результате гидролиза лецитин под действием фосфолипаз А, В, С, Д распадается на составные части: жирные кислоты, холин, глицерин и фосфорную кислоту. В растворе устанавливают их наличие.



2.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛИНА

К 1–2 мл спиртового экстракта желтка добавляют равный объем 10 %-го раствора NaOH и кипятят 5–10 мин. При нагревании ощущается запах селедочного рассола, характерный для триметиламина, образующегося из холина.

2.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Полученный гидролизат разбавляют небольшим количеством воды и подкисляют 10 %-м раствором HCl. Выпадает осадок свободных жирных кислот, который отфильтровывают, фильтрат нейтрализуют 10 %-м раствором щелочи и упаривают на

водяной бане досуха.

2.3. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИЦЕРИНА

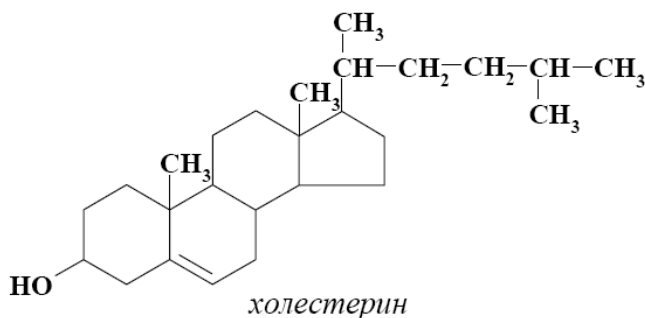
Часть сухого остатка смешивают с несколькими кристаллами KHSO_4 и нагревают. При этом ощущается резкий запах акролеина, образовавшегося из глицерина.

2.4. ОБНАРУЖЕНИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

Другую часть сухого остатка сплавляют в тигле с небольшим количеством KNO_3 и Na_2CO_3 . К охлажденному сплаву приливают 2 мл конц. HNO_3 и растирают палочкой, раствор сливают в пробирку и нагревают с небольшим избытком молибденовокислого аммония (5–6 мл). При охлаждении образуется желтый кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

3. ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В МОЗГУ

Холестерин относится к группе стероидов. Он не растворим в воде, но легко экстрагируется из клеток органическими растворителями – хлороформом, эфиром, бензолом или горячим спиртом.



По химической природе холестерин является циклическим ненасыщенным вторичным спиртом. В основе реакций лежит его способность образовывать окрашенные соединения в присутствии серной кислоты и уксусного ангидрида.

Ход работы

3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА

Тщательно растирают в фарфоровой ступке 3–5 г мозга с двумя частями гипса до однородной массы. Размазывают лопаткой густую массу тонким слоем по стеклянной пластинке и высушивают в сушильном шкафу при 60 °С. Сухую массу счищают ножом в сухую ступку, растирают сухим пестиком и переносят в большую сухую пробирку. Полученный порошок заливают 5–6 мл хлороформа и содержимое пробирки взбалтывают в течение 10 минут. Фильтруют содержимое пробирки в сухую пробирку через фильтр, смоченный хлороформом. С полученным фильтратом ставят качественные реакции.

3.2. РЕАКЦИЯ САЛЬКОВСКОГО

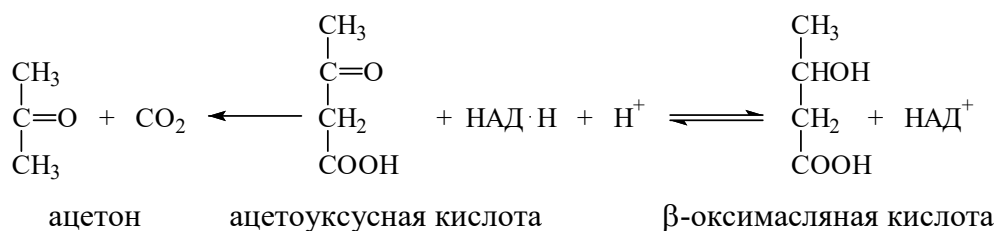
К 2–3 мл хлороформного раствора холестерина приливают 2–3 мл концентрированной серной кислоты и жидкость осторожно перемешивают. Когда жидкость отстаивается, верхний хлороформный слой оказывается окрашенным в красный цвет, нижний – в желто-красный цвет с зеленой флуоресценцией.

3.3. РЕАКЦИЯ ЛИБЕРМАННА—БУРХАРДА

К 2–3 мл хлороформного раствора холестерина приливают 10 капель уксусного ангидрида и 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Жидкость хорошо взбалтывают и наблюдают образование сначала красной, затем синей и, наконец, синезеленой окраски. При незначительных количествах холестерина в растворе может сразу появиться зеленая окраска.

4. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА

Кетоновые тела – общее название для продуктов обмена липидов у животных: ацетоуксусной, β -оксимасляной кислот и ацетона.



Ацетон и ацетоуксусная кислота образуют с нитропруссидом натрия в щелочной среде комплексное соединение розово-фиолетовой окраски. Интенсивность окраски зависит от количества кетоновых тел в реакции.

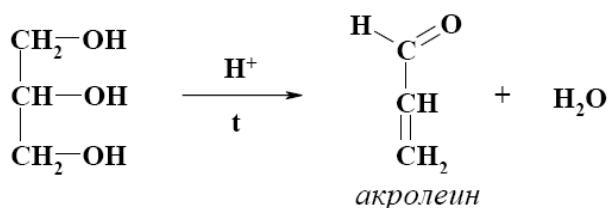
Ход работы

На стекло наносят 0,1-0,2 г порошка нитропрусида натрия, прибавляют 2-3 капли молока и выдерживают 5 минут. Появление розово-фиолетовой окраски указывает на положительный результат. Минимальный уровень кетоновых тел, дающий положительную реакцию, равен 10 мг/100 мл (10 мг%). Скорость развития окраски и ее интенсивность пропорциональны концентрации кетоновых тел в исследуемой пробе: если фиолетовое окрашивание возникает немедленно - содержание 50-80 мг% и более; если оно появляется через 1 минуту - в пробе содержится 30-50 мг%; развитие слабой окраски через 3 минуты свидетельствует о присутствии 10-30 мг% кетоновых тел.

5. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИЦЕРИНСОДЕРЖАЩИХ ЛИПИДОВ.

АКРОЛЕИНОВАЯ ПРОБА

Образование акролеина определяют по характерному запаху образующегося альдегида (запах горелого сала). При нагревании глицерина с гидросульфатом калия идет реакция дегидратации, в результате которой глицерин превращается в акролеин:



Ход работы

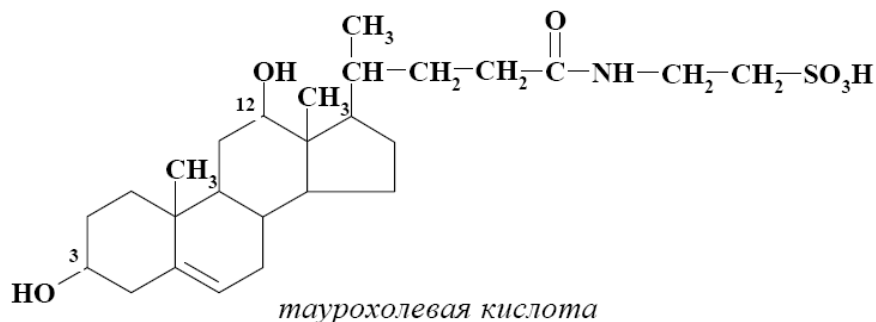
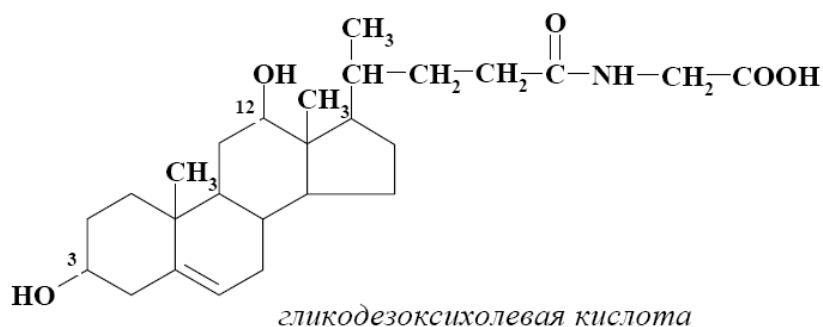
На дно двух пробирок поместить несколько кристалликов гидросульфата калия. В 1-ю пробирку добавить 5 капель растительного масла, во 2-ю 5 капель глицерина. Обе пробирки нагреть.

Обнаружить акролеин можно при внесении в пары фильтровальной бумаги, смоченной аммиачным раствором серебра. Бумага при этом темнеет.

6. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ (РЕАКЦИЯ ПЕТЕНКОФФЕРА)

Желчные кислоты образуются в печени и выделяются с желчью в свободном виде или в виде парных соединений с гликоколом или таурином. Желчные кислоты являются поверхностно-активными веществами и принимают участие в эмульгировании жиров, снижая поверхностное натяжение жировых капель, а также в активировании липазы и всасывании жирных кислот.

Проба основана на образовании окрашенного продукта при взаимодействии желчных кислот и оксиметилфурфурола. Последний образуется из сахарозы при действии концентрированной серной кислоты.



Ход работы

В пробирку наливают 10 капель концентрированной серной кислоты и осторожно наливают равный объем желчи, смешанной в отдельной пробирке с 1 каплей свежеприготовленного раствора сахара. На границе раздела жидкостей образуется осадок желчных кислот и появляется красновато-фиолетовое кольцо. При осторожном смешивании обеих жидкостей, так чтобы не происходило саморазогревание выше 70 °С, жидкость принимает вишнево-красную окраску, которая при взбалтывании на воздухе быстро темнеет и приобретает пурпурный цвет.

Окраска обусловлена взаимодействием холевой кислоты с оксиметилфурфуролом, образующимся из тростникового сахара под действием серной кислоты. Надо избегать избытка сахара и нагревания выше 70 °С; так как может наступить обугливание, затемняющее окраску.

7. ОБНАРУЖЕНИЕ СТЕРОЛОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАСЛЕ

Ход работы

В сухую пробирку вносят 2 капли подсолнечного масла, 20 капель хлороформа. Добавляют 20 капель смеси серной кислоты с формалином и взбалтывают. Раствор разделяется на два слоя: хлороформный (вишневого цвета) и серной кислоты (красно-коричневого цвета с зеленой флуоресценцией). Из верхнего хлороформного слоя отбирают 5-6 капель в сухую пробирку, добавляют 1-2 капли уксусного ангидрида и наблюдают появление синего окрашивания, переходящего в зеленое.

8. ДЕМОНСТРАЦИЯ КИСЛЫХ СВОЙСТВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Соли жирных кислот благодаря отрицательному заряду своих карбоксильных групп способны связываться с основными красителями с образованием комплексов, растворимых в органических растворителях.

Ход работы

В пробирку наливают 10 капель раствора солей жирных кислот, добавляют 10 капель 0,5% раствора метиленовой сини и 1 мл хлороформа. Встряхивают. В присутствии жирных кислот хлороформный слой окрашивается в синий цвет.

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ В СМЕСИ ЛИПИДОВ

Холинсодержащие фосфолипиды, имеющие четвертичный атом азота, проявляют свойства сильных органических оснований, поэтому они способны связывать красители (бромтимоловый синий, бромфеноловый синий), имеющие отрицательный заряд за счет сульфогруппы. Образовавшийся гидрофобный комплекс экстрагируется органическими

растворителями. Остальные фосфолипиды (фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, кардиолипиды), у которых нет четвертичного атома азота, с этими красителями не соединяются.

Ход работы

К 1 мл 0,2% раствора смеси липидов приливают 1 мл 0,1% раствора бромтимолового синего с $\text{pH}=8$, 2мл хлороформа и перемешивают переворачиванием пробирки, не допуская образования пены, на протяжении 30 секунд. Оставляют пробирку на несколько минут для расслаивания. В присутствии холинсодержащих фосфолипидов хлороформный слой окрашивается в желтый цвет.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные свойства лецитина.
2. С помощью каких реакций можно обнаружить холестерин?
3. Объясните эмульгирующее действие липидов.
4. Какой фрагмента в молекуле жира обеспечивает протекание реакции присоединения брома?
5. Какие соединения дают похожую качественную реакцию? К какому классу органических веществ они относятся?
6. Определение понятия "липиды".
7. Биологическая роль липидов.
8. На чем основа классификация липидов?
9. От чего зависит жирнокислотный состав ацилглицеринов?
10. Простые липиды - жиры, воски и стероиды, общая характеристика.
11. Сложные липиды - фосфолипиды и гликолипиды, характеристика.
12. Триглицериды и их структура и разнообразие в природе.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №14. ЛИПИДЫ, ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить химические свойства липидов, выявить их способность к омылению.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

В растениях обнаружено свыше 200 различных жирных кислот. Главные жирные кислоты: пальмитиновая $\text{C}_{16:0}$, стеариновая $\text{C}_{18:0}$, олеиновая $\text{C}_{18:1}$, линолевая $\text{C}_{18:2}$ и линоленовая $\text{C}_{18:3}$ - это насыщенные или ненасыщенные монокарбоновые кислоты с алифатической неразветвленной цепью, с четным числом углеродных атомов. В результате щелочного гидролиза, называемого омылением, получают глицерин и мыла. Мыла способны эмульгировать нерастворимые в воде масла и жиры. Углеводородные радикалы мыла при этом встраиваются в капли жира, а полярные - взаимодействуют с водой. Таким образом, мыла формируют гидрофильную оболочку вокруг капель жира, образуя мелкодисперсную смесь с водой или эмульсию.

1. ПОЛУЧЕНИЕ НАТРИЕВОГО ТВЕРДОГО МЫЛА

В щелочной среде образуются мыла – соли высших жирных кислот (натриевые – твердые, калиевые – жидкие).

1.1. ПОЛУЧЕНИЕ МЫЛА ИЗ ЖИРА

Ход работы

6 г навески липидов помещают в фарфоровый стакан и расплавляют массу на открытом огне. Готовят раствор гидроксида натрия (2,5 г щелочи в 6 мл воды и 15 мл этилового спирта). При перемешивании полученный раствор щелочи добавляют тонкой струей к расплавленному жиру. Смесь кипятят 10-15 мин. и добавляют 10-15 мл насыщенного раствора хлорида натрия и охлаждают в бане с водой. Образующийся поверхностный слой мыла извлекают из стакана, высушивают фильтровальной бумагой и взвешивают. Рассчитывают выход мыла на взятую навеску жира.

Проверить мыло на наличие глицерина. Для этого добавить по каплям

концентрированную соляную кислоту до нейтральной pH. Профильтровать и провести качественную реакцию на глицерин, используя растворы сульфата меди и щелочи.

1.2. ПОЛУЧЕНИЕ МЫЛА ИЗ СТЕАРИНА

Нагреть в выпаривательной чашке смесь карбоната натрия и воды (1:1). Добавить расплавленный стеарин с горящей свечи. Перемешать. Вспенившуюся массу выложить на стеклянную пластинку и охладить. Рассчитывают выход мыла на взятую навеску стеарина.

1.3. ПОЛУЧЕНИЕ МЫЛА ИЗ ВОСКА

В фарфоровую чашку добавить 15 мл концентрированного раствора гидроксида натрия и 5 г воска. Смесь нагреть до слабого кипения при постоянном перемешивании. Подливать в смесь воду по мере уменьшения объема до первоначального уровня. Через 20-30 мин. в смесь добавить 25 мл горячего раствора хлорида натрия. Смесь встряхнуть, дать отстояться. При охлаждении всплывает мыло.

Рассчитывают выход мыла на взятую навеску воска.

2. ПОЛУЧЕНИЕ КАЛИЕВОГО ЖИДКОГО МЫЛА

В небольшую фарфоровую чашечку поместите 0,5 мл растительного (желательно касторового) масла и 10 капель 50% спиртового раствора едкого калия. Стеклопалочкой хорошенько размешайте щелочь с маслом до получения однородной эмульсии. Затем поставьте чашечку на электрическую печь и при незначительном подогревании продолжайте помешивать, пока не получится однородная, прозрачная, слегка желтоватая жидкость. Затем добавьте дистиллированной воды до объема 10 мл и тщательно перемешайте. Получится раствор жидкого мыла.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ТВЕРДОМ МЫЛЕ

Ход работы

Взвесить 3 г твердого мыла. Нарезать тонкими полосками и поместить в стакан на 100 мл. Добавить 25 мл воды и нагреть на электроплитке до растворения. Добавить 5 мл соляной кислоты и нагреть до образования масляного слоя при постоянном перемешивании. Охладить массу, отделить жир фильтрованием. Полученные ЖК взвесить и вычислить их процентное содержание в образце по формуле:

$$\omega_{\text{ЖК}} = \frac{m_{\text{ЖК}}}{m_{\text{мыла}}} \cdot 100\%$$

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ЖИДКОМ МЫЛЕ

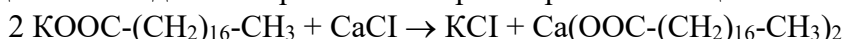
Ход работы

В пробирку с 2 мл раствора калиевого мыла добавить 0,5 мл концентрированной соляной кислоты. Образуются жирные кислоты нерастворимые в воде. Они будут собираться в верхней части пробирки. Отделить жир фильтрованием. Полученные ЖК взвесить и вычислить их процентное содержание в образце по формуле представленной выше.

5. ОБРАЗОВАНИЕ НЕРАСТВОРИМЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ МЫЛ

Ход работы

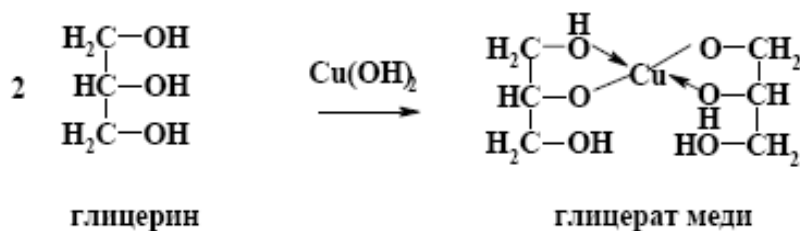
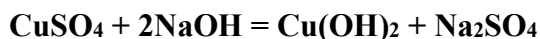
В пробирку с 1 мл раствора калиевого мыла добавить 1 мл раствора хлорида кальция. Наблюдается образование нерастворимых кальциевых мыл.



6. ГИДРОЛИЗ МЫЛА

В сухую пробирку налить 1 мл спиртового раствора мыла и прибавить несколько капель спиртового раствора фенолфталеина. Полученный бесцветный раствор мыла, содержащий фенолфталеин, осторожно по стенке прилить в пробирку с водой. На границе раздела слоев воды и мыла появляется кольцо малинового цвета.

7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА ЖИРА



Ход работы

Внесите в пробирку 2 капли 2н раствора сульфата меди CuSO_4 и 4 капли 2н раствора гидроксида натрия NaOH , тщательно перемешайте. Одну каплю полученного гидроксида меди (II) Cu(OH)_2 перенесите в другую пробирку и добавьте несколько капель раствора из нижнего слоя реакционной массы, полученной после гидролиза жира, смесь тщательно перемешайте.

Если в пробирке с мылом нет раствора, а образовалась густая однородная масса, то добавьте еще насыщенного раствора хлорида натрия NaCl , перемешайте стеклянной палочкой и отберите образовавшийся нижний водный слой для проведения качественной реакции.

Как изменилась окраска реакционной массы? С чем это связано?

8. МОЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ МЫЛА

Мыло обладает свойством эмульгировать жиры и суспензировать твердые частички грязи.

Ход работы

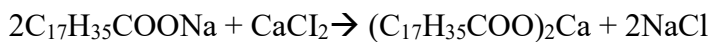
1) Готовят раствор мыла в воде и прибавляют к нему 1 мл растительного масла. Смесь сильно взбалтывают до образования эмульсии, похожей на молоко. В другой пробирке подобным способом получают эмульсию из таких же количеств чистой воды и масла. Хотя во второй пробирке эмульсия была получена позднее, она быстро расслаивается на воду и масло. В первой же пробирке эмульсия оказывается устойчивой и не разделяется в течение часа.

2) В двух разных пробирках готовят суспензию сажи в воде и в мыльном растворе. Фильтруют растворы одновременно через бумажные фильтры. В первом случае фильтруется чистая вода, во втором случае мыльный раствор настолько сильно удерживает сажу, что суспензия, не разделяясь, проходит через фильтр.

Моющее действие мыла проявится еще более ярко, если фильтр с осадком сажи перевернуть на другую сторону, снова вложить в воронку и сперва пропустить через него воду, а затем мыльный раствор. Вода проходит прозрачной и не смывает сажу, мыльный же раствор совершенно очищает фильтр от сажи, становясь черным.

9. ДЕЙСТВИЕ ЖЕСТКОЙ ВОДЫ НА МЫЛО

В жесткой воде мыло не дает пены и плохо мылит, так как превращается в нерастворимые в воде соли:



Хлопья нерастворимого мыла можно часто наблюдать при получении мыльного раствора в домашних условиях.

Опыт показывает, что при пользовании жесткой водой большое количество мыла расходуется на осаждение кальциевых (и магниевых) солей и что только после их осаждения мыло, как поверхностно-активное вещество (ПАВ) начинает выполнять свою основную функцию — давать пену. Чтобы сделать воду «мягкой» и не расходовать мыло нерационально, соли кальция, как известно, осаждают предварительно кипячением или с помощью специальных добавок, например соды.

Ход работы

1) Раствор мыла в воде разливают в две пробирки. В одну из пробирок добавляют

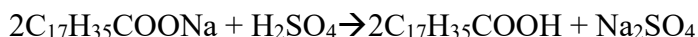
небольшое количество раствора хлорида кальция CaCl_2 . При встряхивании пробирок в одной из них наблюдают образование пены, в другой — отсутствие пены и образование осадка соли кальция.

2) В один цилиндр наливают около 50 мл дистиллированной воды, в другой такой же цилиндр — 50 мл водопроводной воды (если водопроводная вода очень «мягкая», в нее добавляют немного раствора хлорида кальция). В оба цилиндра приливают по 1 мл спиртового раствора мыла и встряхивают. В первом случае образуется устойчивая пена. Во втором пены нет, но образуется осадок нерастворимой соли.

Во второй цилиндр продолжают добавлять раствор мыла до тех пор, пока при встряхивании не будет получаться исчезающая пена. По количеству затраченного раствора мыла можно приблизительно судить о степени жесткости воды.

10. ПОЛУЧЕНИЕ СТЕАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ МЫЛА

Стеариновая кислота, как кислота слабая, может быть получена действием минеральной кислоты на мыло:



Как вещество не растворимое в воде, стеариновая кислота при этом выделяется из раствора. Таким способом в случае необходимости можно получить некоторое количество кислоты для занятий.

Ход работы

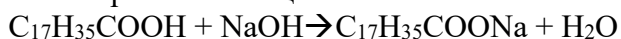
В химическом стаканчике при нагревании готовят крепкий раствор мыла в воде. Для более быстрого растворения мыло должно быть предварительно нарезано в виде тонких стружек. Продолжая нагревать раствор мыла, прибавляют к нему раствор серной кислоты до выделения стеариновой кислоты. При охлаждении раствора 1 сверху образуется твердый слой стеариновой кислоты.

11. СВОЙСТВА СТЕАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Стеариновая кислота в воде нерастворима, поэтому для опытов, иллюстрирующих ее кислотные свойства, нельзя, как обычно, воспользоваться водным раствором.

Ход работы

1) В пробирке растворяют кусочек стеарина в органическом растворителе (эфир, хлороформ, бензол) и к полученному раствору добавляют 2 капли спиртового раствора фенолфталеина. Затем вносят 1—2 капли разбавленного раствора гидроксида натрия и встряхивают пробирку. Розовой окраски раствора не наблюдается, так как стеариновая кислота нейтрализовала щелочь:



При дальнейшем прибавлении щелочи к раствору кислоты розовая окраска появляется после того, как кислота будет нейтрализована.

Добавляя щелочь к эфиру с фенолфталеином без стеариновой кислоты, наблюдают моментальное появление окраски.

2) В пробирку со спиртом добавляют 2—3 капли щелочи и 1-2 капли фенолфталеина и к полученной смеси при перемешивании прибавляют эфирный раствор стеариновой кислоты или даже твердый стеарин. При этом происходит обесцвечивание раствора вследствие нейтрализации щелочи.

12. СТЕАРИНОВАЯ КИСЛОТА — КИСЛОТА СЛАБАЯ

О силе стеариновой кислоты можно судить по гидролизу ее солей, например стеарата натрия $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COONa}$.

Ход работы

1) Растворяют в воде тонкие стружки простого мыла и добавляют спиртовой раствор фенолфталеина. Появление розовой окраски говорит о том, что стеариновая кислота — кислота слабая. Параллельно может быть испытан фенолфталеином водный раствор ацетата натрия. В этом случае розовая окраска если и появляется, то очень слабая, так как уксусная кислота сильнее стеариновой.

2) В цилиндр до половины наливают воду, а затем по стенке осторожно прибавляют

небольшое количество спиртового раствора мыла с фенолфталеином. В спиртовом растворе гидролиз соли не происходит и розовая окраска не наблюдается. На границе же соприкосновения спиртового раствора соли с водой появляется розовое кольцо.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Химические свойства липидов.
2. Какое строение имеют продукты кислотного и щелочного гидролиза жира? Назовите их. В чем отличие?
3. С какой целью в промышленности используют щелочной гидролиз жира?
4. Что такое мыло? Какие мыла Вы знаете?
5. Обведите и подпишите на структурной формуле гидрофильную и гидрофобную части молекулы мыла.
6. Какое соединение входит в состав всех триглицеридов? К какому классу веществ оно относится?

6 семестр

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 15. ОСНОВЫ БИОЭНЕРГЕТИКИ. МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОКИСЛИТЕЛЬНО- ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ СИСТЕМ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить реакции, лежащие в основе окисления субстратов, состав и последовательность ферментов дыхательной цепи.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Дегидразы – ферменты, способствующие окислению веществ отнятием водорода, который далее передается акцепторам водорода. Примером дегидраз является сукциндегидраза мышц. Для ее получения мясо гомогенизируют и многократно промывают водой, настаивая затем в течение часа в 0,9 % растворе NaCl.

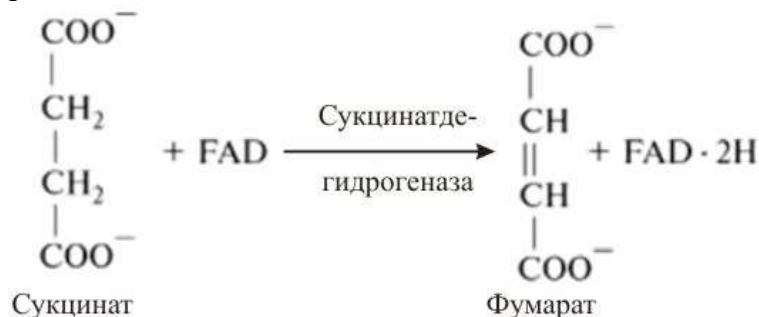
1.1. ИССЛЕДОВАНИЕ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ

Приготовление тканевого гомогената

2г ткани тщательно измельчить, хорошо растереть в ступке, добавив щепотку стеклянного порошка, добавить постепенно 20 мл дистиллированной воды, отфильтровать через марлю, отжать. Содержимое марли перенести в пробирку и суспендировать стеклянной палочкой с 8 мл воды. 2 мл полученного гомогената перелить в другую пробирку и прокипятить. Охладить и использовать содержимое пробирок для опытов

1.1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЫШЦ

Сукцинатдегидрогеназа (КФ 1.3.99.2) катализирует превращение янтарной кислоты в фумаровую. Кофактором фермента является ФАД. Фермент прочно связан с внутренней мембраной митохондрий.

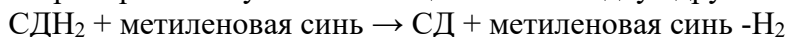


Ход работы

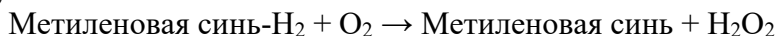
В 3 нумерованных пробирки помещают 3-4 мл мышечной кашицы и добавляют в первую – 1 мл 3 % раствора янтарной кислоты, нейтрализованной по лакмусу 10% раствором едкого натра; во вторую – 1 мл дистиллированной воды; в 3-ю 1 мл 3% яблочной кислоты.

В каждую пробирку добавляют 2-3 капли 0,02 % раствора метиленовой сини (до

окрашивания смеси в голубой цвет), которая играет роль акцептора водорода. Содержимое пробирок перемешивают, и пробирки одновременно помещают в термостат при температуре 37 °С. Через 20-25 мин наблюдают обесцвечивание метиленовой сини в первой пробирке и отсутствие обесцвечивания в двух других.



Первую пробирку сильно взбалтывают, после обесцвечивания появляется вновь синее окрашивание, вследствие окисления лейкооснования метиленовой сини кислородом воздуха.



1.1.2. КОНКУРЕНТНОЕ ТОРМОЖЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ МЫШЦ

Сукцинатдегидрогеназная активность тормозится в присутствии малоновой кислоты вследствие близости ее структуры к таковой янтарной кислоты и происходящей вследствие этого конкуренции за фермент.

Ход работы

Навеску свежей мышцы массой 1 – 2 г растирают в ступке с небольшим количеством воды. Полученную кашу переносят на двойной слой марли, помещенной на воронку и промывают 50 мл воды. Промытую кашу отжимают, переносят в пробирку и суспендируют стеклянной палочкой в 4 мл воды. Полученную суспензию равномерно разливают в 4 пробирки и добавляют реактивы согласно табличным данным. Во все пробирки добавляют по 2-3 капли 1%-ного раствора метиленового синего и после перемешивания по 3-4 капли вазелинового масла. Пробирки ставят в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через 3-5 мин наблюдается изменения окраски в пробирках.

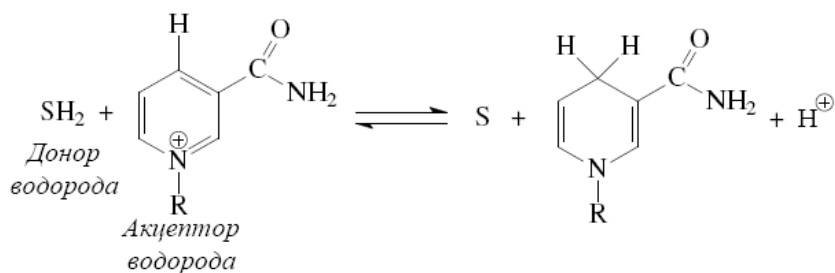
Полученные результаты внести в таблицу.

Таблица. Торможение активности СДГ

Пробирка	Сукцинат, мл	Вода, мл	Малонат, мл	Окраска	Вывод
Кипяченая	1	0,5	—		
Суспензия	1	0,5	—		
Суспензия	—	1,5	—		
Суспензия	1	—	0,5		

1.2. ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

В печени содержатся ферменты, при участии которых происходит фосфорилиз гликогена и дальнейшее превращение его до стадии образования фосфоглицериновой кислоты. Этот процесс может протекать в атмосфере азота и в атмосфере кислорода в присутствии фторида натрия. Если процесс протекает в атмосфере азота, в среде накапливается НАДН·Н⁺. Если процесс превращения гликогена происходит в атмосфере кислорода, то образовавшийся НАДН·Н⁺ окисляется при участии ферментов митохондриальной дыхательной цепи с образованием НАД и Н₂О. При окислении НАДН·Н⁺ образуются 3 молекулы АТФ.



Убыль минерального фосфата под влиянием ферментов, содержащихся в печени, в атмосфере кислорода протекает более интенсивно, чем в атмосфере азота.

Ход работы

На весах взвешивают навеску печени, записывают ее вес, затем помещают печень в

фарфоровую ступку, стоящую на льду. Печень измельчают ножницами, добавляют немного битого стекла и растирают пестиком до получения однородной массы. После этого постепенно добавляют М/30 фосфатный буфер с рН 8,2 в количестве, равном весу печени. Содержимое ступки продолжают размешивать пестиком и добавляют 2 капли 1% раствора фтористого натрия. Полученную массу оставляют на несколько минут в ступке, чтобы осело стекло, затем часть вытяжки сливают в стеклянный стаканчик, стоящий на льду.

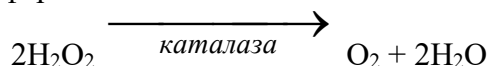
В 4 пробирки с притертыми пробками отмеривают при помощи шприца без иглы по 10 капель вытяжки из печени, приливают туда по 10 капель М/30 фосфатного буфера с рН 8,2, по 5 капель 1% раствора крахмала и добавляют по 1 капле фторида натрия. В 2 пробирки (контрольные) добавляют по 10 капель 5% раствора трихлоруксусной кислоты для денатурации ферментов. Помещают в штатив одну контрольную и одну опытную пробирки и пропускают через них кислород в течение 5 минут. В другой штатив также помещают контрольную и опытную пробирки и пропускают через них азот в течение 5 минут. Все четыре пробирки закрывают притертыми пробками и помещают в термостат при 38° на 30 минут. После этого в опытные пробирки добавляют по 10 капель 5% раствора трихлоруксусной кислоты и перемешивают. Содержимое всех пробирок фильтруют в чистые пронумерованные пробирки через влажные бумажные фильтры, помещенные в воронки. В пробирках с фильтрами проводят цветную реакцию на фосфор: добавляют в каждую пробирку по 10 капель молибдата (смесь равных объемов 2,5% раствора молибденовокислого аммония и 5N раствора серной кислоты) и 5 капель смеси растворов эйконогена и сульфата натрия. Помещают пробирки в термостат на 10 минут. Наблюдают развитие синей окраски, получаемой в результате реакции неорганического фосфата с молибденовым реактивом. Сравнивают визуально интенсивность окраски в контрольных и опытных пробирках, термостатировавшихся в атмосфере кислорода и в атмосфере азота. Отмечают, в какой из опытных пробирок более интенсивно произошла эстерификация неорганического фосфата — в атмосфере кислорода или в атмосфере азота.

Сделайте выводы.

Примечание. При отсутствии эйконогена его можно заменить 1% раствором гиохинона 0,5 мл и 2 мл карбонатсульфитной смесью следующего состава: 40 г безводного карбоната натрия в 200 мл воды и 7,5 г сульфита натрия в 50 мл воды с последующим смешиванием растворов.

1.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ КАТАЛАЗЫ КРОВИ

Каталаза катализирует разложение перекиси водорода на молекулярный кислород и воду. По химической природе каталаза является геминферментом, так как в состав простетической группы этого фермента входит гем:



Каталаза содержится во всех тканях и жидкостях организма. Биологическая роль каталазы заключается в обезвреживании перекиси водорода путем разложения ее на воду и молекулярный кислород. Перекись водорода может образоваться в организме во время течения окислительно-восстановительных процессов.

Ход работы

В пробирку наливают 10—15 капель 1% раствора перекиси водорода и добавляют каплю крови. Жидкость вспенивается, так как происходит бурное выделение пузырьков кислорода. Результаты опыта заносятся в таблицу.

Таблица. Исследование действия каталазы крови

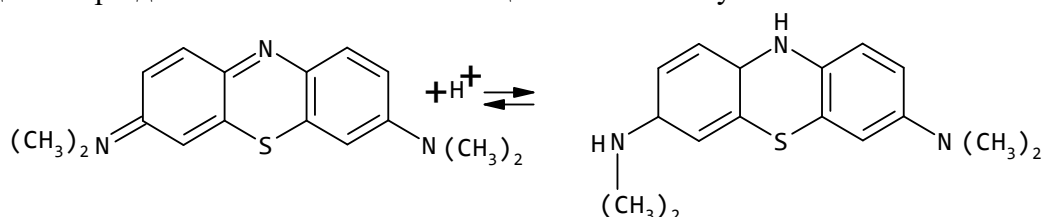
№ п/п	Ферменты	Субстрат	Реакция, катализируемая ферментом	Выявление действия ферментов

МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОКИСЛИТЕЛЬНО-

В живых организмах наиболее важными донорами электронов служат атомы водорода органических молекул. При помощи переносчиков электронов, имеющих промежуточный потенциал, осуществляется сложная последовательность реакций тканевого дыхания. Склонность к участию в окислительно-восстановительных реакциях может быть определена путем потенциометрических измерений, сводящихся к определению электродвижущей силы цепи, которая составлена из химически инертного электрода, погруженного в исследуемую редокс-систему, и электрода сравнения.

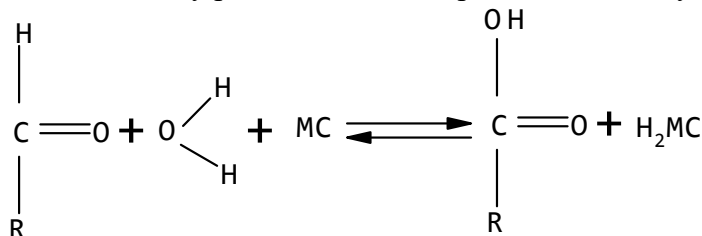
2. МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ «ВНУТРЕННЕГО ДЫХАНИЯ»

Метиленовая синь вступает в химическое взаимодействие с атомарным водородом, образующимся при действии металлического цинка на кислоту:



Продуктом этой реакции является бесцветное соединение - лейкометиленовая синь, которая под действием ионов-окислителей (Fe^{3+}) может вновь превращаться в исходный продукт. В результате этой реакции дегидрирования отнятый от молекулы лейкометиленовой сини водород соединяется с кислородом, образуя воду. Помимо ионов-окислителей аналогичное действие на лейкометиленовую синь оказывают и кислород воздуха и щелочная среда. В последнем случае, процесс дегидрирования идет значительно быстрее.

Глюкоза, инвертный сахар, смесь фруктозы и глюкозы также обладают способностью восстанавливать метиленовую синь до лейкометиленовой сини. Восстановителем в молекуле глюкозы является ее альдегидная группа —CHO , которая в процессе этой реакции окисляется до карбоксильной группы —COOH . Причем окисление молекулы глюкозы происходит не за счет кислорода воздуха, а за счет кислорода воды. При этом наряду с окислением молекулы глюкозы происходит процесс восстановления метиленовой сини. Схематически эту реакцию можно представить следующим образом:



Здесь MC — метиленовая синь.

Восстановленная метиленовая синь уже способна непосредственно вступать во взаимодействие с кислородом воздуха. При этом отнятый от ее молекулы водород соединяется с кислородом, образуя воду. Присоединение кислорода к углеводам осуществляется через промежуточную окислительно-восстановительную систему метиленовая синь - лейкометиленовая синь. Подобные процессы, только значительно более сложные, протекают в живой клетке, осуществляя так называемое «внутреннее дыхание».

Ход работы

Растворяют 5 г сахара в 50 мл дистиллированной воды, прибавляют к раствору 1 мл концентрированной азотной кислоты и выдерживают этот раствор в течение 30 мин при температуре 50-55 °С. Подготовленный таким способом инвертный сахар обладает сильными восстановительными свойствами.

В стеклянную пробирку наливают 0,1% раствор метиленовой сини, прибавляют к нему на кончике скальпеля цинковой пыли, подкисляют раствор несколькими каплями

концентрированной уксусной кислоты.

Раствор метиленовой сини, имеющий ярко-голубой цвет, после прибавления к нему цинковой пыли и уксусной кислоты быстро обесцвечивается. Обесцвечившийся раствор метиленовой сини фильтруют через бумажный фильтр в три одинаковые стеклянные пробирки. В первую прибавляют несколько капель раствора FeCl_3 или азотной кислоты. Во вторую ничего не добавляют, ее лишь энергично встряхивают. В третью пробирку прибавляют небольшое количество гидроксида натрия и также сильно встряхивают.

После добавления к исследуемому раствору FeCl_3 или HNO_3 голубая окраска, свойственная метиленовой сини, полностью восстанавливается. Причем этот процесс проходит очень быстро. Значительно медленнее происходит восстановление окраски раствора во второй пробирке, несколько быстрее - в третьей. При встряхивании щелочной раствор (пробирка № 3) восстанавливает свою голубую окраску быстрее, чем кислотный (пробирка № 2).

Смешивают в пробирке одинаковые объемы растворов метиленовой сини и инвертного сахара, добавляют к смеси несколько капель едкого натра и оставляют ее на некоторое время в покое.

Через некоторое время раствор, имеющий голубую окраску, обесцвечивается. Полностью обесцвечившийся раствор сильно встряхивают и вновь оставляют в покое.

После энергичного встряхивания раствор вновь приобретает голубую окраску, которая при дальнейшем стоянии пробирки постепенно исчезает. Этот процесс может быть повторен многократно.

2.1 СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛОВ РИБОФЛАВИНА И МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО

Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы, измеренные при pH 7, обозначаются E'_0 . Окислительно-восстановительный потенциал является величиной, пропорциональной изменению свободной энергии. Вещество с большим окислительно-восстановительным потенциалом (с учетом алгебраического знака) окисляет вещество с меньшим окислительно-восстановительным потенциалом. Т.е. редокс-потенциалы являются мерой способности молекул обмениваться электронами.

Помимо потенциометрического измерения часто используют колориметрический метод, наблюдая изменение окраски специальных редокс-индикаторов в испытуемом растворе. Обычно в восстановленном состоянии эти индикаторы бесцветны, а в окисленном обладают определенной окраской. Причем для каждого индикатора зона перехода связана с характерной для него величиной E'_0 .

Ход работы

В пробирку наливают 5-6 капель воды, 1 каплю взвеси рибофлавина и добавляют по каплям раствор метиленового синего до появления синего или зеленовато-синего окрашивания смеси.

Бросают в окрашенную смесь кусочек цинка и капают 1 каплю концентрированной соляной кислоты. Выделяющийся водород начинает снижать редокс-потенциал системы, происходит восстановление метиленового синего и рибофлавина. Восстановление первого из них происходит быстрее, поэтому цвет смеси становится сначала зеленым, затем зеленовато-желтым и наконец бледно-желтым или розоватым.

Слабо окрашенную жидкость сливают в другую пробирку и наблюдают за изменением цвета. Водород более не образуется, а остаток его уходит в воздух. Восстановленная форма рибофлавина через метиленовый синий передает электроны и ионы водорода на кислород воздуха и раствор желтеет. После этого происходит окисление лейкометиленового синего, и содержимое пробирки меняет цвет через зеленый в синий.

Записать результаты опыта и составить схему переноса водорода (электронов и ионов водорода) с учетом стандартных окислительно-восстановительных потенциалов использованных компонентов.

2.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ ЛИМОННОКИСЛОГО ЦИКЛА

Непосредственному дегидрированию в организме под влиянием дегидрогеназ подвергаются многие субстраты. Наиболее важными среди них являются изолимонная, α -кетоглутаровая, янтарная (сукцинат), яблочная кислоты, участвующие в цитратном цикле (цикле трикарбоновых кислот или цикле Кребса). Отщепленный от субстратов водород (протоны и электроны) передается при помощи комплекса ферментов тканевого дыхания в конечном итоге на кислород. Изолимонная кислота окисляется при дегидрировании и декарбоксилировании в α -кетоглутаровую кислоту, а янтарная — в фумаровую.

При исследовании каталитического действия дегидрогеназы изолимонной кислоты (изоцитратдегидрогеназы) в качестве субстрата используют лимонную кислоту, которая изомеризуется в изолимонную под влиянием фермента аконитатгидратазы (КФ 4.2.1.3), содержащейся в тканевой кашице наряду с другими ферментами цикла трикарбоновых кислот.

Ход работы

В три пронумерованные пробирки вносят шпателем равные количества мышечной кашицы 0,2 г.

В первую пробирку добавляют 10 капель раствора цитрата натрия, во вторую — сукцината натрия, а в третью (контрольную) — 10 капель раствора сульфосалициловой кислоты. Если между кусочками мышцы остались пузырьки воздуха, их удаляют стеклянной палочкой.

В каждую пробирку добавляют по капле раствора метиленовой сини и по 10 капель вазелинового масла. Вазелиновое масло покрывает поверхность раствора, благодаря чему создаются анаэробные условия и тем самым предотвращается окисление восстановленных соединений кислородом воздуха.

Пробирку помещают в термостат или водяную баню при 37°C. Отмечают постепенное обесцвечивание метиленовой сини в пробирках с раствором цитрата и сукцината. В контрольной пробе метиленовая синь не обесцвечивается, т.к. фермент был инактивирован сульфосалициловой кислотой.

Результаты практических работ по обнаружению действия дегидрогеназы молока и дегидрогеназ лимонного цикла занести в таблицу.

Таблица. Обнаружение дегидрогеназ лимоннокислого цикла

Источн ик фермен та	Ферм ент	Субстр ат	Реакция катализируе мая ферментом	Акцепт ор водород а	Восстановление метиленовой сини	
					Не инактивированный фермент	Инактивированный фермент

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Разобщение окисления и фосфорилирования.
2. Сопряжение биологического окисления с фосфорилированием.
3. Сопряжение и разобщение биологического окисления и дыхания.
4. Что такое митохондриальное окисление?
5. Митохондрии, их строение и функции. Локализация окислительного фосфорилирования в клетке.
6. Ингибиторы ферментов дыхательной цепи.
7. Эволюция представлений о биологическом окислении.
8. Назовите коферменты окислительно-восстановительных ферментов. Напишите их формулы в окисленной и восстановленной формах.
9. Цепь биологического окисления.
10. Сколько АТФ образуется по нормальному и сокращенному пути окисления?
11. Что такое окислительное фосфорилирование?
12. Хемиостатическая теория.

13. Роль фермента сукцинатдегидрогеназы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №16. МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ

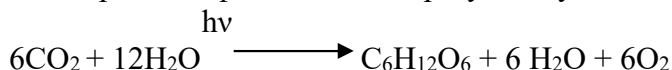
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть процессы катаболизма и анаболизма глюкозы.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Происходящий за счет световой энергии процесс усвоения углекислого газа зелеными растениями и образование органического вещества получил название фотосинтеза. Синтез крахмала протекает двухступенчато. Вначале синтезируется амилоза как более простой компонент крахмала. Затем часть амилозы используется для синтеза амилопектина.

1. ОБРАЗОВАНИЕ КРАХМАЛА В ПРОЦЕССЕ ФОТОСИНТЕЗА

При освещении листа в процессе фотосинтеза образуются углеводы.



Ход работы

Черенок листа опускают в воду, а поверхность листа на 40 мин, закрывают темной пленкой. Лист помещают под колпак, внутри которого расположен стаканчик с раствором бикарбоната натрия; добавляют небольшое количество серной кислоты для выделения CO_2 и насыщения им пространства под колпаком.

Открытую часть листа освещают лампой дневного света 60 мин. Лист погружают на 2 мин. в кипящую дистиллированную воду и затем на 10 мин в горячий спирт. После отмывания от спирта водой лист помещают в стаканчик с раствором йода в йодистом калии.

В освещенной половине листа наблюдают темно-синее окрашивание, а затемненная половина остается неокрашенной.

2. ОБНАРУЖЕНИЕ КРАХМАЛА В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ

Крахмал может быть обнаружен только в зеленых листьях растений.

Ход работы

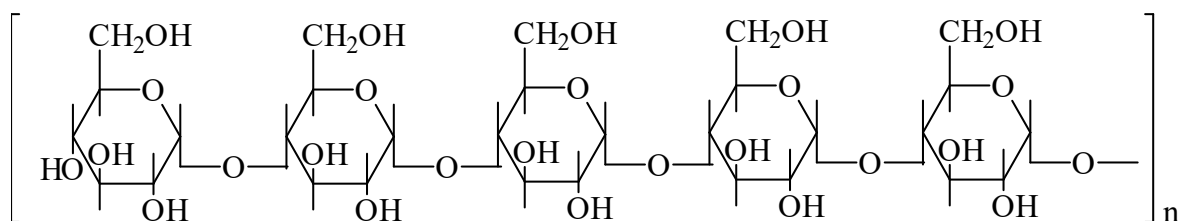
В две пронумерованные пробирки помещают: в первую - зеленый лист растения, во вторую - желтый. В обе пробирки наливают по 1 мл дистиллированной воды и содержимое кипятят 2 - 3 мин.

Горячую воду сливают и в пробирки наливают по 1 мл этилового спирта. Пробирки кипятят на водяной бане 3 - 5 мин при ежеминутном встряхивании. Хлорофилл зеленого листа и ксантофилл - желтого переходят в спирт, а листья обесцвечиваются. Окрашенный спирт сливают, а листья в пробирках заливают новыми порциями спирта и нагревают еще раз в течение 3 - 5 мин.

Спирт сливают, листья промывают несколько раз дистиллированной водой. Затем в каждую пробирку наливают 3 - 4 мл дистиллированной воды и кипятят на водяной бане для размягчения тканей листа.

Через 5 - 7 мин воду сливают, листья помещают на фильтровальную бумагу и наносят на них несколько капель раствора йода. Наблюдают появление синих точек, а затем посинение всего листа при наличии крахмала.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА В МЯКОТИ ПЛОДОВ И В КОРНЕПЛОДАХ



Ход работы

После размельчения проб отвешивают навески по 10 г мякоти тыквы (для петрушки, сельдерея навески увеличить), помещают в сосуд, приливают 9 см³ воды и размельчают в

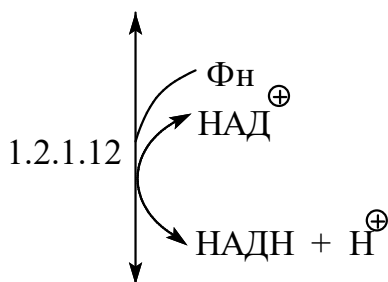
течение 5 минут. Полученную суспензию переливают в колбу на 200 см³ для клейстеризации крахмала, кипятят 5 минут с обратным холодильником. После охлаждения набирают 5 см³ пробы в пробирку и прибавляют 5 капель 0,3% раствора йода. Интенсивность появившейся окраски зависит от содержания и состава крахмала. Образцы, содержащие в свежей мякоти около 1 % крахмала, дают светло-голубую окраску, 2%-светло-синюю, 2,5%-синее окрашивание, 3,5%-темно-синее окрашивание. Окраска образцов, содержащих более 4,5% крахмала, трудно различима на глаз.

4. ОБНАРУЖЕНИЕ ФОСФОГЛИЦЕРИНОВОГО АЛЬДЕГИДА

3-фосфоглицериновый альдегид в ходе анаэробного превращения глюкозы дегидрогеназой 3-фосфоглицеринового альдегида окисляется в 1,3-дифосфоглицериновую кислоту.



3-Фосфоглицериновый альдегид



1,3-Дифосфоглицериновая кислота

При этом происходит восстановление НАД, который можно обнаружить по восстановлению метиленового синего в лейкосоединение.

Ход работы

В пробирку вносят кусочек дрожжей (величиной с горошину), несколько капель раствора глюкозы, растирают содержимое стеклянной палочкой до получения равномерной взвеси. Добавляют каплю раствора метиленового голубого, перемешивают содержимое пробирки стеклянной палочкой.

Ставят пробирку в штатив и наблюдают обесцвечивание метиленового синего, начинающееся со дна пробирки.

5. ОБНАРУЖЕНИЕ ЭТАНОЛА

Лактоза молока при гидролизе образует β-галактозу и β-глюкозу (в отчете запишите схему гидролиза). Глюкоза под влиянием ферментов дрожжей может сбраживаться – окисляться до этилового спирта и оксида углерода (IV):



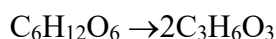
Ход работы

Для открытия этанола кефир и молочную сыворотку фильтруют. В пробирки наливают по 5 капель фильтрата кефира и молочной сыворотки и добавляют по 5 капель 10 %-го раствора гидроксида натрия, а также несколько капель 1 %-го раствора йода в 2 %-м йодиде калия.



6. ОБНАРУЖЕНИЕ МОЛОЧНОЙ КИСЛОТЫ

При хранении молока происходит накопление в нем молочной кислоты. Молочная кислота образуется в результате молочнокислого брожения глюкозы, образовавшейся при гидролизе лактозы, присутствующей в молоке:

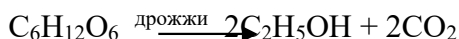


Ход работы

Прокисшее молоко фильтруют. С помощью универсального индикатора определяют среду фильтрата. В чистую пробирку приливают 3–5 капли раствора фенола и 2–3 капли раствора хлорида железа (III). К образовавшемуся раствору фенолята железа (III) синевато-фиолетового цвета добавляют по каплям полученный фильтрат кислого молока до изменения первоначальной окраски раствора.

7. ПРОБА НА БРОЖЕНИЕ

Некоторые моносахариды под влиянием ферментов различных микроорганизмов испытывают разнообразные разложения, известные под названием брожения. Так, глюкоза при действии обыкновенных дрожжей распадается на винный спирт и углекислый газ по схеме:



Образующийся в результате брожения углекислый газ накапливается в трубке и распознается по поглощению его щелочью. Присутствие в трубке этилового спирта обнаруживается с помощью реакции получения йодоформа:



Процессы брожения сахаров имеют большое технологическое значение в виноделии, пивоварении, производстве уксуса и т.п.

Ход работы

Растереть 1 г дрожжей в ступке с 5 мл дистиллированной воды, и полученную массу смыть в стакан 30 мл дистиллированной воды.

Тщательно перемешать содержимое стакана и добавить в него около 1 мл 1% виннокаменной кислоты (до яснокислой реакции на лакмус).

Налить содержимое стакана в трубку для брожения таким образом, чтобы закрытое колено трубки было заполнено, а в широкой части имелось некоторое количество жидкости. Заполненная таким образом трубка будет служить контролем, так как сами дрожжи могут содержать в себе некоторое количество сбраживаемых сахаров.

Далее 1 г дрожжей растереть в ступке с 5 мл исследуемого раствора глюкозы и полученную массу смыть в стакан 36 мл исследуемого раствора глюкозы. Тщательно перемешать содержимое стакана и добавить в него 1% , виннокаменной кислоты (до яснокислой реакции на лакмус). Налить вышеописанным способом содержимое стакана в другую трубку для брожения. Поставить на 2-3 часа обе наполненные трубки в термостат при 30-35°C.

Через 2-3 часа вынуть обе трубки для брожения из термостата, и если дрожжи активны и сами не содержат сбраживаемых сахаров, то наблюдают отсутствие образования газа (или появление ничтожного пузырька газа) в закрытом колене первой трубки и накопление газа в закрытом колене второй трубки (с глюкозой).

Чтобы убедиться в том, что образовавшийся во второй трубке газ есть CO₂, поступают так. В широкую часть трубки для брожения осторожно прибавляют 10% раствор едкого натра до края, плотно закрывают отверстие трубки подушечкой большого пальца и трубку несколько раз переворачивают. Углекислый газ поглощается щелочью, образуется вакуум; и мякоть палец присасывается к отверстию прибора.

Для обнаружения этилового спирта во второй трубке поступают так. Из бродильной трубки отфильтровывают в пробирку небольшое количество (3-4 мл) жидкости. К фильтрату добавляют 2-3 капли раствора йода и по каплям 10% едкого натра до обесцвечивания окрашивания от йода. Через некоторое время ощущается характерный запах йодоформа.

8. КИСЛОТНЫЙ ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА

Распад крахмала происходит до стадии образования декстринов.

Ход работы

В большую пробирку с пипеткой помещают 1 мл 0,1 % раствора крахмала и 20

капель 2 н раствора серной кислоты. Нагреть на водяной бане в течение 10 мин, отбирая пипеткой каждые 2 мин в маленькие пробирки 3 - 4 капли гидролизата и добавляя в них по 1 капле йода. Обратить внимание на изменение окраски гидролизата с йодом в ходе гидролиза. К последней пробе в большой пробирке добавить 2 капли 2 н раствора сульфата меди, а затем добавлять по каплям 2 н раствора гидроксида натрия до образования растворимого темно-синего соединения. Далее полученный раствор нагреть (реакция Троммера). Появляется желто-красное окрашивание (положительная реакция Троммера). По результатам реакций сделать заключение о строении крахмала.

ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА ФЕРМЕНТАМИ ЖКТ

Различные ферменты в разной степени гидролизуют крахмал.

Ход работы

В три пробирки отмерить по 3 мл 0,5 % раствора крахмала. В 1-ю пробирку добавить 1 мл воды, во 2-ю - 1 мл желудочного сока, в 3-ю - 1мл вытяжки из поджелудочной железы (5 % раствор панкреатина). Из всех трех пробирок взять по 1 капле на стекло и сделать йодную пробу. Пробирки поместить в термостат при температуре 37 °С. Через каждые 5 мин проводить йодную пробу. Через 30 мин с содержимым трех пробирок сделать пробу Фелинга. Результаты занести в таблицу.

Таблица. Гидролиз крахмала

№	Добавляемая жидкость	Окраска с йодом, мин							Реакция Фелинга
		0	5	10	15	20	25	30	
1	Вода								
2	Пепсин								
3	Панкреатин								

ГИДРОЛИЗ КРАХМАЛА альфа-АМИЛАЗОЙ СЛЮНЫ

α -Амилаза слюны относится к классу гидролаз. Специфическими субстратами α -амилазы являются полисахариды крахмал и гликоген. Для исследования действия α -амилазы слюны в качестве субстрата берут крахмал. Нерасщепленный крахмал образует с йодом комплекс синего цвета и не обладает восстановительной способностью, так как почти не имеет свободных альдегидных групп. α -Амилаза гидролизует α -1,4-глюкановые связи в крахмале, гликогене и олигосахаридах, которые разрываются без определенного порядка. И мальтоза и глюкоза имеют свободные альдегидные группы, вследствие чего они обладают восстановительной способностью и открываются пробой Троммера.

Ход работы

К 5—10 каплям 1% раствора крахмала добавляют 1—2 капли раствора йода в йодистом калии и убеждаются в том, что крахмал с йодом дает синее окрашивание.

Заготавливают 8—10 пробирок, куда наливают по 1—3 капли раствора йода в йодистом калии.

В две другие пробирки помещают приблизительно по 5 мл раствора крахмала. В одну из них добавляют около 3 мл дистиллированной воды (контрольный опыт), а в другую—около 3 мл разбавленной слюны (основной опыт). Содержимое обеих пробирок перемешивают стеклянной палочкой и ставят пробирки в термостат при 37°С или держат в зажатой кисти руки. Замечают время.

Через несколько секунд (5—7) из контрольного и основного опытов отливают по несколько капель жидкости в пробирки с раствором йода в йодистом калии и наблюдают окрашивание. Отбор проб и реакцию с раствором йода производят несколько раз через короткие интервалы. Сначала синее окрашивание будет появляться от проб, взятых из обеих пробирок; затем из пробирки, где есть амилаза, проба жидкости начнет давать с йодом красно-бурое окрашивание. Вскоре отмечают, что пробы жидкости из пробирки слюной окрашивания с йодом более не дают. Эти различные окраски от йода указывают на то, что идет постепенный гидролиз крахмала с образованием декстринов. Когда последняя проба жидкости, взятая из пробирки со слюной, не изменит желтого цвета

раствора йода, гидролиз считают завершенным и записывают время его окончания.

Пробы, взятые из контрольного опыта, все время дают синее окрашивание, что свидетельствует о том, что в отсутствие гидролиз крахмала не происходит.

С частью растворов основного и контрольного опытов производят пробу Троммера. С раствором из пробирки со слюной проба Троммера будет положительная, вследствие образования конечных продуктов ферментативного гидролиза крахмала. Раствор контрольного опыта пробу Троммера не дает. Наблюдают, что в пробирке с основным опытом опалесценция раствора процессе гидролиза исчезает.

Рекомендации к составлению протокола

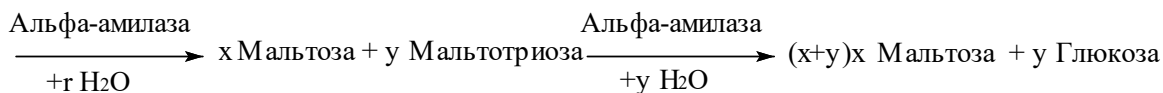
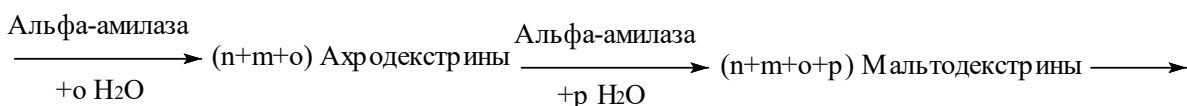
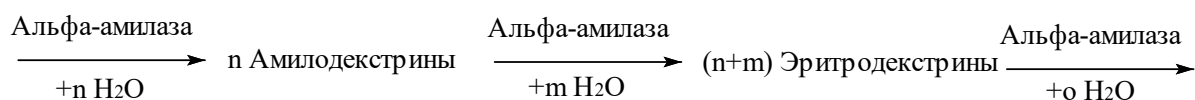
Результаты работы записать в таблицу. В выводах обратить внимание на то, что гидролиз крахмала под влиянием α -амилазы идет постепенно, через промежуточные продукты, при температуре тела или близкой к ней, в течение короткого времени. Обосновать, почему конечные продукты гидролиза дают положительную реакцию Троммера.

Таблица. Гидролиз крахмала альфа-амилазой слюны

Название субстрата и продуктов гидролиза	Окраска с йодом	Время, затраченное на гидролиз	Температурные условия гидролиза	Реакция Троммера

ИССЛЕДОВАНИЕ СТЕПЕНИ ГИДРОЛИЗА КРАХМАЛА

Слюна и другие пищеварительные соки животных и человека, являются концентрированными растворами ферментов. При гидролизе крахмала образуются последовательно промежуточные продукты: амилодекстрины (дают синее или фиолетовое окрашивание с йодом), эритродекстрины (красно-бурое окрашивание с йодом), ахродекстрины (не дают окрашивания с йодом), мальтодекстрины (не дают окрашивания с йодом). В качестве конечного продукта гидролиза под действием α -амилазы образуется смесь дисахарида мальтозы и моносахарида глюкозы.



В таблице приведены продукты гидролиза крахмала, их названия и окраски с йодом.

Таблица. Продукты гидролиза крахмала

Крахмал и продукты его гидролиза	Молекулярная масса продуктов гидролиза	Окраска с раствором Люголя
Крахмал	1 млн. и более	Синяя
Амилодекстрины	10 тыс.	Фиолетовая
Эритродекстрины	От 6 до 4 тыс.	Красно-коричневая
Ахродекстрины	3700	Оранжевая
Мальтодекстрины	1000	Желтая
Мальтоза	342	Светло-желтая

Ход работы

Хорошо прополоскать ротовую полость, вымыть пробирку проточной водой,

набрать в рот 2-3 мл раствора с массовой долей хлорида натрия 1 % и держать 4-5 мин. Полученный таким образом раствор слюны собирают в пробирку и используют как раствор α -амилазы.

Для обнаружения амилазы в слюне и определения её активности, из полученного раствора отливают около 1 мл во вторую чистую пробирку и приливают двойной объем 1 % раствора крахмала и содержимое перемешивают путем плавного одноразового переворачивания пробирки, закрыв её пальцем. Смесь фермента с субстратом инкубируют в термостате при температуре 37-38 °С в течении 10 мин.

По истечении указанного времени наличие фермента и его активность определяют пробой с йодом: в пробирку вносят 1-2 капли раствора Люголя (по 1 капли на 1 мл содержимого) и встряхивают. По окраске появившейся в пробирке можно сделать вывод о продуктах реакции и активности фермента.

По результатам реакции сделать вывод о глубине гидролиза и активности ферментов.

ГИДРОЛИЗ КЛЕТЧАТКИ ДО ГЛЮКОЗЫ

Одним из характерных и практически важных свойств клетчатки как представителя полисахаридов является ее гидролиз до более простых продуктов.

Конечным продуктом гидролиза клетчатки, как и крахмала, является глюкоза:
 $(C_6H_{12}O_6)_n + nH_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6$

Гидролиз клетчатки также катализируется минеральными кислотами.

В настоящее время в промышленности гидролизом клетчатки (преимущественно древесины) и последующим сбраживанием образующейся глюкозы получают этиловый спирт и другие продукты.

Опыты по гидролизу могут ставиться с различной полнотой: от констатации наличия глюкозы в гидролизате до извлечения глюкозы в твердом виде.

Ход работы

а) В ступке смачивают кусочек чистой фильтровальной бумаги или ваты концентрированной серной кислотой и растирают пестиком. Полученный раствор переносят в демонстрационную пробирку или химический стакан с небольшим количеством воды (2-3 мл) и кипятят в течение 5 мин. После этого часть раствора нейтрализуют щелочью и нагревают с фелинговой жидкостью. Образование красного оксида меди (I) указывает на появление глюкозы.

Параллельно можно провести контрольный опыт: кипятить столько же времени фильтровальную бумагу или вату с водой без кислоты. При последующем нагревании этой жидкости с фелинговым раствором осадок оксида меди (I) не образуется.

б) Для демонстрации процесса гидролиза клетчатки можно воспользоваться древесными опилками. Этот опыт будет поучительнее предыдущего, так как с большим приближением иллюстрирует современное гидролизное производство.

1—2 г древесных опилок смачивают в химическом стакане водой, прибавляют 2—3 мл концентрированной серной кислоты, затем 30—50 мл воды и кипятят 8—10 мин. После этого часть еще горячего раствора фильтруют через складчатый фильтр, фильтрат нейтрализуют щелочью и нагревают с фелинговым раствором. Образуется красный оксид меди (I).

Параллельно может быть поставлен опыт нагревания опилок с водой без кислоты. Получающийся в этом случае раствор не дает с фелинговой жидкостью оксид меди (I).

в) К 1-1,5 г древесных опилок в колбе прибавляют 14 мл серной кислоты (6 мл воды и 8 мл концентрированной серной кислоты). Смесь встряхивают примерно в течение 10 мин, одновременно прогревая ее немного в пламени спиртовки. Затем к ней приливают 150—200 мл воды, закрывают колбу пробкой с обратным холодильником и кипятят в течение 10-15 мин.

Раствор фильтруют в большую коническую колбу. К фильтрату добавляют небольшими порциями тонко измельченный мел, все время энергично круговыми

движениями перемешивая смесь до тех пор, пока не прекратится выделение углекислого газа (шипение) и лакмусовая бумажка не покажет, что серная кислота нейтрализована:



Раствор фильтруют от обильного осадка сульфата кальция. С помощью фелингова раствора убеждаются в наличии глюкозы в фильтрате. Упаривают раствор в фарфоровой чашке на водяной бане до небольшого объема жидкости.

Сконцентрированный раствор глюкозы выпаривают в фарфоровой чашке на водяной бане. При этом следят за тем, чтобы выделяющийся сахар по возможности не подгорал. На дне чашки по мере испарения воды образуется немного глюкозы, обычно светло-желтого цвета (вследствие частичного разложения органических примесей). Ощущается запах горелого сахара, так как при выпаривании без вакуума не удастся избежать частичного разложения. Растворив полученный продукт в воде и добавив дрожжей, в соответствующих условиях можно наблюдать реакцию брожения (по выделению углекислого газа), что подтверждает образование сахара из древесины.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Гликолиз и гликогенолиз. Уравнения реакций.
2. Энергетический эффект распада глюкозы.
3. Пентозный цикл обмена углеводов.
4. Синтез глюкозы из неуглеводных компонентов?
5. Цикл трикарбоновых кислот.
6. Анаэробный путь обмена углеводов.
7. Обмен пировиноградной кислоты.
8. Окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты.
9. Химизм спиртового и молочнокислого брожения.
10. Напишите световую фазу фотосинтеза.
11. Напишите темновую фазу фотосинтеза

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 17. МЕТАБОЛИЗМ ЛИПИДОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть процессы обмена липидов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

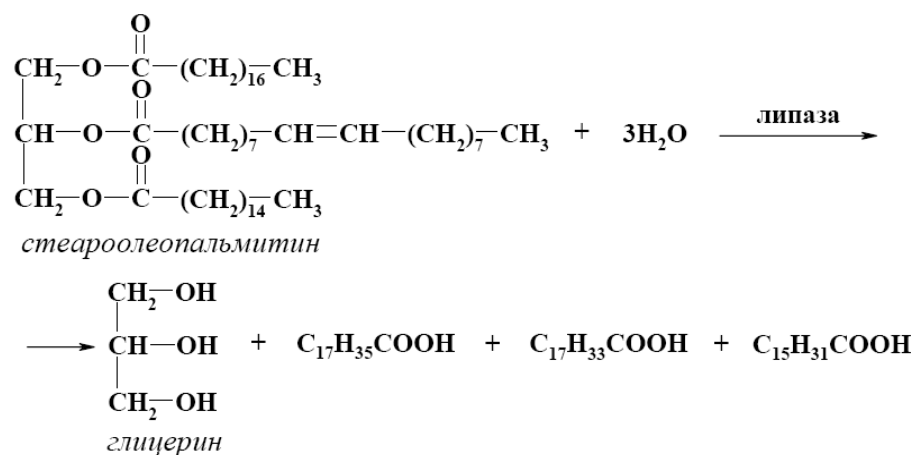
Слюна не содержит расщепляющих липиды ферментов. В полости рта жиры не подвергаются никаким изменениям. В желудочном соке содержится желудочная липаза, однако ее роль в гидролизе пищевых триглицеридов у взрослых невелика, ее содержание крайне низкое и pH желудочного сока далек от оптимума действия этого фермента и в желудке отсутствуют условия для эмульгирования триглицеридов, а липаза может действовать только на триглицериды в форме эмульсии. Поэтому переваривание липидов идет в кишечнике.

1. ПЕРЕВАРИВАНИЕ ЖИРОВ ЛИПАЗОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

Переваривание жиров у человека начинается, хотя и в незначительной степени, в желудке. Главным местом переваривания жиров является двенадцатиперстная кишка. Липаза панкреатического сока выделяется панкреатической железой частично в активном, частично в неактивном состоянии; неактивная липаза при действии желчи переводится в активную форму.

Липаза панкреатического сока проявляет свое действие, как в щелочной среде, так и в нейтральной и кислой средах. В кишечном соке также содержится липаза.

В результате действия липаз жиры присоединяют воду, расщепляясь при этом на глицерин и жирные кислоты.



Гидролиз жиров удобнее всего наблюдать при помощи липазы панкреатического сока. В качестве субстрата лучше всего взять молоко, жир которого, находясь в эмульгированном состоянии, быстро расщепляется на глицерин и жирные кислоты. Последние можно оттитровать щелочью.

Принцип метода. О скорости ферментативного распада можно судить по нарастанию кислотности, что может быть определено путем титрования щелочью. В качестве фермента могут быть использованы препараты поджелудочной железы (препарат панкреатина).

Ход работы

Очищают поджелудочную железу от жира, измельчают и перемешивают ее. Помещают около 5 г измельченной железы в ступку и добавляют около 10 мл водно-глицеринового раствора. С помощью пестика тщательно растирают содержимое ступки в течение 5 минут. Отфильтровывают смесь в пробирку. Фильтрацию удобно вести через полотно; для одного опыта достаточно отфильтровывать 4 мл вытяжки.

Наливают в две пробирки по 2 мл полученной вытяжки. В первую пробирку к 2 мл вытяжки добавляют 2-3 капли желчи для активирования липазы.

Отмеривают с помощью цилиндра в 3 колбы (№1, №2, №3) по 25 мл молока.

Помещают колбы с молоком на 10-15 мин в термостат при 37 °С.

Отмеривают с помощью пипетки в три другие колбы (№4, №5, №6) по 5 мл дистиллированной воды и добавляют в каждую колбу по несколько капель фенолфталеина.

Добавляют, по возможности одновременно, в колбу №1 - 2 мл вытяжки липазы, активированной желчью, в колбу №2 - 2 мл не активированной вытяжки липазы, в колбу №3 - 2 мл разведенного в 5 раз раствора желчи.

Быстро и тщательно перемешивают содержимое каждой колбы.

Быстро отмеривают с помощью пипетки из колбы №1 (с активированной липазой) 5 мл жидкости переносят ее в колбу №4 (с водой и фенолфталеином), из колбы №2 (с не активированной липазой) 5 мл жидкости и переносят ее в колбу №5 (с водой и фенолфталеином), из колбы №3 (с разведенным раствором желчи) 5 мл жидкости и переносят ее в колбу №6 (также, с водой и фенолфталеином).

Колбы №1, №2, №3 вновь ставят в термостат при 37 °С. В процессе гидролитического расщепления жира происходит образование жирных кислот, которые оттитровывают затем 0,1 н раствором NaOH. Содержимое колб №4, №5, №6 оттитровывают 0,1 н щелочью до слабо-розового окрашивания при непрерывном помешивании.

Еще три раза через каждые 15 минут берут из колбы №1, колбы №2 и колбы №3 пробы по 5 мл и помещают соответственно в чистые колбы №4, №5, №6, в которые предварительно должно быть отмерено по 5 мл дистиллированной воды и добавлено по несколько капель фенолфталеина. Отмеренные пробы титруют по вышеуказанному методу.

Сравнивают объемы 0,1 нормальной щелочи, пошедшие на титрование всех трех проб из колбы № 2, всех трех проб из колбы №3 и 4, откладывая их по времени и вычерчивают кривые титрования.

По окончании титрования записать результаты в таблицу.

Таблица. Переваривание жиров липазой поджелудочного сока

№ п/п	Добавленное вещество, мл					Расход NaOH, мл				
	Молоко	Фенол-фталейн	Вода	Панкреатин	Желчь	Продолжительность опыта, мин				
						15	30	45	60	Всего

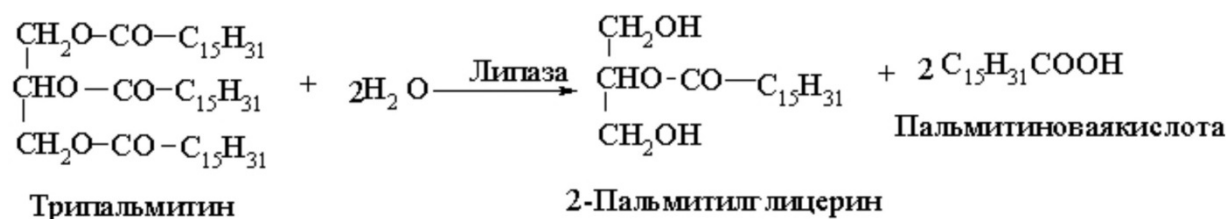
Так как гидролиз идет постепенно, количество освобождающихся инертных кислот нарастает по времени.

Изобразить графически динамику расщепления жира липазой для каждой пробы, откладывая на оси абсцисс время в минутах, а на оси ординат количество 0,1 н. раствора NaOH (в мл), израсходованного на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данное время (15, 30, 45, 60 минут).

На основании хода кривых на графике и полученных данных концентрации карбоксильных групп сделать вывод о зависимости активности липазы от присутствия желчных кислот. Отметить зависимость количества образовавшихся свободных жирных кислот от продолжительности ферментативного действия.

2. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЛИПАЗЫ НА ЛИПИДЫ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В тонкой кишке происходит гидролиз липидов, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой. Существует несколько типов панкреатических липаз. Одни из них специфичны в отношении эфирных связей в α -положении триацилглицерина, а другие гидролизуют связи в β -положении. Полный гидролиз происходит поэтапно: сначала ферментами атакуются α - и α_1 -связи, а затем более медленно гидролизуются β -моноацилглицерины. Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, а также ди- и моноацилглицерины) всасываются и стенки кишечника.



Ход работы

Готовят 2 колбы для опытной и контрольной проб. Для контрольной пробы липазу предварительно кипятят в течение 10 мин на кипящей бане. В каждую колбу наливают молоко и препарат липазы, как указано в таблице.

Таблица. Исследование действия липазы

Компоненты смеси	Опыт, мл	Контроль, мл
Молоко (разведенное в соотношении 1:10)	10	10
Препарат липазы	1	1 (прокипяченный)

Приготовленные инкубационные смеси перемешивают. Затем из каждой колбы отбирают по 1 мл смеси в заранее приготовленные стаканчики для титрования. В каждый стаканчик добавляют 2 капли раствора фенолфталейна и титруют раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания. При первом титровании нейтрализуют органические кислоты - молочная и другие, которые присутствовали в молоке до начала действия липазы.

Оставшуюся в колбах смесь помещают в термостат, температура которого 37 °С, и

через определенные интервалы (10, 20, 30 мин) из каждой пробы отбирают (не вынимая из термостата) по 2 мл смеси и титруют 0,01 моль/л раствором гидроксида натрия. Время титрования и объем израсходованного гидроксида натрия фиксируют в таблице.

Таблица. Результаты титрования

Объем щелочи, пошедшей на титрование, мл	Время инкубации, мин			
	0	10	20	30
Опытная проба				
Контроль				

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результат первого титрования, полученного до начала действия липазы, вычитают из результатов последующих титрований.

На основании полученных данных строят график, где по оси абсцисс откладывают время (в минусах), а по оси ординат - активность липазы, выраженную объемом 0,01 моль/л раствора гидроксида натрия в мл, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени.



В тетрадь записать сделанные выводы.

3. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ

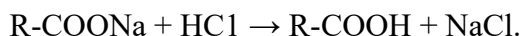
Присутствие желчных кислот можно обнаружить реакцией Петтенкофера. Желчные кислоты дают пурпурное окрашивание с оксиметилфуролом, образующимся из фруктозы в присутствии концентрированной серной кислоты.

Ход работы

На сухое часовое стекло наносят 1 каплю желчи и 1 каплю раствора сахарозы, хорошо перемешивают стеклянной палочкой. Рядом наносят 3 капли концентрированной серной кислоты (стекло не сдвигать с места). Через некоторое время на месте слияния капель наблюдают развитие красного окрашивания, переходящего при стоянии в красно-фиолетовое.

4. РОЛЬ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА В ТРАНСПОРТЕ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В КРОВИ

Опыт заключается в сравнении растворимости свободных жирных кислот и их комплексов с сывороточным альбумином. Комплекс возникает при взаимодействии растворимой натриевой соли высших жирных кислот (мыло) с альбумином. При добавлении соляной кислоты натрий вытесняется и образуются свободные жирные кислоты:



В комплексе с сывороточным альбумином высшие жирные кислоты остаются в растворе, а в отсутствие альбумина выпадают в осадок. Следует избегать избытка соляной кислоты, которая, вызывая денатурацию белка, может нарушить его способность к комплексообразованию.

Ход работы

В две пробирки вносят по 6 капель раствора мыла. В первую добавляют 20 капель сыворотки крови, во вторую – столько же воды. Пробирки слегка встряхивают. В пробирку с добавленной водой вливают по каплям (1—2 капли) 1% раствор соляной кислоты только до появления осадка свободных жирных кислот. В пробирку с сывороткой

крови приливают такое же количество кислоты. Жирные кислоты не выпадают в осадок, так как образуют с сывороточным альбумином комплексное соединение.

Рекомендации к составлению протокола

Результаты исследования записать и обосновать различия в растворимости свободных жирных кислот и их комплексов с альбумином крови, а также указать на значение комплексообразования.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. α - и β -окисление высших жирных кислот.
2. Кетоновые тела, их значение, пути образования.
3. Механизм биосинтеза высших жирных кислот.
4. Механизм биосинтеза кефалина, роль ЦДФ в этом процессе.
5. Механизм биосинтеза лецитина, роль ЦДФ в этом процессе.
6. Механизм биосинтеза триглицеридов.
7. Обмен ацетил-КоА.
8. Обмен триглицеридов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 18. МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Рассмотреть процессы обмена белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Белковый обмен - совокупность превращений белков и продуктов их распада — аминокислот в организмах. Обмен белков отличается от обмена углеводов и липидов рядом особенностей.

1. Очень ярко выраженное деление белков на «свои» и «чужие». Это строго контролируется иммунной и другими системами и нарушение опознания «своих» сопровождается значительными нарушениями функций клеток и органов.

2. Отсутствие «запасных» белков. Если углеводы депонируются в форме гликогена почти всеми клетками, а липиды в форме нейтрального жира адипоцитами, то все белки практически функционально активны и в случае необходимости происходит распад одних менее важных в данный момент и синтез других более важных для данной ситуации белков

3. Необходимость в дополнительных метаболических путях. Белки — основной носитель азота в организме и если углеводородный скелет аминокислот просто вливается в общие метаболические пути, то обмен азота протекает по специфическим путям со своими особенностями превращений и регуляции

1. СТВОРАЖИВАНИЕ МОЛОКА ПЕПСИНОМ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

Под действием нейтрализованной желудочного сока молоко створаживается. Створаживание молока обусловлено способностью пепсина превращать казеиноген молока в казеин, кальциевая соль которого нерастворима в воде.

Ход работы

Берут 4 пробирки. В 1-ю пробирку наливают 2 мл желудочного сока. Во 2-ю 2 мл дистиллированной воды и порошка углекислого кальция до нейтральной реакции на лакмус, жидкость фильтруют. В 3-ю 2 мл желудочного сока с несколькими каплями 0,2 % соляной кислоты. В 4-ю прокипяченного желудочного сока.

Во все пробирки наливают по 10 капель свежего молока и поместить в термостат при температуре 37 °С на 5-10 мин. Отметить изменение окраски.

Результаты занести в таблицу.

Таблица. Створаживание молока пепсином желудочного сока

Субстрат	Фермент	Видимые изменения	Чем обусловлено изменение

2. ПЕРЕВАРИВАНИЕ ФИБРИНА ПЕПСИНОМ

Переваривание белков начинается в желудке под влиянием желудочного сока.

Желудочный сок, выделяемый железами слизистой оболочки стенок желудка, представляет собой жидкость, содержащую 99% воды, свободную соляную кислоту, кислореагирующие фосфаты, хлористый натрий, протеолитический фермент — пепсин, липолитический фермент — липазу (расщепляет только эмульгированный жир) и другие вещества.

Пепсин выделяется главными клетками желез слизистой желудка в виде неактивного профермента — пепсиногена. Под влиянием соляной кислоты от пепсиногена отщепляются полипептиды, в результате чего пепсиноген превращается в активный фермент пепсин, способный к гидролитическому расщеплению пептидных связей белков. Пепсин является эндопептидазой, так как действует преимущественно на внутренние пептидные связи. Однако под влиянием пепсина разрываются также и некоторые пептидные связи, находящиеся на конце полипептидной цепи, что сопровождается появлением свободных аминокислот. В результате гидролиза белков пепсином образуются пептоны — смесь более или менее сложных полипептидов, а также в небольшом количестве свободные аминокислоты.

Ход работы

В одну пробирку наливают 20 капель желудочного сока или 0,1% раствора пепсина в 0,2% соляной кислоте.

В другую пробирку помещают 20 капель желудочного сока или 0,1 % раствора пепсина в 0,2% соляной кислоте, нейтрализованных содой.

В третью пробирку вливают 20 капель желудочного сока или 0,1% раствор пепсина в 0,2% соляной кислоте, предварительно под щелоченных 0,4% раствором NaOH.

В четвертую пробирку закапывают 20 капель желудочного сока или 0,1 % раствора пепсина в 0,2% соляной кислоте, предварительно подвергнутых кипячению.

В пятую пробирку отмеривают 20 капель 0,2% раствора HCl.

Во все пять пробирок добавляют одинаковые небольшие кусочки фибрина, и пробирки помещают в термостат при 38—40°C.

После переваривания (растворения) фибрина в первой пробирке (примерно через 30 минут от начала опыта) все пробирки вынимают из термостата и наблюдают за изменениями фибрина.

Переваривание фибрина в первой пробе указывает на то, что пепсин действует в присутствии соляной кислоты. Фибрин во второй и третьей пробах остается неизменным, так как пепсин в нейтральной и щелочной среде неактивен. В четвертой пробе, где фермент был инактивирован кипячением, и в пятой пробе, в которой пепсина не было, может произойти лишь набухание фибрина под влиянием соляной кислоты.

Содержимое каждой пробирки фильтруют и с фильтратом производят биуретовую реакцию. Положительная реакция обнаруживается только в первой пробе, где был активный пепсин, соляная кислота, фибрин, что указывает на присутствие в фильтрате продуктов переваривания белка. Результаты наблюдений занести в таблицу.

Таблица. Переваривание белков пепсином

№ пробы	Фермент	Субстрат	Реакция среды	Инактивация пепсина кипячением	Видимые изменения фибрина	Биуретовая реакция

В соответствии с полученными данными указать оптимальные условия для переваривания белка пепсином и роль соляной кислоты в этом процессе.

3. ПЕРЕВАРИВАНИЕ БЕЛКА ТРИПСИНОМ

Под действием трипсина происходит гидролитическое расщепление пептонов, а также белков. Гидролиз под действием трипсина идет глубоко до частичного образования некоторых свободных аминокислот (триптофана). Оптимум действия трипсина лежит при слабощелочной реакции pH=8-8,7.

Ход работы

Пронумеровать три пробирки и налить в первую пробирку 4 мл раствора трипсина или панкреатина (щелочная среда), во вторую – 4 мл раствора трипсина или панкреатина, предварительно нейтрализованного соляной кислотой на лакмус, в третью – 4 мл подкисленного раствора трипсина или панкреатина.

Поместить в каждую пробирку по небольшому кусочку фибрина примерно равной величины. Все пробирки с содержимым одновременно поставить в водяную баню при 37°C.

Через 30 мин вынуть пробирки из бани и наблюдать результаты исследования. В первой пробирке должно иметь место растворение фибрина; во 2-й пробирке растворение не наблюдается; в третьей пробирке наблюдается лишь набухание фибрина.

4. КАЧЕСТВЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ АМИЛАЗЫ В ВЫТЯЖКЕ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Амилаза расщепляет 1,4-гликозидную связь крахмала с образованием мальтозы и глюкозы. Промежуточными продуктами гидролиза крахмала могут быть различные декстрины. Степень гидролиза крахмала можно контролировать, используя реакцию с йодом. Второй контрольной пробой может быть реакция Троммера, указывающая на наличие свободных альдегидных групп в мальтозе и глюкозе.

Ход работы

В большую пробирку помещают 2 мл 0,1% раствора крахмала и добавляют 1 мл вытяжки поджелудочной железы. Пробирку оставляют стоять при комнатной температуре, отбирая пипеткой в отдельные пробирки через каждые 2 минуты по 5-6 капель гидролизата и добавляя в них по 1 капле йода. Отметить время пошедшее на изменение окраски в ходе гидролиза. К последней пробе в большой пробирке добавить 5 капель 10% раствора гидроксида натрия, а затем по каплям 2% раствора сульфата меди, пока не прекратится его растворение. Полученный раствор осторожно нагреть. Появление желто-красного окрашивания говорит о положительной реакции Троммера.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ГИДРОЛИЗА БЕЛКА МЕТОДОМ ФОРМОЛЬНОГО ТИТРОВАНИЯ (ПО СЕРЕНСЕНУ)

В организме в процессе переваривания постоянно происходит гидролиз белков. При гидролизе простых белков образуются аминокислоты.

Гидролизаты белка (полученные искусственно, путем нагревания с кислотой или щелочью) применяют в качестве лекарственных препаратов для парентерального питания. Метод формольного титрования позволяет следить за ходом гидролиза белка, изучать действие протеолитических ферментов, а также определять количество белка, например, в молоке.

Количество карбоксильных групп, а, следовательно, и эквивалентное им количество аминокислот, определяют титрованием 0,1 М раствором натрий гидроксида в присутствии формальдегида; формальдегид химически связывает аминокислоты, обладающие основными свойствами, в результате чего раствор делается кислым (из-за наличия у аминокислот и белков карбоксильных групп). Белковый гидролизат получают нагреванием белка с серной кислотой (**выполняется заранее лаборантом**).

Ход работы

Определяют азот аминокислот в 4-х пробах:

- 1) в растворе белка до гидролиза;
- 2) в гидролизате белка, полученного через 10 минут после гидролиза;
- 3) в гидролизате белка, полученного через 40 минут;
- 4) в растворе после полного гидролиза (1 час).

Для этого в колбочку наливают 5мл соответствующего раствора, добавляют 3мл 20% нейтрального раствора формалина и 2-3 капли 1% раствора фенолфталеина. Титруют из бюретки 0,1М раствором натрий гидроксида до образования розового окрашивания.

Проводят расчет степени гидролиза, отнимая от каждого значения титрования количество мл натрий гидроксида, использованное на титрование раствора белка до

гидролиза (1-а проба).

Пример расчета: на титрование 5 мл 1-ой пробы использовали 0,2 мл 0,1 М раствора натрий гидроксида, 2-ой пробы - 1мл, 3-ей пробы – 2 мл, 4-ой пробы – 4 мл. Отнимая от каждого результата титрования количество мл натрий гидроксида, которое использовали на титрование 1-ой пробы (0,2 мл), будем иметь следующие цифры: на титрование второй пробы использовали 0,8 мл; 3-ей пробы -1,8 мл; 4-ой пробы - 3,8 мл. Количество мл натрий гидроксида, которое использовали на титрование 4-ой пробы, составляет 100%. Отсюда степень гидролиза равна:

1) для гидролизата, полученного через 10 минут:

3,8 - 100%

0,8 - X X = 21%

2) для гидролизата, полученного через 40 минут:

3,8 - 100% ;

1,8 - X X=47,4%

6. ДЕЙСТВИЕ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА НА БЕЛОК

Пронумеровать 4 пробирки. В каждую из них налить по 1мл желудочного сока.

Желудочный сок в пробирке №2 предварительно нагреть до кипения и охладить, в пробирке №3 – нейтрализовать 0,5%-ным раствором NaON (3-5 капель).

Во все пробирки добавить небольшое количество приготовленного белка. Хлопья белка куриного яйца, получить при кипячении ½ белка куриного яйца в 0,5 л H₂O.

Пробирки несколько раз встряхнуть и поместить №1-3 на водяную баню при 37 °С; №4 – в стакан со льдом.

Через каждые 8-10 минут содержимое пробирок взбалтывать.

Через 30 минут отметить, какие изменения произошли с белком.

Результаты наблюдения записать в таблицу.

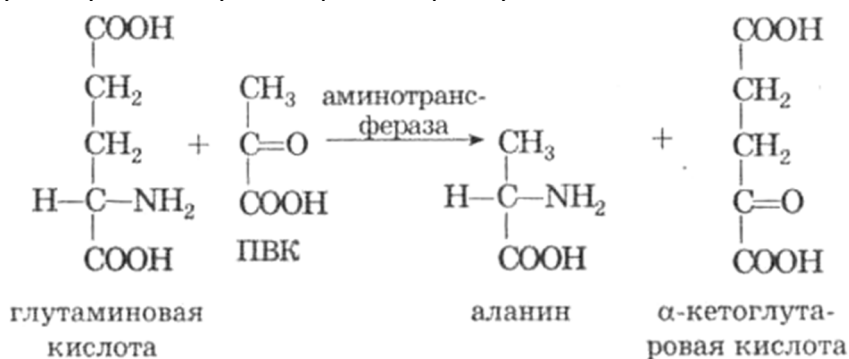
Таблица. Действие желудочного сока на белок

№	Содержимое пробирки	Температура, °С	Результаты
1	Белок + 1мл желудочного сока	37	
2	Белок + 1мл прокипяченного желудочного сока	37	
3	Белок + 1мл нейтрализованного желудочного сока	37	
4	Белок + 1мл желудочного сока	0	

Белки расщепляются под воздействием ферментов желудочного сока, которые действуют лишь при определенной температуре и в кислой среде.

7. ТРАНСАМИНИРОВАНИЕ АЛЬФА-АМИНОКИСЛОТ

В основе метода лежит реакция трансаминирования в мышечной ткани. В качестве субстратов используют глутаминовую и пировиноградную кислоты:



Ход работы

В две пробирки (опытную и контрольную) наливают по 0,5 мл растворов пировиноградной и глутаминовой кислот, по 1 мл раствора монобромуксусной кислоты

(для предотвращения гликолиза). В обе пробирки добавляют по 0,5 г свежей мышечной кашицы. В контрольную пробирку тотчас приливают 3 мл раствора уксусной кислоты и эту пробу кипятят на водяной бане 2—3 мин для инактивации ферментов. Пробирки помещают в термостат на 1,5 ч, периодически помешивая их стеклянными палочками. По окончании инкубации пробы вынимают из термостата. В опытную пробу добавляют 0,3 мл раствора уксусной кислоты и кипятят ее на водяной бане 2—3 мин. Отфильтровывают содержимое каждой пробы через маленький фильтр в чистую пробирку, отмечая ее соответствующим номером.

Подготавливают хроматографическую пластинку. Отступая 1 см от края пластинки, отмечают четыре точки. В первую точку наносят капилляром раствор глутаминовой кислоты, во вторую — аланина (т.е. растворы «свидетелей»), в третью — опытной пробы, в четвертую — контрольной пробы. Нанесение растворов производят обязательно чистыми капиллярами. Растворы опытной и контрольной пробы наносят два-три раза в одну и ту же точку, предварительно просушив на воздухе каплю, нанесенную в первый раз, для того, чтобы увеличить концентрацию аминокислот в месте нанесения. Хроматограммы помещают в хроматографическую камеру и хроматографируют в бутилово-уксусно-водной смеси (4:1:5). Хроматограммы высушивают и проявляют в растворе нингидрина. Затем прогревают в сушильном шкафу при 100° С.

Окрашенные пятна аминокислот обводят карандашом (т.к. пятна обесцвечиваются), рассчитывают R_f и сравнивают интенсивность пятен глутаминовой кислоты и аланина в опытной и контрольной пробах (табл.). Записывают принцип метода, реакцию трансаминирования, расчет R_f для пятен аминокислот, делают выводы, хроматограмму подклеивают к протоколу.

Таблица. Идентификация аминокислот по величинам R_f при хроматографии (в бутилово-уксусно-водной смеси 4 : 1 : 5)

Аминокислота	R_f
Цистин	0,05
Цистеин	0,08
Лизин	0,10
Гистидин	0,11
Аргинин	0,12
Аспарагиновая кислота	0,15
Серин	0,16
Глицин	0,17
Глутаминовая кислота	0,18
Треонин	0,19
Аланин	0,25
Пролин	0,27
Тирозин	0,28
Триптофан	0,43
Метионин	0,44
Валин	0,45
Фенилаланин	0,53
Изолейцин	0,59
Лейцин	0,61
Норлейцин	0,63

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Конечные продукты распада аминокислот.
2. Преобразование аминокислот по аминогруппе.

3. Преобразование аминокислот по карбоксильной группе.
4. Преобразование аминокислот по радикалу.
5. Пути новообразования аминокислот.
6. Образование ядовитых продуктов распада белков под действием микрофлоры кишечника. Механизм обезвреживания.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №19. АНАЛИЗ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить представления о химическом составе желудочного сока.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Путем последовательного действия протеолитических ферментов белки лишаются видовой и тканевой специфичности. 95-97% белков пищи всасывается в виде свободных аминокислот. Ферментный аппарат осуществляет поэтапное, избирательное расщепление пептидных связей. Превращение профермента пепсиногена в активный фермент пепсин происходит в желудке и протекает в присутствии соляной кислоты.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕПСИНА

Специальные свойства белков, проявляющих энзиматическую активность, оценивают по удельной каталитической активности данного фермента, выраженной в ЕД/г массы вещества или в ЕД/мл раствора.

Реактивы: 1) ацетатный буфер с pH 4,9 (готовят 0,2 н раствор ацетата натрия и 0,2 н раствор уксусной кислоты; смешивают 480 мл первого и 520 мл второго раствора под контролем pH); 2) молочно-ацетатная смесь (смешивают молоко с ацетатным буфером - 1:1); 3) HCl - 2 н раствор; 4) желудочный сок или раствор пепсина (100 мг пепсина растворяют в 1 н растворе и добавляют 10 - 20 капель 2 н раствора HCl до pH 2,5, через 3 ч раствор доводят до 100 мл 0,1 н раствором HCl и получают раствор пепсина).

Ход работы

В первую пробирку помещают 1 мл желудочного сока, а во вторую - 5 мл молочно-ацетатной смеси и прогревают 5 мин при 25 °С. Затем быстро переливают молочно-ацетатную смесь в первую пробирку и включают секундомер. Как только на стенках пробирки ползят первые хлопья казеина, останавливают секундомер. Для расчета активности пепсина в 1 мл желудочного сока делят число 60 на количество секунд - получают количество единиц пепсина в 1 мл желудочного сока.

2. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕАКЦИИ СРЕДЫ ЖЕЛУДОЧНОГО СОКА

Одним из факторов, определяющих скорость переваривания белков в желудке, является кислотность желудочного сока.

Ход работы

Одну каплю нативного желудочного сока наносят стеклянной палочкой на синюю лакмусовую бумажку или на универсальный индикатор, помещённый на предметное стекло. По изменению окраски индикатора определить pH желудочного сока.

2.2. РЕАКЦИИ НА СВОБОДНУЮ СОЛЯНУЮ КИСЛОТУ

Для реакции на свободную соляную кислоту в желудочном соке используют бумагу «конго» (фильтровальная бумага, пропитанная 0,1% раствором красного конго и высушенная, конго-натриевая соль сульфокислоты). В сильно кислой среде конго имеет синюю окраску, в слабокислой, нейтральной и щелочной - красную. Зона перехода окраски находится в интервале pH 3,0-5,2. Поэтому красная окраска переходит в синюю только под влиянием сильно диссоциирующих кислот (HCl создаёт в среде pH 1,0 - 2,2), окраска не меняется или меняется слабо от действия разбавленных органических кислот и кислореагирующих солей, так как они создают в среде pH 4,0 и выше.

Ход работы

Одну каплю нативного желудочного сока наносят стеклянной палочкой на красную бумагу конго. Отметить окраску индикатора.

В одну пробирку налить несколько капель раствора 0,1 н соляной кислоты, во вторую желудочного сока. В обе пробирки добавить по 2 капли раствора деметиламиноазобензола. В обеих пробирках появляется вишнево-красное окрашивание.

3. РЕАКЦИЯ НА МОЛОЧНУЮ КИСЛОТУ

Реакция на молочную кислоту основана на ее способности образовывать с солями трехвалентного железа лактат железа, окрашенного в желто-зеленый цвет.

Ход работы

В 2 пробирки наливают по 2-3 капли 1% раствора фенола и добавляют 1-2 капли 3% хлорного железа. Получается фенолят железа сине-фиолетового цвета (реактив Уффельманна). В 1-ю пробирку добавляют по каплям желудочный сок до изменения окраски. Во вторую пробирку добавляют несколько капель экстракта мышечной ткани. Отметить изменение окраски.

4. ТИТРОВАНИЕ КИСЛОТ ЖЕЛУДОЧНОГО СОДЕРЖИМОГО

Принцип определения кислотности желудочного сока основан на титровании свободной соляной кислоты и общих кислореагирующих веществ 0,1 н раствором едкого натра. Пользуясь различными индикаторами, в одной и той же пробе желудочного сока определяют как общую кислотность, так и содержание свободной соляной кислоты. При этом можно вычислить количество связанной соляной кислоты.

Общая кислотность желудочного сока выражается количеством мл 0,1 н раствора едкого натра, пошедшего на титрование 100 мл желудочного сока в присутствии индикатора фенолфталеина.

Свободную соляную кислоту принято выражать количеством мл 0,1 н раствора едкого натра, пошедшего на титрование 100 мл желудочного сока в присутствии индикатора деметиламиноазобензола. В этом случае при титровании нейтрализуется только свободная кислота, так как слабые кислоты находятся в растворе в недиссоциированном состоянии, в реакцию со щелочью не вступают. При рН 3,0, когда окраска индикатора меняется от красной к оранжевой, свободная кислота нейтрализуется щелочью. Титруют на белом фоне.

Ход работы

В колбу наливают 5 мл профильтрованного желудочного содержимого, добавляют 1-2 капли 1% спиртового раствора фенолфталеина 1-2 капли 0,5% спиртового раствора деметиламиноазобензола и титруют при постоянном помешивании 0,1 н. раствором гидроксида натрия до перехода первоначального красного цвета в желто-розовый («цвет семги»). Количество щелочи, израсходованной на титрование, соответствует количеству свободной соляной кислоты и выявляется индикатором деметиламиноазобензолом.

Не доводя уровня щелочи в бюретке до первоначального, продолжают титрование до перехода окраски в стойкий красный цвет. Общее количество щелочи, считая от начального уровня ее в бюретке, соответствует общей кислотности и выявляется индикатором фенолфталеином.

В другую колбу отмеривают 5 мл желудочного содержимого, добавляют 1-2 капли 1% водного раствора ализаринсульфоновокислого натрия и титруют при постоянном помешивании до перехода первоначальной желтой окраски в фиолетовую. Количество щелочи, использованной на титрование, соответствует сумме всех веществ, дающих кислую реакцию, кроме связанной соляной кислоты, и выявляется индикатором ализаринсульфоновокислым натрием. В каждой порции извлеченного желудочного содержимого определяют свободную соляную кислоту, общую кислотность и, в случае необходимости, связанную соляную кислоту. Результаты титрования записать в таблицу.

Расчет. Результаты титрования выражают в мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия, затраченных на нейтрализацию свободной соляной кислоты и других кислореагирующих соединений в 100 мл желудочного содержимого (условные титрационные единицы). Так как для титрования берут 5 мл желудочного содержимого, а расчет ведут на 100 мл, то количество потраченной щелочи умножают на 20. Одна условная титрационная единица

соответствует концентрации соляной кислоты, равной 1 ммоль/л.

Формулы для расчета:

Количество свободной HCl:

где а – количество 0,01N NaOH, пошедшего на титрование до 1 пункта; 0,5 – объем исследуемого желудочного сока.

$$HCl_{\text{своб.}} = \frac{a \cdot 10}{0,5}$$

Количество общей HCl:

$$HCl_{\text{общ.}} = \frac{в \cdot 10}{0,5}$$

где в – среднее арифметическое количество щелочи, пошедшее на титрование до 2 и 3 пунктов.

Количество связанной HCl:

$$HCl_{\text{связ.}} = HCl_{\text{общ.}} - HCl_{\text{своб.}}$$

Общая кислотность (ОК):

$$OK = \frac{K \cdot 10}{0,5}$$

где к – количество 0,01N NaOH, пошедший на титрование до 3 пункта.

Пример расчета

Первая порция (первая колба):

1. 1,5мл 0,1 н. NaOH (желто-розовый цвет).

Свободная соляная кислота—1,5·20 = 30 титр. ед. (30 ммоль/л).

2. 2,6 мл 0,1 н. NaOH (красный цвет).

Общая кислотность — 2,6·20 = 52 титр. ед. (52 ммоль/л). Вторая порция (вторая колба): 2 мл 0,1 н. NaOH (фиолетовый цвет).

Все вещества, дающие кислую реакцию, кроме связанной соляной кислоты, 2,0·20 = 40 титр. ед. (40 ммоль/л).

Связанная соляная кислота — 52—40 = 12 титр. ед. (12 ммоль/л).

Нормальные величины: свободная соляная кислота — 20—40 титр. ед. (20—40 ммоль/л), общая кислотность — 40—60 титр. ед. (40—60 ммоль/л), связанная соляная кислота — 4—20 титр. ед. (4—20 ммоль/л).

Таблица. Определение кислотности желудочного сока

Объем жидкости, взятой для анализа	Количество 0,1н. раствора гидроксида натрия, израсходованного на титрование, мл			Количество титрационных единиц (ммоль/л)		
	до желто-розового цвета	до красного цвета	до фиолетового цвета	свободная кислота	общая кислотность	связанная кислота

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Гидролиз белков. Протеолитические ферменты желудочного сока.
2. Состав желудочного сока. Роль соляной кислоты в переваривании белков.
3. Какова роль энтеропептидаз и экзопептидаз ЖКТ?
4. Проферменты ферментов ЖКТ.
5. Пути связывания аммиака в организме.
6. Механизм биосинтеза мочевины.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 20. ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ - освоение методов качественного и количественного определения мочевой кислоты.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Нуклеиновые кислоты не являются незаменимыми пищевыми факторами, и практически все клетки организма способны к синтезу нуклеотидов. Скоростью синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов определяется синтез нуклеиновых кислот. К заболеваниям, связанным с патологией обмена нуклеопротеинов, относятся подагра, мочекаменная болезнь, синдром Лёша-Нихена, оротацидурия, мегалобластическая анемия и другие.

Нуклеотиды – лекарственные препараты успешно применяются в клинике с лечебной целью. Аналоги пуринов и пиримидинов, их нуклеозиды и нуклеотиды широко используются в клинической медицине и научных исследованиях. Изменения в структуре гетероциклического кольца или углеводного компонента приводят к образованию соединений, токсический эффект которых обусловлен: ингибированием определенных ферментов, участвующих в синтезе нуклеотидов или нуклеиновых кислот; включением синтетических аналогов нуклеотидов в РНК или ДНК, где они нарушают комплементарное взаимодействие азотистых оснований или удлинение полинуклеотидных цепей.

Примерами аналогов пуринов и пиримидинов являются некоторые противоопухолевые и противовирусные препараты ингибирующие синтез пуринов и пиримидинов (6-меркаптопурин, тиогуанин, 5-фторурацил, 5-йодурацил). Ингибитором фермента ксантиноксидазы является аллопуринол, препарат, применяемый при лечении подагры и синдрома Лёша-Нихена.

1. ОБНАРУЖЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ПОМОЩИ МУРЕКСИДНОЙ ПРОБЫ

Мочевая кислота при окислении превращается в продукты (диалуровая кислота, аллоксан), которые конденсируются в аллоксантин. При действии аммиака на аллоксантин образуется пурпурная кислота, аммонийная соль которой – мурексид – обладает ярко-красным цветом, а калиевая – сине-фиолетовым.

Ход работы

Кристаллы мочевой кислоты помещают на дно фарфоровой чашки, смачивают каплями азотной кислоты (осторожно!), выпаривают досуха (не выше 70°C). Появляется коричнево-красное пятно, которое после охлаждения и осторожном смачивании с одного края аммиаком окрашивается в пурпурно-красный цвет, при смачивании с другого края раствором КОН – в сине-фиолетовый. Отмечают принцип метода, регистрируют результаты анализа и делают вывод.

Практическое значение

Мурексидную пробу используют для открытия мочевой кислоты в мочевых камнях, осадках.

2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

Мочевая кислота восстанавливает фосфорновольфрамовый реактив, развивается синяя окраска, интенсивность которой пропорциональна количеству мочевой кислоты. Количество образовавшейся фосфорновольфрамовой сини определяют путем титрования калием гексацианоферратом (III) $K_3[Fe(CN)_6]$, который окисляет фосфорновольфрамовую синь и окраска исчезает.

Ход работы

В колбу наливают 5 мл мочи, добавляют 2 мл фосфорновольфрамового реактива и 10 мл раствора Na_2CO_3 , перемешивают.

Из бюретки (осторожно!) по каплям приливают раствор $K_3[Fe(CN)_6]$ до исчезновения синего окрашивания.

Расчет

$$C_{оп} = \frac{C_{ст} \cdot A \cdot D}{B}$$

где $C_{оп}$ – концентрация мочевой кислоты в пробе, $C_{ст}$ – концентрация стандартного раствора мочевой кислоты, соответствующего 1 мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$ – 0,004 моль; В –

объем мочи взятый для анализа, А – количество мл раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, пошедшего на титрование, Д – суточный диурез (1200- 1500 мл).

Нормальные величины

Сыворотка крови

Дети 0,12-0,32 ммоль/л

Мужчины 0,24-0,50 ммоль/л

Женщины 0,16-0,44 ммоль/л

Моча 2,36-5,90 ммоль/сут

Запишите принцип метода и результаты проведения анализа. Сделайте вывод о наличии патологии.

Клинико-диагностическое значение

Уровень мочевой кислоты в крови (мононатриевая соль в комплексе с белком) определяется интенсивностью синтеза и выделением из организма. Повышение содержания мочевой кислоты наблюдается при уменьшении выделения ее почками, избыточном образовании (лейкозы). Повышение содержания мочевой кислоты в крови (гиперурикемия) является главным симптомом подагры. При подагре мочевая кислота откладывается в тканях, суставных сумках, хрящах, сухожилиях, суточное количество в моче снижается. Белки сыворотки стабилизируют ураты, но при снижении pH мочевая кислота кристаллизуется в тканях. Основным фармакологическим препаратом, используемым для лечения подагры, является аллопуринол, действие которого основано на ингибировании ксантиноксидазы. Ксантиноксидаза ускоряет окисление гипоксантина в ксантин и ксантина в мочевую кислоту. Донором электронов и кислорода в реакции является вода.

Злоупотребление алкоголем, отравление солями тяжелых металлов, заболевания почек уменьшают экскрецию мочевой кислоты (гипоурикемия). Экскрецию уратов повышают салицилаты, соли лития.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Охарактеризуйте переваривание нуклеопротеинов и васывание продуктов их распада в желудочно-кишечном тракте.
2. Охарактеризуйте анаболизм пуриновых нуклеотидов.
3. Напишите реакции синтеза АМФ и ГМФ из ИМФ, превращение нуклеозидмонофосфатов в трифосфаты.
4. Напишите биосинтез пиримидиновых нуклеотидов УМФ и ЦМФ, превращение их в трифосфаты.
7. Укажите регуляцию синтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов по типу обратной связи, ее особенности.
8. Назовите нуклеотидные коферменты, укажите представление об их функции.
9. Охарактеризуйте катаболизм пуриновых нуклеотидов. Напишите химизм образования мочевой кислоты из АМФ и ГМФ.
10. Напишите химизм распада пиримидиновых нуклеотидов, конечные продукты процесса, укажите их утилизацию.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №21. ГОРМОНЫ, ВЫДЕЛЕНИЕ, КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить классификацию и общие механизмы действия гормонов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

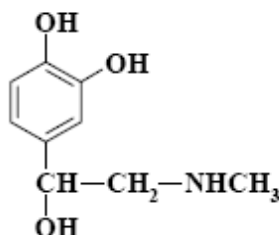
Гормоны представляют собой биологически активные, жизненно необходимые органические вещества, вырабатываемые органами (железами) внутренней секреции в незначительных количествах. По химической природе гормоны являются:

- белками (гормоны гипофиза, поджелудочной и парашитовидных желез).
- производными аминокислот (адреналин, тироксин).
- стероидами (гормоны коркового вещества, надпочечников и половые).

Биологическое значение гормонов заключается в их регулирующем действии на самые различные процессы в организме. Они поддерживают постоянство внутренней среды (гомеостаз), влияют на скорость химических реакций, физиологические функции, механизмы иммунитета, психическую деятельность, половое развитие и др.

1. ОБНАРУЖЕНИЕ АДРЕНАЛИНА

Адреналин, L-1-(3',4'-диоксифенил)-2-метиламиноэтанол (5) - гормон коры надпочечников. Играет большую роль в процессе передачи нервного возбуждения, влияет на сердечно-сосудистую систему (вызывает значительное повышение кровяного давления, увеличение частоты сердечных сокращений и минутного объема сердца). Усиливает гликогенолиз в мышцах и печени, что приводит к повышению уровня глюкозы в крови и увеличению образования молочной кислоты в мышцах.



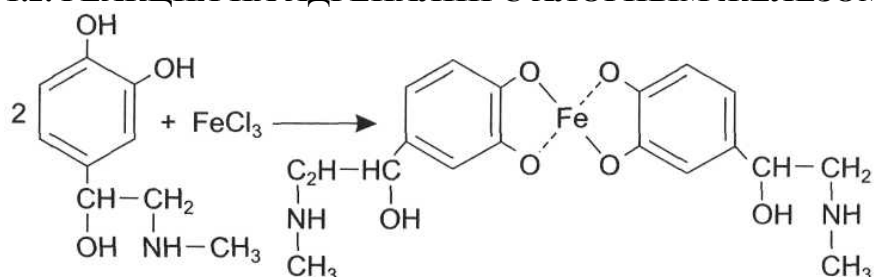
адреналин

Ход работы

1.1. РЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН С ЙОДАТОМ КАЛИЯ

В пробирку вносят 2-3 капли раствора адреналина (1:100), 2 капли 10% раствора KIO_3 и 2 капли 10% раствора уксусной кислоты, жидкость слегка нагревают. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

1.2. РЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН С ХЛОРНЫМ ЖЕЛЕЗОМ



В пробирку вносят 2-3 капли адреналина (1:100) и каплю 1% хлорного железа. Жидкость в пробирке принимает яркое изумрудно-зеленое окрашивание, постепенно переходя в желтоватое. Если к изумрудно-зеленому раствору прибавить 1 каплю концентрированного раствора аммиака, то окраска быстро переходит в зеленую и затем в коричневую.

1.3. ДИАЗОРЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН

При взаимодействии диазореактива с адреналином, жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

В пробирку вносят 3 капли 1% раствора сульфаниловой кислоты, 3 капли 5% раствора азотистокислого натрия, 5 капель раствора адреналина (1:100) и 3 капли 10% раствора углекислого натрия. Жидкость краснеет.

1.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НИТРИТНО-МОЛИБДЕНОВОГО РЕАКТИВА

Используют нитритно-молибденовый реактив (5 г нитрита натрия и 5 г молибдата натрия растворить в 50 мл дистиллированной воды).

В пробирку наливают 1 мл водного раствора адреналина, 1 мл 5% раствора соляной кислоты, 1 мл нитритно-молибденового реактива. Смесь перемешивают. Возникает желто-оранжевое окрашивание. При добавлении нескольких капель 10% раствора едкого натра появляется малиново-красная окраска, переходящая при внесении нескольких капель концентрированной соляной кислоты в лимонно-желтую.

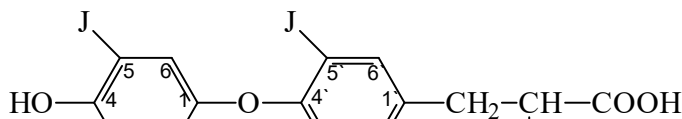
1.5. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО НАЛИЧИЯ ЯДРА ПИРОКАТЕХИНА В АДРЕНАЛИНЕ

Ход работы

В одну пробирку наливают 2 мл раствора адреналина, в другую - 2 мл пирокатехина. В обе пробирки добавляют несколько капель раствора хлорида железа - в обеих появляется изумрудно-зеленое окрашивание.

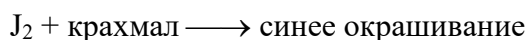
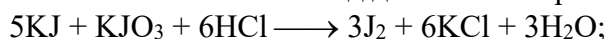
2. РЕАКЦИЯ НА ГОРМОНЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ТИРОКСИН)

Гормон щитовидной железы.



Гипофункция щитовидной железы в раннем детском возрасте приводит к болезни, которая в литературе известна как кретинизм. При этом заболевании происходит остановка роста, резко снижается скорость обменных процессов, отмечаются глубокие нарушения психики. Недостаточная функция щитовидной железы в зрелом возрасте приводит к развитию микседемы. Заболевание характеризуется нарушением водно-солевого, основного и жирового обменов. Повышенная функция щитовидной железы вызывает развитие базедовой болезни. При этом заболевании происходит резкое повышение обмена веществ, сопровождающегося усиленным распадом тканевых белков. Наблюдается отрицательный азотистый баланс. У больных развивается общее истощение организма, а также психические расстройства.

При щелочном гидролизе тироксина образуется йодистый калий, из которого йод можно вытеснить йодноватистокислым калием. Йод дает синее окрашивание с крахмалом:



Ход работы

В фарфоровой ступке измельчают 5 таблеток тиреоидина. Образованную массу переносят в колбу с помощью 5 мл воды, добавляют 5 мл 10% раствора едкого калия и кипятят 15 мин на электрической печи с асбестовой сеткой. К 3 мл охлажденного гидролизата добавляют 10% раствор серной кислоты до кислой реакции по лакмусу. Затем приливают 5 капель 1 % раствора крахмала и 1 мл раствора йодата калия для окисления йодида калия. Молекулярный йод, который выделяется, дает синее окрашивание с крахмалом. Напишите уравнение реакции.

3. ОБНАРУЖЕНИЕ ИНСУЛИНА

Инсулин - гормон, вырабатываемой поджелудочной железой животных и человека. Он регулирует содержание сахара (глюкозы) в крови. При его недостатке развивается весьма распространенное заболевание - сахарный диабет (гипергликемия). Инсулин является главным лекарственным препаратом для лечения этого заболевания и основное его количество производится экстракцией из поджелудочной железы сельскохозяйственных животных (свиней, крупного рогатого скота). Инсулин образуется в (β-клетках островков Лангерганса из своего предшественника - проинсулина.

3.1. ОБНАРУЖЕНИЕ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИЕЙ

По химической природе он является белком. Полипептидные цепи соединены в двух точках дисульфидными мостиками. Инсулин дает почти все характерные цветные реакции на белок.

Ход работы

В пробирку к 5 каплям раствора инсулина прибавляют 5 капель 10% раствора едкого натра и 1 кашпо 1% раствора сернокислой меди. Перемешивают, встряхивают. Наблюдают появление фиолетового окрашивания. Объяснить механизм реакции, сделать выводы.

3.2. ОБНАРУЖЕНИЕ РЕАКЦИЕЙ С СУЛЬФОСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

В пробирку вносят 1 мл раствора инсулина, добавляют 5 капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Наблюдают выпадение осадка белого цвета. Объяснить механизм реакции, сделать вывод.

3.3. ОБНАРУЖЕНИЕ РЕАКЦИЕЙ ФОЛЯ

В термостойкую пробирку вносят 5 капель раствора инсулина, 5 капель 30% раствора едкого натра и 1-2 капли 5% раствора уксуснокислого свинца. При длительном нагревании жидкость в пробирке бурлит и выпадает черный осадок сернистого свинца. Объяснить механизм реакции, сделать вывод.

3.4. ОБНАРУЖЕНИЕ РЕАКЦИЕЙ ГЕЛЛЕРА

К 10 каплям концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки приливают равный объем (10 капель) раствора инсулина. Пробирку наклоняют под углом 45° так, чтобы жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей образуется белый аморфный осадок в виде небольшого кольца.

4. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Половые гормоны играют важную роль в обмене веществ и способствуют возникновению вторичных половых признаков. Они вырабатываются половыми железами – семенниками и яичниками. К важнейшим женским половым гормонам относятся эстрадиол, эстрон (фолликулин) и эстриол.

РЕАКЦИЯ НА ФОЛЛИКУЛИН (ЭСТРОН)

Фолликулин влияет на обмен белков, углеводов, нуклеиновых кислот, ускоряет окисление жиров в тканях и образование высокомолекулярных жирных кислот.

Ход работы

4.1. РЕАКЦИЯ С КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

В пробирку наливают 20-30 капель спиртового раствора фолликулина и помещают ее в кипящую баню на 5-10 минут для удаления спирта. К оставшемуся в пробирке фолликулину добавляют 20 капель концентрированной серной кислоты и пробирку вновь помещают в кипящую баню на 4-10 минут. Жидкость окрашивается в соломенно-желтый цвет, а при нагревании в оранжевый.

4.2. ОБРАЗОВАНИЕ ФЕНОЛЯТА ФОЛЛИКУЛИНА

В две сухие пробирки приливают по 0,5 мл раствора фолликулина. В первую добавляют 1 мл воды и отмечают образование эмульсии фолликулина. Во вторую, добавляют такое же количество 30%-ного раствора гидроксида натрия — помутнения не возникает, так как в щелочной среде происходит образование фенолята фолликулина.

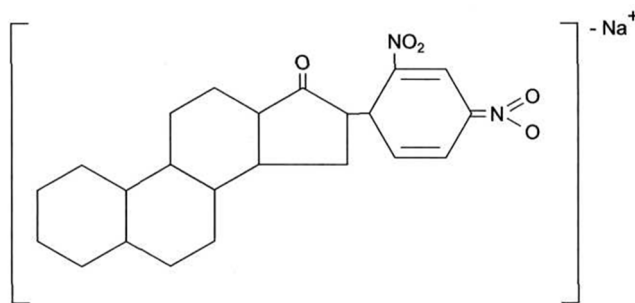
4.3. РЕАКЦИЯ НА ФЕНОЛЬНУЮ ГРУППУ

К 2 мл раствора фолликулина добавляют 1 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и 1 мл реактива Фолина. Возникает синее окрашивание, характерное для фенольной группы.

5. ГОРМОНЫ КОРКОВОГО СЛОЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Кортикостероиды имеют в основе своего строения кольцо цикlopentanпергидрофенантрена. Они синтезируются в корковом слое надпочечников из ацетилкоэнзима А (активная форма уксусной кислоты, источником которой являются как углеводы, так и липиды) или из холестерина. Важнейшим промежуточным продуктом является прогестерон. Из прогестерона образуются также женские (эстрогены) и мужские (андрогены) половые гормоны.

Основными нейтральными 17-кетостероидами, встречающимися в моче человека, являются андростерон, этиохоланолон, дегидроэпиандростерон, эпиандростерон и др.



Реакция открытия 17-кетостероидов в моче основана на способности 17-кетостероидов давать в щелочной среде с мета-динитробензолом продукт конденсации красного или красно-фиолетового цвета за счет метиленовой группы (CH_2), соседней с кетогруппой. Интенсивность окраски пропорциональна количеству находящихся в моче 17-кетостероидов.

Ход работы

1. В пробирку вносят 5 капель мочи, добавляют 5 капель 30% раствора гидроксида натрия и 5 капель 2% раствора мета-динитробензола.

2. Содержимое пробирки смешивают и оставляют стоять на несколько минут. При стоянии появляется красное окрашивание, обусловленное наличием 17-кетостероидов в моче. Сделать вывод.

6. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА КОРТИЗОН

6.1. С СОЛЯНОКИСЛЫМ ФЕНИЛГИДРАЗИНОМ

Благодаря наличию карбонильных групп кортизон, преднизолон, реагируя с фенилгидразином, образуют гидразон и озон.

Ход работы

К 1 мл раствора преднизолон прибавляют 5 мл раствора фенилгидразина и нагревают на водяной бане. Через несколько минут появляется желтое окрашивание.

6.2. С РЕАКТИВОМ ФЕЛИНГА

Кортизон и преднизолон способны восстанавливать закись меди из солей окиси.

Ход работы

К 1 мл раствора преднизолон прибавляют 1 мл реактива Фелинга, нагревают на спиртовке. Выпадает красный осадок закиси меди.

Результаты работы оформить в виде таблицы.

Таблица. Исследование гормонов

Название желез внутренней секреции	Гормон, выделяемый железой	Химическое строение гормона	Исследуемый материал	Реактивы	Что наблюдается	Чем обусловлена реакция

Отметить роль исследуемых гормонов в обмене веществ, проявление гипер- и гипопункции соответствующих желез внутренней секреции. В выводах сопоставить химизм проделанных качественных реакций с химической природой изучаемых гормонов или с наличием в их молекуле характерных группировок.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Химическая природа гормонов.
2. Кто из ученых занимался изучением гормонов.
3. Применение гормонов.
4. Принцип действия гормонов. Характеристика гормонов по классам.
5. Стероидные гормоны. Примеры, значение.
6. Пептидные гормоны. Примеры, значение.
7. Прочие гормоны. Примеры, значение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 22.

ВОДНЫЙ И МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить способы определения минеральных веществ в биоматериалах.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Минеральные вещества поступают в организм с пищей и водой. Основную часть этих соединений составляют хлористые, сернокислые, фосфорнокислые и углекислые соли калия, натрия, магния и кальция. В небольших количествах (мг, мкг) поступают йод, бром, фтор, железо, медь, марганец, цинк, кобальт, молибден и другие микроэлементы.

Минеральные вещества в организме содержатся в двух состояниях: в виде свободных ионов и в связанной с органическими веществами форме (белками, ферментами, витаминами). Что касается микроэлементов, то все они находятся в связанном состоянии (кобальт — в витамине В₁₂, медь — в тирозиназе и церулоплазмине, цинк — в карбоангидразе, в инсулине). Минеральные вещества связываются с органическими молекулами ковалентными (йод — в тиреоглобулине, в тироксине), электростатическими (магний и кальций — с различными ферментами) и координационными связями (железо — в гемопротеидах).

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФАТОВ

Фосфор в организме находится в виде неорганических солей и органических соединений (фосфорные эфиры углеводов, фосфопротеины, нуклеиновые кислоты, АМФ, АДФ, АТФ, фосфолипиды и др.). Он широко участвует в обменных процессах организма – белковом, углеводном, липидном.

1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ВОССТАНОВЛЕНИЮ ФОСФОРНО-МОЛИБДЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Принцип метода заключается в том, что после осаждения белков сыворотки в центрифугате остается неорганический фосфор, который с молибденовой кислотой образует фосфорно-молибденовую кислоту. Последняя восстанавливается эйконогеном до синего фосфорно-молибденового комплекса. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфора в сыворотке крови.

Ход работы

К 1 мл сыворотки прибавляют 4 мл дистиллированной воды, 5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты и смешивают. Выпадает осадок белков. Через 10 минут центрифугируют при 3000 об/мин. 10 минут.

К 5 мл центрифугата добавляют 1 мл 5% раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл дистиллированной воды.

Смесь оставляют на 20 минут при комнатной температуре, затем измеряют оптическую плотность на ФЭКе против контроля при длине волны 630—690 нм (красный светофильтр) в кювете толщиной слоя 1,0 см.

Контроль готовят одновременно с опытной пробой. К 2,5 мл трихлоруксусной кислоты приливают 2,5 мл воды, 1 мл молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена, 1,8 мл воды. Оставляют на 20 минут при комнатной температуре. Расчет производят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Из рабочего стандартного раствора готовят разведения, как указано в таблице.

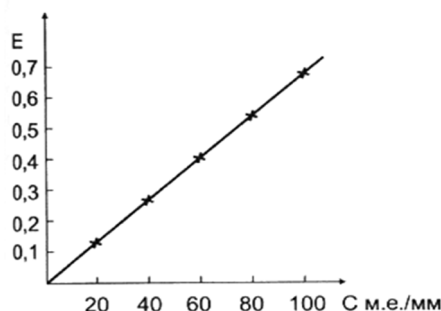
Таблица. Определение неорганического фосфора

№ пробы	Рабочий стандартный раствор, мл	Раствор трихлоруксусной кислоты, мл	Раствор молибденовокислого аммония, мл	Раствор эйконогена, мл	Дистиллированная вода, мл	Содержание фосфора в пробе	
						мг	мг%
1	0,5	2,5	1,0	0,2	3,8	0,01	2
2	1,0	2,5	1,0	0,2	3,3	0,02	4
3	2,0	2,5	1,0	0,2	2,3	0,04	8

4	3,0	2,5	1,0	0,2	1,3	0,06	12
5	4,0	2,5	1,0	0,2	0,3	0,08	16

После 20-минутного стояния пробы измеряют как опытные против контроля. На основании полученных при фотометрировании данных строят калибровочный график на миллиметровой бумаге, откладывая на оси ординат найденные величины оптической плотности, а на оси абсцисс – соответствующие им количества фосфора.

Полученные данные содержания неорганического фосфора в сыворотке записать в таблице и сопоставить с нормальными показателями.



Калибровочный график

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФАТОВ В СЛЮНЕ

Ход работы

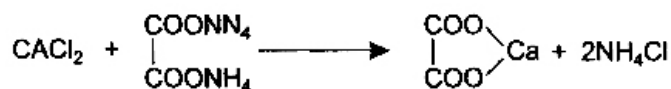
2 мл слюны осаждают 2 мл 10% раствора ТХУ. Фильтруют.

К 2 мл фильтрата прибавляют 4 мл 5% раствора молибденовокислого аммония в 5 н. H_2SO_4 с добавлением 0,5% раствора аскорбиновой кислоты. Перемешивают и инкубируют в термостате при 45°C в течение 20 минут.

Наблюдают появление синего преходящего окрашивания, и выпадение осадка желтого цвета комплексного соединения фосфорномолибденовокислого аммония. Связать обнаружение фосфатов кальция в слюне с состоянием эмали зуба.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ

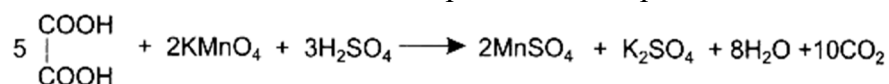
Кальций участвует в поддержании определенной проницаемости всех клеточных мембран, уменьшает уровень возбудимости нервных клеток (при недостатке его наступает перевозбуждение — тетания), принимает участие в свертывании крови, выполняет опорные функции, входя в состав костной ткани, активирует ряд ферментов. Всасывание кальция, поступающего с пищей, осуществляется путем связывания его со специальным белком, который находится в щеточной кайме клеток кишечного эпителия, после чего кальций транспортируется внутрь клеток. Синтез кальцийсвязывающего белка происходит в цитоплазме клеток кишечника при помощи активной формы витамина D_3 — $1,25 - (\text{OH})_2\text{D}_3$. Метод количественного определения кальция в сыворотке крови по де Ваарду основан на осаждении кальция непосредственно из сыворотки без предварительного осаждения белков в виде щавелевокислого кальция:



Оксалат кальция разлагается при нагревании с серной кислотой:



Освободившаяся щавелевая кислота оттитровывается перманганатом калия:



По количеству щавелевой кислоты, определенной титрованием перманганатом калия, выясняют количество кальция, которое было с ней связано.

Ход работы

В одну центрифужную пробирку наливают 1 мл сыворотки крови и 1 мл дистиллированной воды (опытная проба), а в другую 2 мл дистиллированной воды (контрольная проба). Эта проба служит контролем на содержание в реактивах кальция и на полноту отмывания от избытка щавелевокислого аммония.

В обе пробирки добавляют по 0,5 мл 4% раствора щавелевокислого аммония, слегка встряхивают и оставляют на 30 минут, после чего 10 минут центрифугируют. Перед центрифугированием пробирки попарно уравнивают.

Осторожно, чтобы не взмутить осадок, опрокидывают обе пробирки и сливают всю жидкость, после чего края пробирок протирают фильтровальной бумагой для полного удаления жидкости. Щавелевокислый кальций в опытной пробирке остается на дне в виде белого осадка.

Осадок щавелевокислого кальция отмывают от избытка щавелевокислого аммония и других веществ сыворотки слабым раствором аммиака (в слабощелочной среде щавелевокислый кальций нерастворим).

Для этого в обе центрифужные пробирки наливают по 2 мл 2% раствора аммиака, встряхивают и вновь центрифугируют в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливают, и промывание осадка производят еще 2 раза, повторяя манипуляции, описанные выше.

Сливают жидкость после последнего центрифугирования, и в обе пробирки вносят по 1 мл 1 н. раствора серной кислоты для растворения осадка щавелевокислого кальция. Осадки размешивают стеклянными палочками и, не вынимая их, помещают пробирки в нагретую водяную баню на 2 минуты.

Горячий раствор титруют при помешивании палочками из микробюретки 0,01 н. раствором перманганата до появления слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение одной минуты.

Расчет производят по формуле:

$$x = (a - b) \cdot 0,2 \cdot 100,$$

где x — количество кальция в сыворотке крови, мг%; a — количество 0,01 н. раствора марганцовокислого калия, израсходованное на титрование опытной пробы, мл; b — количество 0,01 н. раствора марганцовокислого калия, потраченное на титрование контрольной пробы, мл; 0,2 — количество кальция, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора перманганата, мг; 100 — коэффициент для пересчета на 100 мл сыворотки.

Если содержание кальция желательно выразить в ммоль/л, то полученное значение (x) умножают на 0,25.

Результаты определения занести в таблицу. Сопоставить полученные данные с нормальными величинами содержания кальция в сыворотке крови.

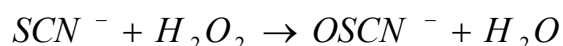
3. ОБНАРУЖЕНИЕ РОДАНИДОВ В СЛЮНЕ

Роданиды слюны обнаруживают по появлению красного окрашивания при добавлении к слюне хлорного железа. Это типичная и чувствительная реакция на роданиды обусловлена образованием роданистой соли трехвалентного железа в результате взаимодействия ионов Fe^{3+} и SCN^- и образования различных комплексов, имеющими состав от $Fe(H_2O)_5NCS^{2+}$ до $Fe(NCS)_6^{3-}$. Некоторые органические соединения, например, соли лимонной и уксусной кислот, препятствуют образованию окраски.

Ход работы

К 5 каплям слюны добавляют 2 капли 2% раствора HCl и 2 капли 0,01% раствора $FeCl_3$. Развивается красное окрашивание.

В гранулоцитах локализован фермент лактопероксидаза, которая окисляет имеющийся в слюне роданид с помощью перекиси водорода бактериального происхождения в гипотиоционат:



Гипотиоционат чрезвычайно бактерициден и совместно с H_2O_2 или ее радикалами

действует антикариесогенно. Содержание роданидов велико в слюне курильщиков, что связано с поступлением в их организм синильной кислоты табачного дыма.

При составлении протокола сравните интенсивность окраски роданида железа в слюне курильщика и у некурящих табак.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ И ФОСФОРА В ТКАНИ ЗУБА

В построении зуба принимают участие три вида плотных тканей: эмаль, дентин, цемент.

Неорганические вещества зубной ткани представлены главным образом гидроксиапатитом $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$. Это малорастворимые кристаллы с высокой механической прочностью обеспечивают опорную функцию костной и зубной тканей. Находящиеся в кристаллической решетке гидроксильные ионы могут обмениваться на ионы фтора и хлора с образованием фторапатита $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{CaF}_2$ и хлорапатита $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{CaCl}_2$.

Ход работы

1. Для исследования минерального состава зуба необходимо растворить минеральные вещества (преимущественно апатиты) в соляной кислоте. Для этого навеску в 0,5 г зуба помещают в колбу и добавляют 30 мл 10% раствора соляной кислоты. Содержимое колбы кипятят на сетке под тягой.

2. Когда зуб полностью растворится, содержимое колбы охлаждают и переносят количественно в мерную колбу или цилиндр на 50 мл. Объем жидкости доводят до 50 мл, добавляя дистиллированную воду. Полученный гидролизат используют для качественного обнаружения кальция и фосфора и их количественного определения.

3. Качественная реакция на кальций. К 2 мл гидролизата приливают избыток насыщенного раствора щавелевокислого аммония до выпадения белого кристаллического осадка оксалата кальция.

4. Качественная реакция на фосфор. К 2 мл гидролизата прибавляют избыток раствора молибденовокислого аммония и нагревают. Образуется фосфорномолибденовокислый аммоний, окрашивающий жидкость в желтый цвет. При дальнейшем нагревании появляется желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

5. Количественное определение кальция. 1 мл гидролизата (содержит 0,01 г зуба) вносят в центрифужную пробирку, добавляют 3 капли индикатора метилового красного и нейтрализуют жидкость разбавленным аммиаком до появления оранжевого окрашивания.

6. Для осаждения кальция наливают 3 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония и оставляют пробирку на 30 минут, после чего осадок отделяют центрифугированием (предварительно уравнив пробирки) и сливают надосадочную жидкость, не взмучивая осадка.

7. Осадок промывают разбавленным аммиаком. Для этого в пробирку после удаления надосадочной жидкости приливают 5 мл разбавленного аммиака, перемешивая осадок стеклянной палочкой, и центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают описанным выше способом, осадок еще один или два раза промывают разбавленным аммиаком.

8. После последнего промывания осадок растворяют в 3 мл разбавленной серной кислоты и на водяной бане подогревают пробирку до 70°C. Горячую жидкость титруют 0,05 н. раствором марганцовокислого калия до слабо-розового цвета.

9. Параллельно ставят и обрабатывают как опыт контрольную пробу, взяв вместо 1 мл гидролизата 1 мл дистиллированной воды.

10. Содержание кальция в зубе вычисляют по формуле:

$$x = \frac{B \cdot 1 \cdot 10000}{1000},$$

где x — содержание кальция в зубе, в %;

В — количество марганцовокислого калия, использованное на титрование опыта после вычета контроля, мл;

1 — количество мг кальция, эквивалентное 1 мл 0,05 н. раствора перманганата;

10000 — коэффициент для пересчета на 100 г зуба;

1000 — коэффициент для пересчета мг в г.

11. Количественное определение фосфора. 0,5 мл гидролизата вносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют дистиллированной воды до метки и перемешивают содержимое.

12. 5 мл разбавленного гидролизата (содержит 0,25 мг зуба) переносят в пробирку (или колбочку), прибавляют 1 мл 5% раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл дистиллированной воды.

13. Пробирку оставляют на 20 минут при комнатной температуре, затем измеряют оптическую плотность на ФЭКе против контроля при длине волны 630—690 нм (красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см.

14. Одновременно с опытной пробой готовят контроль. Для этого 0,3 мл 10% раствора соляной кислоты (соответствует концентрации 10% HCl в 0,5 мл гидролизата) вносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют воды до метки и перемешивают содержимое. 5 мл жидкости отмеривают в пробирку (или колбочку), добавляют 1 мл 5% раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл дистиллированной воды. Оставляют стоять при комнатной температуре на 20 минут.

15. Расчет производят по калибровочному графику с учетом разведения и по формуле:

$$x = \frac{A \cdot 100}{0,25} = A \cdot 400$$

где x — содержание фосфора, %; А — количество фосфора, найденное по калибровочному графику, мг; 0,25 — количество ткани зуба, отвечающее 5 мл разбавленного гидролизата, взятым для колориметрирования, мг; 100 — коэффициент для пересчета на 100 мг зубной ткани.

Содержание фосфора в зубе составляет около 15%.

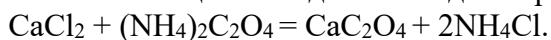
Вычислить содержание кальция и фосфора в зубной ткани и полученные данные занести в таблицу. В выводах сопоставить содержание кальция и фосфора в разных биологических объектах.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА КОСТИ

При действии на кость соляной кислоты минеральная часть кости растворяется, остаток состоит в основном из белков. Кости заливают 5%-ным раствором соляной кислоты и оставляют на сутки или более. Затем солянокислую вытяжку, содержащую минеральные соли, сливают, органическую часть кости (оссеин) заливают водой. Органическую часть кости, представляющую собой в основном костный коллаген, вынимают из воды, измельчают ножом и промывают длительное время водой. Затем кипятят с водой и получают, поскольку был исключен процесс золки, техническую желатину. В солянокислой вытяжке, полученной при мацерации кости, содержатся кальций, магний, железо, фосфорная кислота, калий, натрий, фтор.

5.1. РЕАКЦИЯ НА КАЛЬЦИЙ

Открытие кальция основано на нерастворимости щавелевокислого кальция, образующегося при воздействии на растворимые соли кальция щавелевокислым аммонием. В солянокислой вытяжке кальций находится в виде хлористого кальция

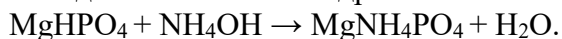


Ход работы

В пробирку с 5 мл солянокислой вытяжки приливают 2—3 мл 5%-ного раствора щавелево-кислого аммония, встряхивают и наблюдают за образованием белого осадка щавелевокислого кальция.

5.2. РЕАКЦИЯ НА МАГНИЙ

Открытие магния основано на образовании двойной фосфорноаммонийной магниевой соли в фильтрате после удаления кальция в виде щавелевокислой соли (CaC_2O_4 отфильтровывают). Так как магний бывает связан главным образом с фосфорной кислотой, то обычно достаточно добавить только гидрат аммония



В фильтрате после удаления кальция в виде щавелевокислого кальция (CaC_2O_4) и магния в виде фосфорноаммонийномагниевой соли (MgNH_4PO_4) открывают оставшуюся фосфорную кислоту. Для этого к фильтрату добавляют магниезальную смесь, выпадает осадок (MgNH_4PO_4).

Ход работы

Наличие фосфорной кислоты в полученном осадке проверяют молибденовокислым аммонием $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$. Осадок растворяют в небольшом количестве 10%-ного раствора азотной кислоты и нагревают с 3 мл $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$ на водяной бане. В присутствии фосфорной кислоты после охлаждения выпадает осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Роль минеральных веществ для организма человека.
2. Какие элементы относят к макроэлементам.
3. Какие элементы относят к микроэлементам.
4. Какие элементы относят к ультрамикроэлементам.
5. Способы определения минеральных веществ.
6. Регуляция водно-солевого обмена.

Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)

Перечень основной литературы

1. Любимова Н.В., Бабкина И.В.; Тимофеев Ю.С. Проведение биохимических исследований –учебник. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2024. – 256 с.
2. Базовый курс биохимии // Под ред. А.И. Глухова, А.Е. Губаревой. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 584 с.
3. Лелевич, С. В. Клиническая биохимия: — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 304 с. — ISBN 978-5-8114-5146-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133476>

Перечень дополнительной литературы

1. Клиническая лабораторная диагностика: сборник ситуационных задач: учебное пособие / Е. Г. Бутолин, В. Г. Иванов, М. В. Терещенко, В. В. Максимова. — 2-е изд. стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2024. — 108 с. — ISBN 978-5-507-47622-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/398480>
2. Биохимия: учебное пособие / А. В. Стрыгин, Б. Е. Толкачев, А. М. Доценко, Е. И. Морковин. — Волгоград : ВолгГМУ, 2022. — 132 с. — ISBN 978-5-9652-0820-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/338252>
3. Клиническая биохимия: учебное пособие / Т. П. Бондарь, К. С. Светлицкий, Н. И. Ковалевич [и др.]. — Ставрополь: СтГМУ, 2020. — 204 с. — ISBN 978-5-89822-635-0. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/216803>
4. Биохимические исследования в клинической практике: Руководство для врачей / А.А. Кишкун. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2014. — 528 с.: ил.
5. Основы биохимического анализа: лабораторный практикум : учебное пособие /

- составители О. С. Котлярова, С. М. Чыдым. — Новосибирск : НГАУ, 2020. — 77 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/257708>
6. Лелевич, С. В. Теория и практика лабораторных биохимических исследований : учебное пособие для спо / С. В. Лелевич. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 304 с. — ISBN 978-5-507-50169-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/414779>
7. Сборник ситуационных задач по клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / О. С. Абрамовских, И. В. Батигова, И. А. Лаптева [и др.]. — Челябинск : ЮУГМУ, 2023. — 101 с. — ISBN 978-5-94507-261-9. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/442340>
8. Карпенко, Л. Ю. Биологическая химия : учебное пособие / Л. Ю. Карпенко, А. А. Бахта, А. И. Козицына. — Санкт-Петербург : СПбГУВМ, 2022. — 228 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/366575>
9. Кузнецов, О. Е. Лабораторные исследования в клинике : учебное пособие для спо / О. Е. Кузнецов, С. А. Ляликов. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 500 с. — ISBN 978-5-507-51527-1. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/422633>
10. Лабораторный практикум по биохимии для студентов лечебного и педиатрического факультетов : учебное пособие / О. Л. Носарева, Е. А. Степовая, Е. В. Шахристова, Л. В. Спирина. — 3-е изд., доп. и испр. — Томск : СибГМУ, 2023. — 165 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/369047>

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Методические указания
для обучающихся по организации и проведению самостоятельной работы
по дисциплине «БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ»
для студентов специальности 33.05.01 Фармация

Введение

Для современного специалиста важно формирование системных фундаментальных знаний, умений и навыков по биохимическим закономерностям, представляющих важность при подготовке студентов медиков к системному восприятию естественнонаучных и профессиональных дисциплин, формировании у них навыков биохимического анализа, необходимых для последующей практической деятельности.

Целью данного пособия является формирование общепрофессиональных компетенций будущего специалиста по специальности 30.05.01 Медицинская биохимия.

Знания, полученные в ходе освоения дисциплины, применяются при написании выпускной квалификационной работы, при прохождении преддипломной практики, а также в дальнейшей профессиональной деятельности.

Общая характеристика самостоятельной работы студента при изучении дисциплины «Биологическая химия»

Самостоятельная работа проводится в виде самостоятельного изучения литературы и подготовки заданий. Основной целью этих видов самостоятельной работы является улучшение профессиональной подготовки специалистов высшей квалификации, направленное на формирование действенной системы фундаментальных и профессиональных знаний, умений и навыков, которые они могли бы свободно и самостоятельно применять в практической деятельности.

В ходе организации самостоятельной работы решаются следующие задачи:

- Показать связь между структурой и функцией ферментов; биологическое значение ферментов.
- Сформировать у студентов представления о ферментах, нарушение работы которых приводит к наследственным заболеваниям человека.
- Ознакомить со способами выделения и очистки ферментов.
- Обучить технике современного биохимического анализа, методам оценки и выбору методов анализа, адекватных поставленной задаче.

В ходе постановки целей и задач необходимо учитывать, что их выполнение направлено не только на формирование общеучебных умений и навыков, но и определяется рамками данной предметной области.

Общая характеристика самостоятельной работы студента при изучении дисциплины «Биологическая химия»

Самостоятельная работа проводится в виде самостоятельного изучения литературы и подготовки заданий. Основной целью этих видов самостоятельной работы является улучшение профессиональной подготовки специалистов высшей квалификации, направленное на формирование действенной системы фундаментальных и профессиональных знаний, умений и навыков, которые они могли бы свободно и самостоятельно применять в практической деятельности.

В ходе организации самостоятельной работы решаются следующие задачи:

- Показать связь между структурой и функцией белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов; биологическое значение витаминов.
- Сформировать у студентов представления о процессах переноса и реализации генетической информации, нарушение которых приводит к наследственным заболеваниям человека; основах биоэнергетики; метаболических путях и основных механизмах регуляции обмена углеводов, липидов, аминокислот, нуклеотидов.
- Ознакомить со способами обезвреживания токсических веществ в организме, применяя знания механизмов обезвреживания эндогенных веществ и чужеродных соединений.

- Обучить технике современного биохимического анализа, методам оценки и выбору методов анализа, адекватных поставленной задаче.

В ходе постановки целей и задач необходимо учитывать, что их выполнение направлено не только на формирование общеучебных умений и навыков, но и определяется рамками данной предметной области.

Методические рекомендации по изучению теоретического материала

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала курса «Биохимия» студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины в библиотеке СКФУ. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных. Все это поможет в решении задач, тестировании и подготовке к зачету.

Методические указания по подготовке к лабораторным занятиям

При подготовке к практическим занятиям рекомендуется изучить контрольные вопросы по данному занятию, теоретический материал, изложенный в пособии, обратить внимание на технику безопасности и изучить методику проведения опытов. В протоколе должны быть отражены следующие разделы:

1. Номер занятия.
2. Название работы.
3. Цель работы.
4. Принцип метода и химический механизм реакций.
5. Расчеты.
6. Результаты.
7. Выводы.

Методические рекомендации по подготовке к индивидуальным заданиям

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала курса студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины в библиотеке СКФУ. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных. Все это поможет в решении задач, тестировании и подготовке к контрольным точкам.

Методические рекомендации при подготовке к докладам

Изучение основных разделов заканчивается разработкой творческих заданий, на которых обобщается весь материал по данной части учебной программы.

Творческие задания представляет собой не только одну из форм текущего контроля, но и одну из активных форм учебных занятий, проводимых как в виде беседы преподавателя со студентами, так и в виде занятия, посвященного обсуждению определенной темы.

Целями творческих заданий являются: выяснение у студентов знаний, их углубление (повышение) и закрепление по той или иной теме курса; формирование у студентов навыков анализа теоретических проблем на основе самостоятельного изучения учебной и научной литературы.

Основная задача творческих заданий – пробудить у студента стремление к чтению и использованию дополнительной литературы. На занятия могут выноситься как проблемные (нередко спорные теоретические вопросы), так и вопросы, требующие самостоятельного изучения, а также более глубокой проработки.

На самостоятельную подготовку к творческому заданию студенту отводится 1-2 недели. Подготовка включает в себя изучение рекомендованной литературы и составление конспекта.

Методические указания к тестам

Самостоятельные ответы на вопросы, как и решение задач существенно дополняют лекции и самостоятельно пройденный материал по дисциплине. В процессе анализа и решения задач студенты расширяют и углубляют знания, полученные из лекционного курса и учебников, учатся глубже понимать биохимические законы и формулы, разбираться в их особенностях, границах применения, приобретают умение применять общие закономерности к конкретным случаям. В процессе решения задач вырабатываются навыки вычислений, работы со справочной литературой, таблицами. Решение задач не только способствует закреплению знаний и тренировке в применении изучаемых законов, но и формирует особый стиль умственной деятельности, особый метод подхода к биохимическим явлениям.

На занятиях используются:

- 1) задачи-упражнения, помогающие студентам приобрести твёрдые навыки расчёта и вычислений;
- 2) задачи для демонстрации практического применения тех или иных законов;
- 3) задачи для закрепления и контроля знаний;
- 4) познавательные задачи.

Несмотря на различие в видах задач, их решение можно проводить по следующему общему плану, который надо продиктовать студентам:

1. прочесть условие задачи; посмотреть, все ли термины в условиях задачи известны и понятны (если что-то неясно, следует обратиться к учебнику, просмотреть решения предыдущих задач, посоветоваться с преподавателем);
2. написать схему реакции, если это необходимо;
3. установить, какие законы и соотношения могут быть использованы при решении данной задачи;
4. составить уравнения, которые характеризуют рассматриваемые явления с количественной стороны;
5. решить эти уравнения относительно неизвестных величин, получить ответ.

Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины (модуля)

Перечень основной литературы

1. Любимова Н.В., Бабкина И.В.; Тимофеев Ю.С. Проведение биохимических исследований –учебник. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2024. – 256 с.
2. Базовый курс биохимии // Под ред. А.И. Глухова, А.Е. Губаревой. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 584 с.
3. Лелевич, С. В. Клиническая биохимия: — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 304 с. — ISBN 978-5-8114-5146-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133476>

Перечень дополнительной литературы

1. Клиническая лабораторная диагностика: сборник ситуационных задач: учебное пособие / Е. Г. Бутолин, В. Г. Иванов, М. В. Терещенко, В. В. Максимова. — 2-е изд. стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2024. — 108 с. — ISBN 978-5-507-47622-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/398480>
2. Биохимия: учебное пособие / А. В. Стрыгин, Б. Е. Толкачев, А. М. Доценко, Е. И. Морковин. — Волгоград : ВолгГМУ, 2022. — 132 с. — ISBN 978-5-9652-0820-3. — Текст :

- электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/338252>
3. Клиническая биохимия: учебное пособие / Т. П. Бондарь, К. С. Светлицкий, Н. И. Ковалевич [и др.]. — Ставрополь: СтГМУ, 2020. — 204 с. — ISBN 978-5-89822-635-0. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/216803>
4. Биохимические исследования в клинической практике: Руководство для врачей / А.А. Кишкун. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2014. — 528 с.: ил.
5. Основы биохимического анализа: лабораторный практикум : учебное пособие / составители О. С. Котлярова, С. М. Чыдым. — Новосибирск : НГАУ, 2020. — 77 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/257708>
6. Лелевич, С. В. Теория и практика лабораторных биохимических исследований : учебное пособие для спо / С. В. Лелевич. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 304 с. — ISBN 978-5-507-50169-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/414779>
7. Сборник ситуационных задач по клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / О. С. Абрамовских, И. В. Батигова, И. А. Лаптева [и др.]. — Челябинск : ЮУГМУ, 2023. — 101 с. — ISBN 978-5-94507-261-9. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/442340>
8. Карпенко, Л. Ю. Биологическая химия : учебное пособие / Л. Ю. Карпенко, А. А. Бахта, А. И. Козицына. — Санкт-Петербург : СПбГУВМ, 2022. — 228 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/366575>
9. Кузнецов, О. Е. Лабораторные исследования в клинике : учебное пособие для спо / О. Е. Кузнецов, С. А. Ляликов. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 500 с. — ISBN 978-5-507-51527-1. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/422633>
10. Лабораторный практикум по биохимии для студентов лечебного и педиатрического факультетов : учебное пособие / О. Л. Носарева, Е. А. Степовая, Е. В. Шахристова, Л. В. Спирина. — 3-е изд., доп. и испр. — Томск : СибГМУ, 2023. — 165 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/369047>