

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 «Биохимия»
для студентов направления подготовки
05.03.06 Экология и природопользование
Направленность (профиль)
Экология и экологическая безопасность

Ставрополь 2026

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 в 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 единении с окружающей средой.

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

Целью биохимии 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 «Биохимия» является изучение основных химических превращений, лежащих в основе жизнедеятельности, с участием биокатализаторов (ферментов), осуществляющих быстро, специфично и организованно 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 «Биохимия» 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 «Биохимия» призван формировать на лабораторных занятиях студентам интерес к биохимии, умение работать в коллективе и лаборатории, чувство ответственности и долга.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ. ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с техникой безопасности при работе в биохимической лаборатории, посудой, приборами, методами подготовки проб и расчета экспериментальных данных.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

1. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

1. Общие требования безопасности

1.1. К работе с химическими веществами допускаются лица, прошедшие инструктаж по охране труда.

1.2. В соответствии с типовыми нормами в лабораторию не допускаются лица, не обеспеченные средствами индивидуальной защиты.

1.3. обязанности работающих в лаборатории:

1.3.1. во время работы быть внимательным, не отвлекаться посторонними делами; соблюдать указания по безопасному обращению с реактивами растворами, наполнению сосудов и т. п.

1.3.2. знать, где находится аптечка с набором медикаментов.

1.4. Запрещается:

1.4.1. пробовать на вкус химические вещества; нюхать какие-либо вещества, вдыхая полной грудью, а не направляя к себе пары движением руки;

1.4.2. нагревать ЛВЖ и ГЖ на открытых электрических плитках;

1.4.3. покидать рабочее место, оставляя без присмотра химические вещества, зажженные горелки и нагревательные приборы;

2. Требования безопасности перед началом работы

2.1. Ознакомиться со свойствами реактивов, с которыми будет проводиться работа, изучить инструкцию (методику) по ее выполнению.

2.2. Проверить целостность посуды.

3. Требования безопасности во время работы

3.1. Во избежание ожогов полости рта, а также возможности отравления, запрещается! набирать растворы кислот и щелочей в пипетку ртом.

3.2. Запрещается! выливать горючие жидкости в канализацию.

4. Требования безопасности в аварийных ситуациях

4.1. При возникновении ситуаций, которые могут привести к аварии или несчастным случаям необходимо немедленно прекратить работу и обесточить электрооборудование.

4.2. В случае возникновения пожара:

4.2.1. немедленно сообщить в пожарную аварийно-спасательную службу по тел. 01, четко назвать адрес учреждения, место пожара, свою фамилию, а также сообщить о наличии в здании людей;

4.2.2. Возникший пожар следует ликвидировать на месте путем прекращения доступа воздуха к горящей зоне. Использовать углекислотные, порошковые огнетушители, мокрые тряпки, одеяло, песок.

4.4. При проливе концентрированных кислот или растворов щелочей, необходимо место пролива засыпать песком, нейтрализовать слабыми растворами щелочей и кислот (2–3%-ными) соответственно, после этого произвести уборку и проветрить помещение. Осколки разбитого стекла собрать при помощи щетки и совка.

4.5. При ожогах кожи кислотами и щелочами следует быстро промыть обожженное место сильной струей воды на протяжении 10–15 мин, затем наложить примочку из раствора пищевой соды (1 ч. л. на стакан воды) – при ожоге кислотой, и из борной кислоты или столового уксуса (1 ч. л. на стакан воды) – при ожоге щелочью.

4.6. При термических ожогах обожженное место следует присыпать содой, крахмалом, тальком или сделать примочки из свежеприготовленных 2%-ных растворов соды, перманганата калия или неразбавленного этилового спирта в зависимости от степени термического ожога.

4.7. При попадании в глаза брызг кислоты или щелочи необходимо промывать длительное время большим количеством воды, направляя нерезкую струю воды прямо в глаз, а затем промыть 3%-ным р-ом пищевой соды (при попадании кислоты) или 2%-ным р-ом борной кислоты (при попадании щелочи). При попадании в глаза посторонних предметов (стекло и др.) удаление их должен проводить только медицинский работник.

4.8. При порезах рук или других частей тела стеклом необходимо удалить из раны мелкие осколки, после чего промыть этиловым спиртом, смазать йодной настойкой и забинтовать.

5. Требования безопасности по окончании работы

5.1. Вымыть посуду, привести в порядок рабочий стол. Закрыть банки с реактивами и поставить их в установленные места хранения.

5.2. Вымыть руки с мылом, снять спецодежду и повесить ее в установленное место.

2. ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА И ОБОРУДОВАНИЕ

В практикуме по биохимии применяют следующую лабораторную посуду:

1. Колбы – круглодонные, плоскодонные, мерные (от 25 мл до 5,0л).
2. Химические стаканы – различных объемов (чаще от 50 мл до 2,0л).
3. Пробирки – цилиндрические иконические.
4. Цилиндры – от 10 мл до 2,0л.
5. Мензурки – от 50 мл до 1,0л.
6. Пипетки – емкостью от 0,1 мл до 100 мл – градуированные и пипетки Мора, автоматические дозаторы.
7. Бюретки и микробюретки.
8. Фарфоровые тигли.
9. Фарфоровые чашки.
10. Фарфоровые ступки.
11. Эксикаторы.
12. Воронки.
13. Посуда для взвешивания – часовые стекла, бюксы, тигли.
14. Стекланные палочки, лопаточки, наконечники.
15. Пипетаторы

Мытье лабораторной посуды

1. Посуду после выполнения лабораторного анализа необходимо промыть в проточной водопроводной воде.

2. Затем тщательно промыть с помощью ершей.

3. Отполоскать от моющего средства с помощью проточной водопроводной воды: 10 раз при использовании при использовании синтетических моющих средств.

4. Прополоскать в дистиллированной воде 3раза.

5. Чистую посуду высушить.

6. 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.
2. Фотоэлектроколориметры.

3. Центрифуги.
4. pH-метры.
5. Иономеры.
6. Весы: аналитические, торсионные, технические.
7. Термостат.
8. Хроматографические камеры.
9. Автоматические анализаторы.
10. Горелки газовые
3. **ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ РАЗНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ**

Таблица - Способы выражения концентрации растворов

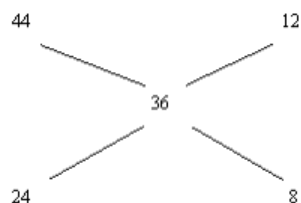
Обозначение	Название и определение
m	Молярная весовая концентрация (моляльность) – число молей растворённого вещества, приходящееся на 1000 г растворителя
C_M	Молярная объёмная концентрация (молярность) – число молей растворённого вещества, содержащееся в 1 л раствора
C_N	Нормальность – число грамм-эквивалентов растворённого вещества, содержащееся в 1 л раствора
T	Титр – число граммов растворённого вещества, содержащееся в 1 мл раствора
P	Весовой процент (процентная концентрация) – число граммов растворённого вещества, содержащееся в 100 г раствора

Взаимосвязь между молярной концентрацией, молярной концентрацией эквивалента и массовой долей растворенного компонента и титром приводится в формулах, приведенных в таблице.

Таблица - Формулы пересчета концентраций растворов

Определяемая концентрация	Исходная концентрация			
	ω	C_M	C_N	T
Процентная $\omega, \%$	$\frac{m_{\text{вещ.}}}{m_{\text{р-ра}}} \cdot 100\%$	$\frac{C_M \cdot M}{10 \cdot \rho}$	$\frac{C_N \cdot M \cdot f_{\text{экв}}}{10 \cdot \rho}$	$\frac{T \cdot 100}{\rho}$
Молярная $C_M, \text{моль/л}$	$\frac{\omega \cdot 10 \cdot \rho}{M}$	моль/л	$C_N \cdot f_{\text{экв}}$	$\frac{T \cdot 1000}{M}$
Нормальная $C_N, \text{моль экв/л}$	$\frac{\omega \cdot 10 \cdot \rho}{M \cdot f_{\text{экв}}}$	$\frac{C_M}{f_{\text{экв}}}$	моль экв/л	$\frac{T \cdot 1000}{M \cdot f_{\text{экв}}}$
Титр $T, \text{г/мл}$	$\frac{\omega \cdot \rho}{100}$	$\frac{C_M \cdot M}{1000}$	$\frac{C_N \cdot M \cdot f_{\text{экв}}}{1000}$	г/мл
Примечание	ρ – плотность раствора, г/см ³ ; $f_{\text{экв}}$ – фактор эквивалентности; M – молярная масса вещества, г/моль; m – масса, г			

При приготовлении растворов определенной концентрации или из двух имеющихся растворов того же вещества часто пользуются правилом креста.



В левый угол воображаемого прямоугольника следует поместить более высокую концентрацию – 44, в нижний левый – меньшую концентрацию – 24, а в центр – концентрацию получаемого смешанного раствора – 36.

Затем надо вычесть по диагонали из большего числа меньшее (принцип правила креста):

$$44 - 36 = 8$$

$$36 - 24 = 12$$

Отношение разностей $12 : 8 = 3 : 2$ покажет, в каком весовом соотношении следует смешать исходные растворы для получения раствора заданной концентрации.

Таблица - Разбавление раствора чистым растворителем

Исходные растворы	Концентрация исходных растворов, %	Требуемая концентрация %	Принцип правила креста	Следует смешать
Раствор	96	40	$40 - 0 = 40$	40 весовых частей
Чистый растворитель	0		$96 - 40 = 56$	56 весовых частей

Таблица - Получение более концентрированного раствора

Исходные растворы	Концентрация исходных веществ, %	Требуемая концентрация %	Принцип правила креста	Следует смешать
Твердое вещество	100	55	$55 - 35 = 20$	20 весовых частей
Раствор	35		$100 - 55 = 45$	56 весовых частей

4. ПРИГОТОВЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ

В биохимических исследованиях используются растительные и животные ткани, а также продукты жизнедеятельности животных и человека.

Перед началом анализа исследуемый образец взвешивают на аналитических весах, а затем ткань измельчают.

Перед началом экстракции из разрушенных тканей животных и растений необходимо правильно подобрать растворитель. Экстракцию полярных, заряженных соединений проводят, используя полярные растворители (вода, 50%-ный раствор этанола). Экстракцию гидрофобных компонентов гомогената тканей проводят с использованием неполярных растворителей (гексан, хлороформ, диэтиловый эфир и др.).

Вытяжку готовят путем настаивания порошка в 50% этаноле в соотношении 1:20 (1 г растительного порошка настаивают на 20 мл 50% этанола).

Отделение неразрушенных клеток и ядер проводят центрифугированием со скоростью 3000 об/мин. Полученный после центрифугирования супернатант хранят в холодильнике при +4°C.

5. ОТРАБОТКА ПРАКТИЧЕСКИХ НАВЫКОВ ПОЛЬЗОВАНИЯ ПИПЕТКАМИ

В биохимии для точного отбора определенного объема жидкости используют стеклянные и автоматические (механические) пипетки. Автоматические пипетки могут быть фиксированного или переменного объема. Пипеткой с фиксированным объемом можно набирать только тот объем, который указан на данной пипетке. В пипетке с переменным объемом можно выбирать объем, необходимый для анализа, в указанном диапазоне. Задать нужный объем можно с помощью специального регулировочного приспособления на корпусе пипетки.

При работе с автоматическими пипетками нужно соблюдать следующие правила:

- 1) с помощью регулировочного приспособления установить необходимый объем;
- 2) к нижней части пипетки герметично присоединить соответствующий наконечник, размер которого зависит от объема набираемого раствора;
- 3) нажать большим пальцем на поршень пипетки до первого упора и погрузить наконечник в раствор примерно на 0,5 см;
- 4) плавно отпустить палец и произвести забор жидкости до метки на наконечнике;
- 5) перенести пипетку в пробирку, нажать большим пальцем на поршень до второго упора, чтобы весь раствор оказался в пробирке, и поршень отпустить.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Техника безопасности в биохимической лаборатории.
2. Способы выражения концентрации растворов.
3. Правило креста для приготовления растворов.
4. Какую лабораторную посуду применяют в биохимической лаборатории?
5. Правила мытья лабораторной посуды.
6. Какое лабораторное оборудование используют в биохимии?
7. Приведите примеры приготовления растительных и животных образцов.
8. Правила работы с автоматическими дозаторами.
9. Основные принципы биохимических исследований.
10. Статистическая обработка результатов анализ.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. РЕАКЦИЯ СРЕДЫ. ВОДОРОДНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ. БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ. ИНДИКАТОРЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: исследовать влияние различных условий на pH буферных систем и буферную емкость.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Постоянство концентрации ионов водорода – необходимое условие правильного протекания биохимических процессов. pH влияет на структуру и активность биологических макромолекул, поэтому небольшое изменение pH может вызвать значительные изменения в структуре и функциях белка. Измерение pH крови и мочи обычно используется в медицинской диагностике. Например, pH плазмы крови людей с тяжелым, неконтролируемым сахарным диабетом составляет 7,2, что ниже нормального значения 7,35-7,45; это условие называется ацидоз. При некоторых других заболеваниях уровень pH крови выше нормы, что называется алкалозом. Сильный ацидоз или алкалоид может представлять угрозу для жизни.

1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ БУФЕРНЫХ РАСТВОРОВ

Буферные растворы – это растворы, при внесении в которые малых количеств кислоты или щелочи значение pH не изменяется. Они применяются в разных областях: биология - для поддержания физиологических условий при работе с ферментами, белками и нуклеиновыми кислотами, химия - для создания постоянных условий титрования, экстракции, хроматографии и спектрофотометрии, фармация - буферные системы обеспечивают стабильность лекарственных препаратов, оптимизируют биодоступность веществ, создают изотонические условия для инъекционных растворов.

1.1. Приготовление ацетатного буфера

Для pH 4,0 берут 0,58 г CH_3COONa + 0,18 мл CH_3COOH на 100 мл дист воды. После приготовления определить pH с помощью универсальной индикаторной бумаги

1.2. Приготовление карбонатного буфера

Для pH 10,0 берут 0,21 г NaHCO_3 + 0,11 г Na_2CO_3 на 100 мл дист воды. После приготовления определить pH с помощью универсальной индикаторной бумаги

1.3. Приготовление фосфатного буфера

Широко используемый для работы с клетками крови фосфатный буфер (pH 5,8–8,2) приготавливается следующим образом:

Раствор А: Динатриевый фосфат 1/15 моль/л: растворить 11,876 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ или 23,882 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ в 1000 мл воды.

Раствор В: KH_2PO_4 1/15 моль/л: растворить 9,078 г KH_2PO_4 в 1000 мл воды.

Для получения буфера с определенной pH необходимо смешать растворы А и В в нижеуказанных соотношениях (табл.). Сделайте буфер с pH 7, проверьте по лакмусу.

Таблица — Соотношение растворов А и В для достижения заданной pH

pH	Раствор А в мл	Раствор В в мл	pH	Раствор А в мл	Раствор В в мл
5,8	8,0	92,0	7,2	72,0	28,0
5,9	9,9	90,1	7,25	74,4	25,6
6,0	12,2	87,8	7,3	76,8	23,2
6,1	15,3	84,7	7,35	78,9	21,1
6,2	18,6	81,4	7,4	80,8	19,2
6,3	22,4	77,6	7,45	82,5	17,5
6,4	26,7	73,3	7,5	84,1	15,9
6,5	31,8	68,2	7,55	85,7	14,3
6,6	37,5	62,5	7,6	87,0	13,0
6,7	43,5	56,5	7,65	88,2	11,8
6,8	49,6	50,4	7,7	89,4	10,6

6,85	52,5	47,5	7,75	90,5	9,5
6,9	55,4	44,6	7,8	91,5	8,5
6,95	58,2	41,8	7,5	93,2	6,8
7,0	61,1	38,9	8,0	94,7	5,3
7,05	63,9	36,1	8,1	95,8	4,2
7,1	66,6	33,4	8,2	97,0	3,0
7,15	69,2	30,8	—	—	—

2. БУФЕРНЫЕ СВОЙСТВА РАСТВОРА БЕЛКА

Подготовьте две пробирки. В первую пробирку внесите 10 капель раствора белка и постепенно по каплям прибавьте раствор соляной кислоты с индикатором конго. Отметьте изменение окраски раствора по мере постепенного добавления избытка кислоты с конго.

Во вторую пробирку внесите 10 капель раствора белка и добавьте постепенно по каплям раствор гидроксида натрия с фенолфталеином. Отметьте окраску раствора при добавлении избытка щелочи. Почему не сразу изменяется окраска индикатора?

1. ПРИРОДНЫЕ ИНДИКАТОРЫ

Мелко измельчите листья краснокочанной капусты или другого растительного сырья, содержащего антоцианы (воспользуйтесь песком и ступкой) и поместите биоматериал в стакан, залив водно-спиртовой смесью, либо поместить небольшое количество биоматериала в пробирку с водой и закипятить. Окрашенный раствор отфильтруйте с помощью складчатого фильтра.

Полученный экстракт разлить по 1 мл в несколько пробирок и добавить по 0,5 мл реактивов с разным pH, определенными в предыдущем опыте. Результаты наблюдения занесите в таблицу.

Таблица – Определение окраски природных индикаторов

Цвет фильтрата	pH								
	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Исходная вытяжка антоцианов будет иметь фиолетовый цвет. В сильнокислой среде (pH 1—2) она приобретает красный, а при pH 3—5 —розовый цвет. В результате нейтрализации розово-красный цвет изменяется сначала на фиолетовый (нейтральная среда, pH 6—7), затем на сине-бирюзовый (pH 8-9), зеленый (pH 10-11) и в сильно щелочной среде на желтый (pH 12).

К красному или розовому раствору добавьте ее несколько капель щелочи. Наблюдается появление синего и зеленого окрашивания.

К зеленоватому или синему раствору добавьте ее несколько капель кислоты. Наблюдается повторное появление красного окрашивания.

Можно повторить весь цикл изменения окраски антоциановых растворов под действием кислот и щелочей несколько раз.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ БУФЕРНОЙ ЕМКОСТИ МОЛОКА (ПО П.Ф. ДЬЯЧЕНКО)

Буферная емкость нормального молока по кислоте составляет около 1,74, а по щелочи — 1,08.

Ход работы

В две конические колбы вместимостью 150-200 см³ пипеткой вносят по 10 см³ молока.

В одну из них добавляют 3 капли 1%-ного раствора фенолфталеина и титруют из бюретки раствором гидроксида натрия с $C_{\text{э}} = 0,1$ моль/дм³ до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Объем щелочи ($V_{\text{щ}}$) записывают.

В другую колбу с молоком добавляют 5-7 капель 0,1%-ного раствора метилового красного и титруют из бюретки раствором соляной кислоты с $C_{\text{э}} = 0,1$ моль/дм³ до появления красного окрашивания. Объем кислоты ($V_{\text{к}}$) записывают.

Обработка результатов: буферную емкость по щелочи ($B_{щ}$) вычисляют по формуле (1), а емкость по кислоте (B_k) по формуле (2):

$$(1) B_{щ} = \frac{K_{щ}}{(pH_{кон} - pH_{нач}) * 10}$$

$$B_k = \frac{K_k}{(pH_{кон} - pH_{нач}) * 10} \quad (2)$$

где K_k объем раствора гидроксида натрия, израсходованного на титрование 100 см³ молока, см³ ($K_{щ} = V_{щ} \times 10$);

K_k объем раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование 100 см³ молока, см³ ($K_k = V_k \times 10$);

$pH_{нач}$ — значение pH исследуемого молока;

$pH_{кон}$ значение pH молока в конце титрования щелочью или кислотой (при титровании щелочью $pH_{кон}$ 8,2, а при титровании кислотой $pH_{кон}$ 4,7);

10 коэффициент пересчета растворов щелочи или кислоты с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм³ в концентрацию 1 моль/дм³.

5. БУФЕРНАЯ ЕМКОСТЬ СЛЮНЫ

Кислую и основную емкость слюны можно определить по методу В.К.Леонтьева.

Ход работы

Предварительно измеряют pH слюны. Затем в к 1 мл слюны добавляют 1 мл 0,01 N раствора HCl и вновь измеряют pH. Параллельно к такому же объему слюны добавляют 1 мл 0,01 N раствора NaOH и также измеряют pH. Расчет производят по формуле:

$$B = 10 / (pH_0 - pH_1) * V,$$

где B — буферная емкость 1 л слюны (в мг-экв кислоты или щелочи);

10 — коэффициент пересчета на 1 л слюны;

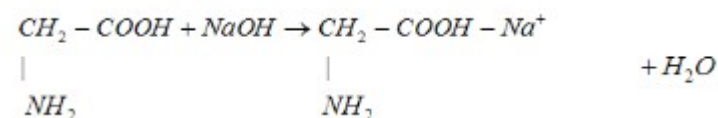
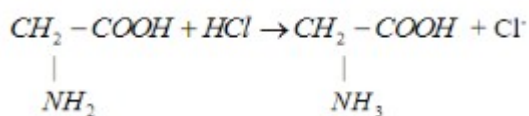
$pH_0 - pH_1$ — разница в единицах pH до и после прибавления кислоты или щелочи;

V — количество (мл) слюны взятой для анализа.

6. БУФЕРНАЯ ЕМКОСТЬ АМИНОКИСЛОТ

Вследствие наличия в молекулах аминокислот функциональных групп кислотного и основного характера α -аминокислоты являются амфотерными соединениями, т.е. они образуют соли как с кислотами, так и со щелочами.

Указанные реакции объясняют значительную буферную ёмкость растворов аминокислот. При титровании раствора аминокислоты щелочью или кислотой pH сдвигается значительно меньше, чем при добавлении щелочи или кислоты к воде.



Ход работы

Проведите опыт по схеме, приведенной в таблице, отметьте результаты.

Таблица – Исследование буферной емкости аминокислот

№	Исследуемая жидкость	Индикатор	Раствор для титрования	Количество титранта, мл	pH
1	1 мл глицина	фенолфталеин	0,1 н NaOH		
2	1 мл воды	фенолфталеин	0,1 н NaOH		
3	1 мл глицина	метилоранж	0,1 н HCl		
4	1 мл воды	метилоранж	0,1 н HCl		

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Что такое буферные системы. Приведите примеры, напишите формулы.
2. Почему разведение буфера практически не влияет на величину рН? При каких условиях возможно изменение рН буфера? Какие показатели характеризуют кислотно-основное состояние в организме человека?
3. Ацидоз. Причины и варианты коррекции. Алкалоз. Причины и варианты коррекции.
4. Расчеты рН при приготовлении растворов по уравнению Гендерсона - Гассельбаха.
5. Индикаторы и свойства, применение, сложные индикаторы
6. Природные индикаторы, их применение. Что такое буферная емкость? Биологическое значение. Примеры.
7. Почему буферная емкость в плазме крови выше по кислоте, чем по щелочи?
8. Какие буферные системы находятся в организме человека? Какая наиболее значимая?
9. Способы расчета буферной емкости. Напишите формулы.
10. Буферные системы организма человека – бикарбонатная. Напишите формулы.
11. Буферные системы организма человека – фосфатная. Напишите формулы
12. Буферные системы организма человека – белковая. Напишите формулы
13. Буферные системы организма человека – амонийная. Напишите формулы
14. Буферные системы организма человека – гемоглобиновая. Напишите формулы
15. Способы определения буферной емкости.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3. ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА АМИНОКИСЛОТЫ

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

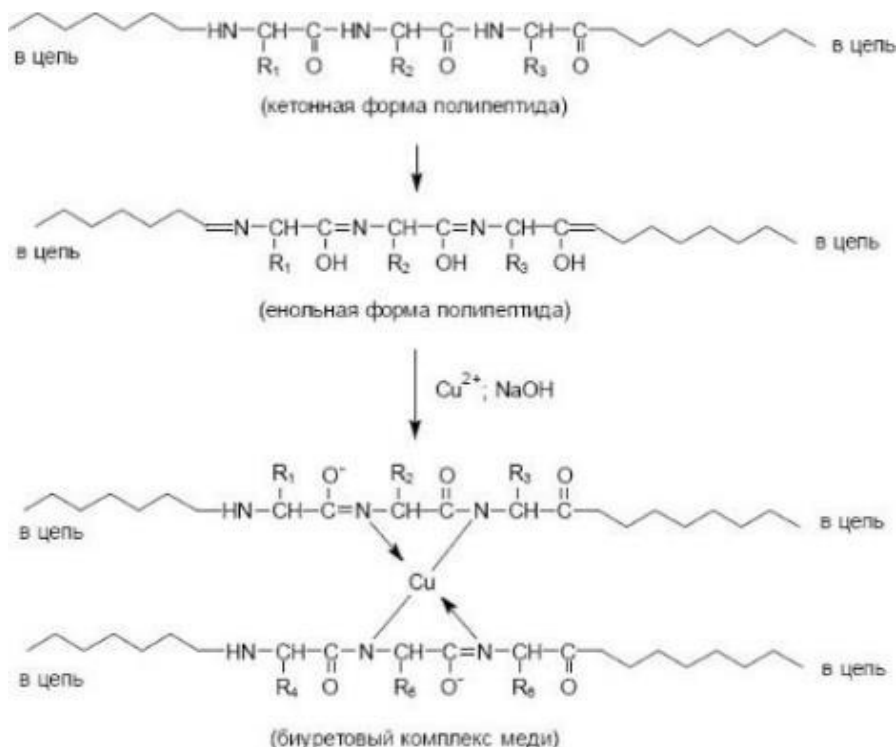
ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

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.

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. Биуретовую реакцию дают пептиды, содержащие минимум три остатка аминокислот.

Ход работы

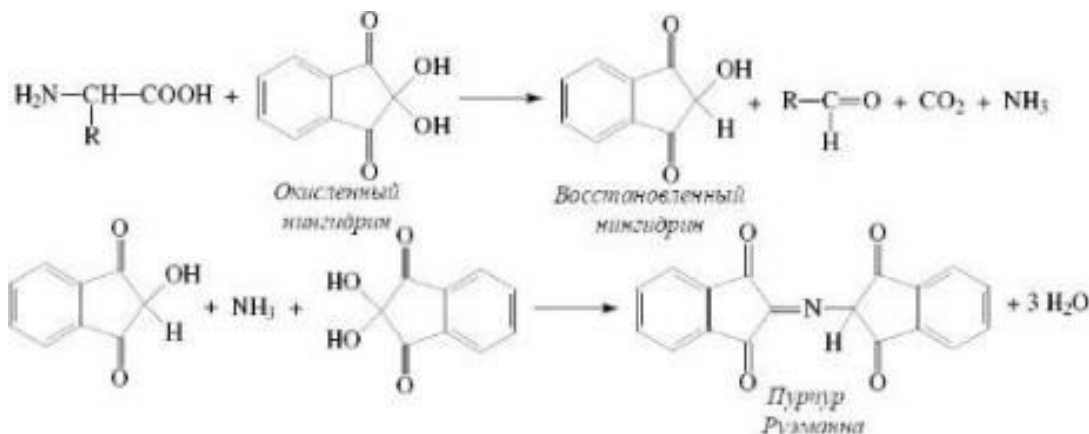
Берут пять пробирок и вносят по 1 мл: в первую – воды, во вторую – раствора казеина, в третью – раствора яичного белка, в четвертую – раствора желатина, в пятую – раствора α -аминокислоты. В каждую пробирку добавляют по 2 мл 10% раствора NaOH и по 3-4 капли 1% раствора CuSO_4 . Содержимое каждой пробирки перемешивают встряхиванием и оставляют при комнатной температуре на 10 мин для развития окраски. При малом содержании белка чувствительность реакции можно повысить путем наслоения на раствор белка в щелочи 1 мл 1% раствора CuSO_4 .

Таблица - Биуретовая реакция на белки и аминокислоты

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

2. НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (РЕАКЦИЯ РУЭМАННА)

При нагревании белков и полипептидов с нингидрином образуется синее окрашивание. Эта реакция обусловлена присутствием аминокислот со свободной аминогруппой, которые реагируют с нингидрином, причем образуются альдегид, аммиак, CO_2 и восстановленный нингидрин. Восстановленная форма нингидрина реагирует с избытком нингидрина и с аммиаком. При этом образуется продукт конденсации синефиолетового цвета. Окраска чувствительна к $[\text{H}^+]$, поэтому нингидриновую реакцию ведут в нейтральном растворе. Кроме того, аммиак и альфа-аланин также дают положительную нингидриновую реакцию. Чувствительность реакции может быть повышена добавлением



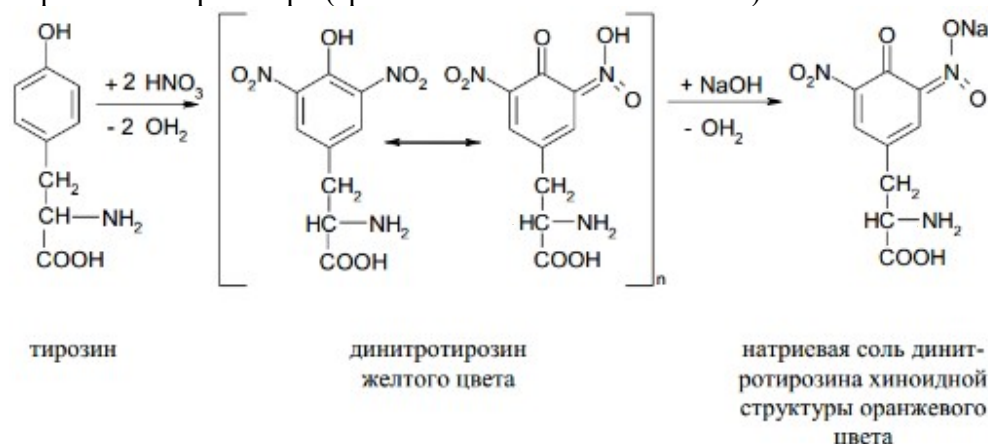
аскорбиновой кислоты.

Ход работы

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

3. ОТКРЫТИЕ ТИРОЗИНА, ТРИПТОФАНА И ФЕНИЛАЛАНИНА (КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ МУЛЬДЕРА)

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).



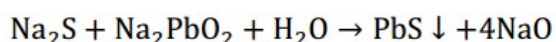
При этом происходит образование нитросоединений триптофана и тирозина. Если далее к полученному раствору осторожно добавить едкой щелочи или аммиака, то появляется красноватооранжевое окрашивание. Это окрашивание обусловлено образованием солей таутомерных ациформ нитросоединений – нитроновых кислот.

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.

Ход работы

К 1 мл раствора белка добавляют 0,2-0,3 мл конц. HNO_3 , 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) конц. раствора NaOH или NH_3 . Выпадает осадок кислотного альбумината, образующий с избытком щелочи ярко-оранжевый раствор.

4. ОТКРЫТИЕ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ (РЕАКЦИЯ ФОЛЯ)

$$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{SH} \\ | \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ | \\ \text{COOH} \end{array} + 2 \text{NaOH} \longrightarrow \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}-\text{OH} \\ | \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\ | \\ \text{COOH} \end{array} + \text{Na}_2\text{S} + \text{OH}_2$$


Ход работы

5. ОТКРЫТИЕ ТРИПТОФАНА (РЕАКЦИЯ АДАМКЕВИЧА)

$$\text{HOOC}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{H} \xrightarrow{\text{H}_2\text{SO}_4} \text{CO}_2 + \text{H}-\overset{\overset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{H}$$

(глиоксиловая кислота) (формальдегид)

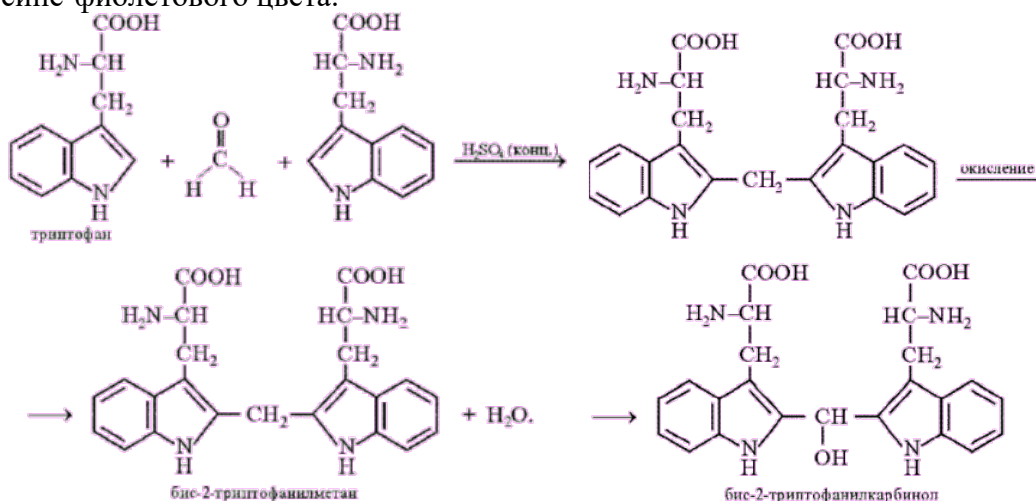
15

Ход работы

В пробирку наливают несколько капель белка, прибавляют 1 мл CH_3COOH и, сильно наклонив пробирку, очень осторожно, по стенке, подслаивают около 1 мл конц. H_2SO_4 так, чтобы обе жидкости не смешивались. Через 10 мин на границе двух жидкостей получается красно-фиолетовое кольцо.

6. ОТКРЫТИЕ ТРИПТОФАНА (РЕАКЦИЯ ВАУЗЕНА)

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.

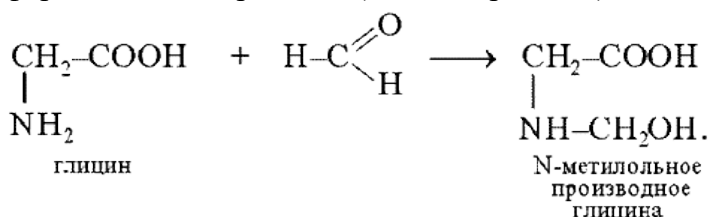


Ход работы

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 конц. H_2SO_4 , охлаждая пробирку во льду. Через 10 мин добавляют, перемешивая, 5 капель 0,5% раствора NaNO_2 . Появляется сине-фиолетовая окраска.

7. РЕАКЦИЯ С ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

Эта реакция лежит в основе количественного определения аминокислот методом формального титрования (метод Сёренсена).

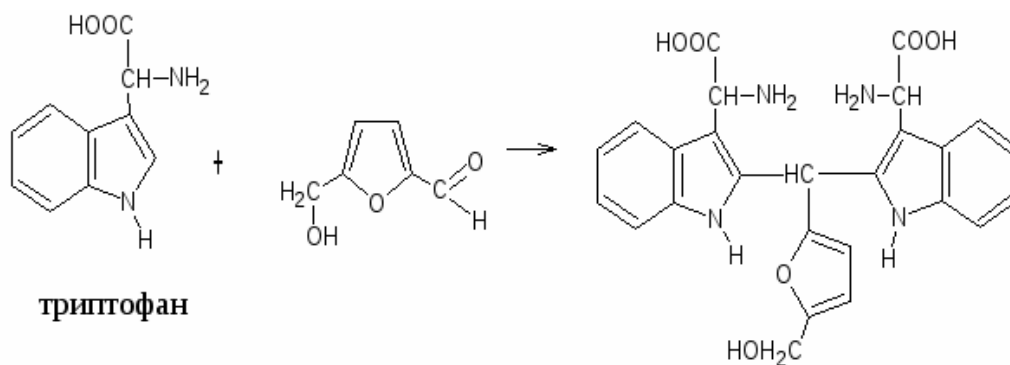


Ход работы

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

8. ОТКРЫТИЕ ТРИПТОФАНА (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.



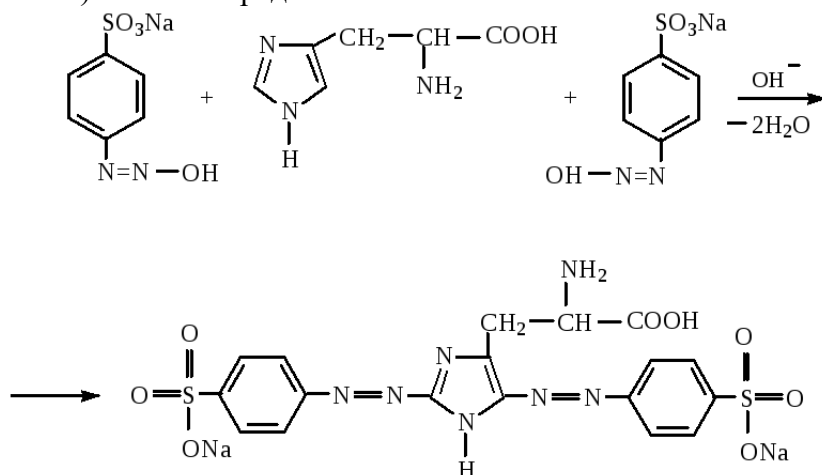
Ход работы

К 1 капле неразбавленного яичного белка добавляют 1-2 капли 10% раствора сахарозы и пипеткой осторожно по стенке пробирки подслаивают около 1 мл конц. H_2SO_4 .

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.

9. ОТКРЫТИЕ ГИСТИДИНА И ТИРОЗИНА (РЕАКЦИЯ ПАУЛИ)

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.

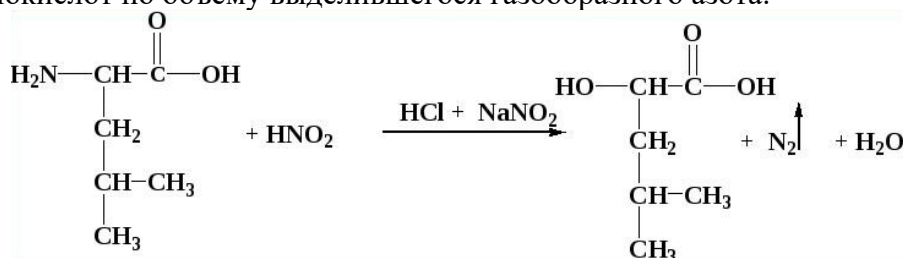


Ход работы

К 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты в 5% HCl прибавляют 2 мл 0,5% раствора NaNO_2 , тщательно перемешивают, добавляют 1 мл 1% раствора тирозина или гистидина. Перемешивания и добавьте 2 мл 10% раствора Na_2CO_3 . После встряхивания наблюдаем вишнево-красный цвет.

10. РЕАКЦИИ С АЗОТИСТОЙ КИСЛОТОЙ (РЕАКЦИЯ ВАН-СЛАЙКА)

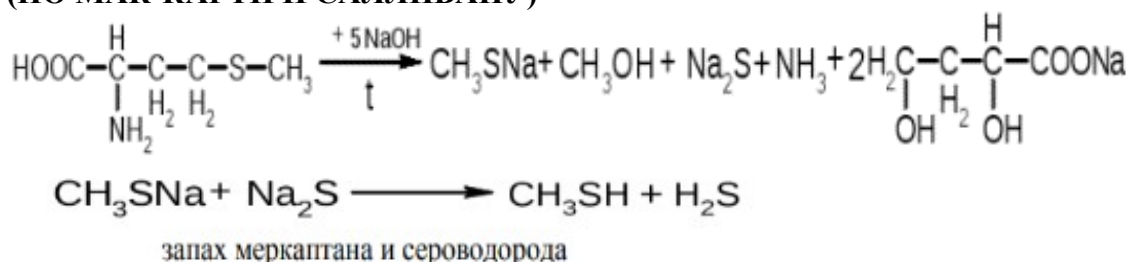
Реакция Ван Слайка — это реакция определения первичной аминогруппы в алифатических аминах. Она используется для количественного определения аминокислот по объёму выделившегося газообразного азота.



Ход работы

К 2 мл 10% раствора аланина приливают 2 мл 10% раствора NaNO_2 , 2 капли ледяной CH_3COOH и встряхивают. Выделяются пузырьки газообразного азота.

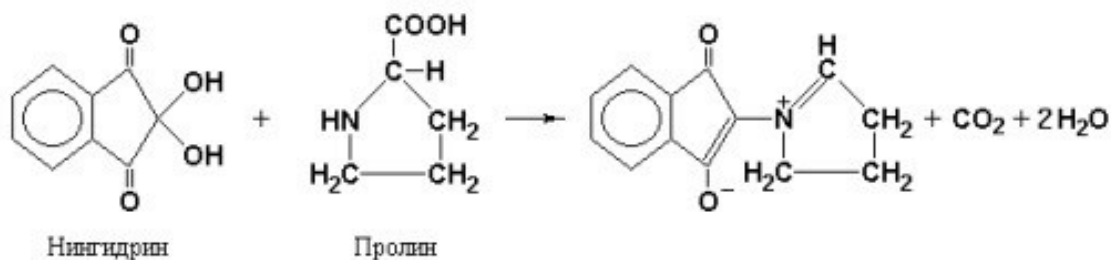
11. ЦВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ НА СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТЫ (ПО МАК-КАРТИ И САЛЛИВАНУ)



Ход работы

Берут 3 пробирки. В первую вносят 1 мл 0,02 %-ного раствора метионина, во вторую 1 мл 0,02 %-ного раст цистеина, в третью 1 мл 1% раствора белка. В каждую пробирку прибавляют при помешивании сначала 0,5 мл 25% раствора гидроксида натрия, а затем вносят 1-2 капли свежеприготовленного 5%- ного раствора нитропруссиды натрия. Смесь нагревают 5 мин на водяной бане при температуре 40 С. Затем ее охлаждают 2 мин в ледяной воде и добавляют при помешивании 1 мл смеси соляной и 1 мл фосфорной кислот. Смесь взбалтывают и оставляют при комнатной температуре. Спустя время развивается яркая красно-фиолетовая окраска:

12. ЦВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ ПРОЛИНА С НИНГИДРИНОМ



Ход работы

В пробирке к 3 мл 0,01 %-ного раствора пролина прибавляют несколько капель 1%-ного раствора нингидрина в 95 %-ном ацетоне. Содержимое пробирки перемешивают и нагревают на водяной бане при 70 °С в течение 5 мин. Развивается ярко-желтая окраска в результате возникновения продукта конденсации пролина с нингидрином.

13. РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

В пробирки поместить по 5 капель растворов: в первую пробирку — аланина или глицина, во вторую — глутаминовой или аспарагиновой кислоты, в третью — аргинина или лизина.

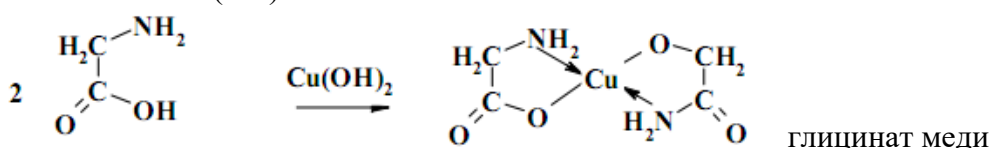
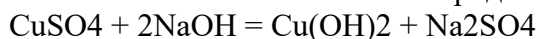
Во всех пробирках универсальным индикатором измерить уровень pH. Сделайте заключение о реакции среды. Результаты опыта занести в таблицу.

Таблица - Реакции аминокислот в водных растворах

№	Название аминокислоты	pH	Формула аминокислоты	К какой группе по классификации относится аминокислота
1				
2				
3				

14. ПОЛУЧЕНИЯ КРИСТАЛЛОВ АМИНОКИСЛОТ

При действии глицина на соль меди (II) образуется не обычная медная соль, а комплексное хелатное соединение (от греч. слова *hela* – клешня), в котором атом меди связан не только с атомом кислорода гидроксила, но и с атомом азота аминогруппы.



14.1. Получение медного комплекса глицина

Ход работы

В пробирку с 1 мл 1% глицина раствора добавить столько же раствора щелочи и несколько капель раствора CuSO_4 . Пробирку взболтать. Полученные кристаллы вылить на предметные стёкла и оставить высыхать. Рассмотреть образовавшиеся кристаллы под микроскопом и зарисовать их.



Рисунок – Кристаллы медного комплекса глицина при наблюдении под микроскопом

14.2. Получение хелатных комплексов аминокислот

При взаимодействии водных растворов аминокислот со свежесосажденными гидроксидами никеля (II) и других металлов образуются комплексные соединения хелатного типа.

Ход работы

Поместите в первую пробирку 1 мл 1% раствора аланина, туда же добавьте несколько кристаллов карбоната кальция. Содержимое пробирки перемешайте и нагрейте. Добавьте в пробирку 2 капли 2 н гидроксида натрия. Выпадение осадка гидроксида меди (II), как это наблюдается с обычными солями меди, не происходит. Во второй пробирке проведите аналогичный опыт используя соль никеля. В третьей пробирке проведите аналогичный опыт используя раствор хлорида железа (III). Какие изменения наблюдаете?

15. ИССЛЕДОВАНИЕ НАЛИЧИЯ БЕЛКА И СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

Цветные реакции на белок и аминокислоты используют в биохимических исследованиях для контроля полноты удаления белка из жидкости и оценки наличия белка и аминокислот в биологических средах, в фармации для качественного анализа белковых лекарственных средств.

Ход работы

В пробирку добавляют 1 мл слюны и проводят биуретовую реакцию, определяя наличие/отсутствие белка в пробах. Дальнейшие действия зависят от наличия или отсутствия белка в пробе:

1) если жидкость не содержит белок, то ее в количестве 10 капель помещают в другую пробирку, где проводят нингидриновую реакцию с целью определения наличия/отсутствия α -аминокислот;

2) если в биологической жидкости присутствует белок, то берут 20 капель жидкости, добавляют 5 капель 10 % раствора ТХУ и нагревают до осаждения белка. Белок отделяют фильтрованием через бумажный фильтр (предварительно смочив фильтр водой).

В безбелковой надосадке/фильтрате определяют наличие/отсутствие α -аминокислот нингидриновой реакцией.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Общая характеристика аминокислот и их строения.
2. Номенклатура аминокислот. Примеры
3. Физические свойства аминокислот
4. Классификация аминокислот (примеры разных классов).
5. Изомерия аминокислот, примеры.
6. Непротеиногенные аминокислоты, значение, примеры.
7. Роль протеиногенных аминокислот.
8. Особенности строения пептидной связи.
9. Как соединяются аминокислоты в молекуле белка, и за счет каких групп? Напишите уравнение образования пептида из любых разных 3 аминокислот.
10. Цветные реакции на аминокислоты. Напишите химизм реакций

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: научиться определять аминокислоты.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Аминокислоты – класс органических соединений, содержащих одновременно карбоксильные и аминогруппы. Все аминокислоты разделены на группы. Рациональный способ учитывает различия в полярности R-групп, которые подразделяются на четыре основных класса: а) гидрофобные или неполярные; б) полярные, но незаряженные; в) отрицательно заряженные; г) положительно заряженные.

1. БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ АМИНОКИСЛОТ

Бумажная хроматография (БХ) широко применяется для анализа аминокислот и других полярных соединений. Носителем неподвижной фазы служит фильтровальная бумага.

Приготовление реактивов

Растворитель 1: смесь бутилового спирта с уксусной кислотой и дистиллированной водой в объемном соотношении 4:1:2.

Растворитель 2: смесь изопропанол – H₂O в соотношении 5:5

Проявитель: 200 мг нингидрина растворяют в 100 мл ацетона.

Аминокислоты: растворы аминокислот-метчиков или «свидетелей» (10 мг каждой из аминокислот, взятых для приготовления смеси, растворяют в отдельных флаконах в 10 мл раствора с объемной концентрацией этанола 80 %).

Ход работы

В сосуд для хроматографии наливают элюирующий раствор слоем в 2-3 мм, накрывают крышкой и оставляют на 20-30 минут для насыщения парами системы хроматографической камеры. R_f для аминокислот в системах приведен в таблице 1.

Таблица 1 - Коэффициенты подвижности аминокислот (R_f)

Аминокислота	R _f	
	Система 1	Система 2
Аргинин	0,15	0,07
Пролин	0,34	0,56
Глицин	0,23	0,63
Лейцин	0,70	0,83

1. Подготовка бумаги

Вырезают полосу бумаги длиной 10 см и шириной 5 см. На расстоянии 1,5 см от конца полосы проводят остро отточенным простым карандашом стартовую линию и отмечают точки нанесения образцов на расстоянии 1 см от краёв и друг от друга. Точки можно подписать тем же карандашом.

ВНИМАНИЕ! Нужно избегать прикосновений пальцев к поверхности хроматографической бумаги, так как отпечатки пальцев могут дать окрашивающиеся нингидрином пятна, которые затрудняют обработку результатов.

2. Нанесение образцов

Образцы наносят тонко заточенной спичкой или наконечником от дозатора. Диаметр пятен при нанесении не должен превышать 2-3 мм.

3. Хроматографирование.

В сосуд для хроматографии с заранее налитым элюирующим раствором вставляют лист бумаги с нанесёнными образцами. Закрывают сосуд крышкой и хроматографируют до тех пор, пока фронт растворителя не дойдёт до расстояния 1-1,5 см от верхнего края бумаги. После этого бумагу достают из камеры и высушивают в строго горизонтальном положении (можно в сушильном шкафу при температуре 60-70°C).

4. Проявление хроматограммы нингидрином.

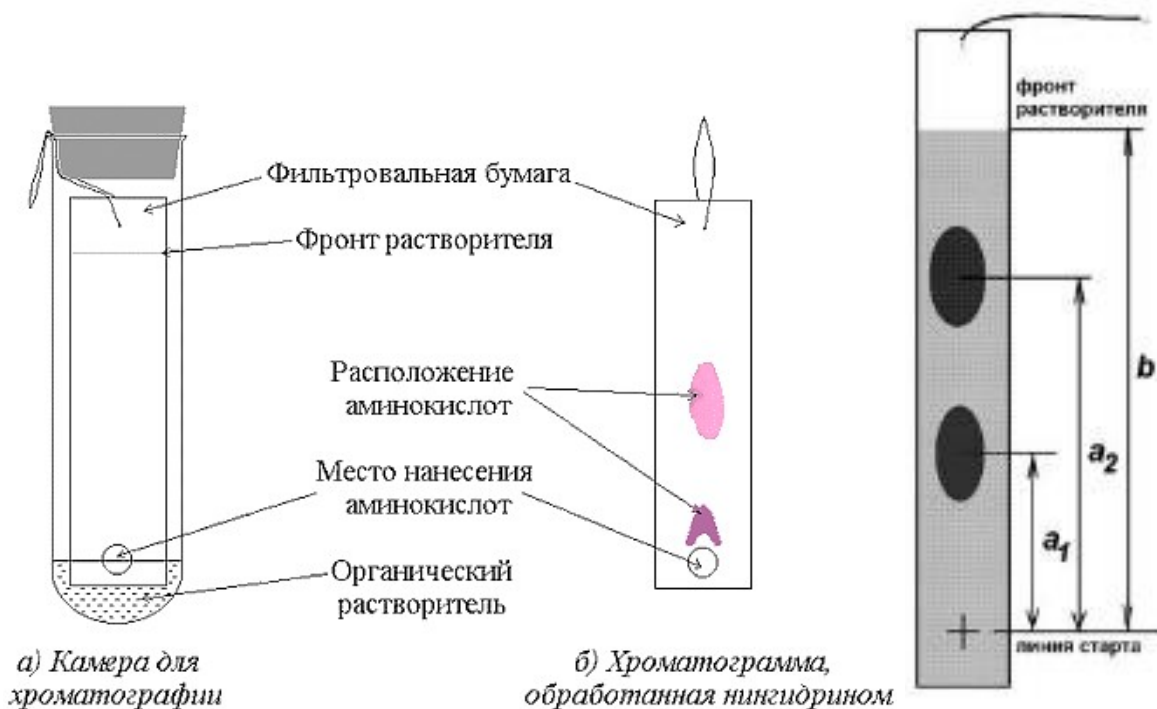
0,2%-ный раствор нингидрина в ацетоне наливают в пульверизатор и равномерно опрыскивают находящуюся в вертикальном положении хроматограмму, высушивают под тягой и помещают в сушильный шкаф (температура – 60-70°C) на 5-10 минут.

5. Расчет значения R_f

Рассчитывают значение R_f для каждой аминокислоты. R_f - коэффициент подвижности:

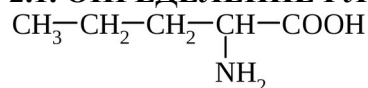
$$R_f = a/b,$$

где а и b, соответственно, расстояния в миллиметрах, пройденные веществом и фронтом растворителя. Для данной системы растворителей, величина R_f каждого компонента – const.



2. ТИТРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

2.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ



Анализируемый раствор титруют раствором щелочи NaOH в присутствии индикатора бромтимолового синего.

Приготовление реактивов

Раствор гидроксида натрия 0.1 н: 2 г NaOH помещают в мерную колбу, объемом 500 см³, добавляют немного дистиллированной воды, перемешивают до полного растворения щелочи и доводят объем раствора до метки колбы дистиллированной водой.

Водный раствор индикатора бромтимолового синего: точную навеску 0.02 г бромтимолового синего помещают в мерную колбу объемом 50 см³, добавляют 0.32 мл 0.1 н раствора NaOH, доводят объем раствора до метки колбы свежeproкипяченной охлажденной водой.

Ход работы

Точную навеску препарата 0,2 г помещают в коническую колбу, добавляют 20 мл свежeproкипяченной воды, греют на водяной бане в течение 10 мин. до растворения навески препарата, доводят объем раствора до 50 мл дистиллированной водой.

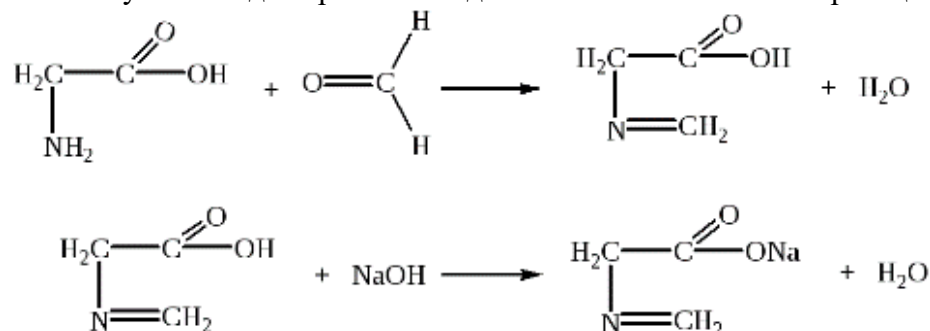
Отбирают аликвоту градуированной пипеткой, объемом 5 см³, добавляют 15 мл дистиллированной воды, 5 капель раствора индикатора 0,05% раствора бромтимолового синего.

Титруют 0,1 н. раствором NaOH до перехода желтой окраски в голубовато-зеленую.

1 мл 0,1 н. раствора натрия гидроксида соответствует 14,71 мг глутаминовой кислоты.

2.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИЦИНА

Используют метод титрования отдельных навесок. Химизм реакции



Предварительные расчеты:

$$M(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) = 75,03 \text{ г/моль};$$

$$f_3(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) = 1;$$

$$M_3(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) = M(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) \cdot f_3(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH});$$

$$M_3(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) = 75,03 \cdot 1 = 75,03 \text{ г/моль};$$

$$M_3'(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) = M_3(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) : 1000 = 0,07503;$$

$$T(\text{NaOH} / \text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) = C_M(\text{NaOH}) \cdot M_3'(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH});$$

$$T(\text{NaOH} / \text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) = 0,1000 \cdot 0,07503 = 0,007503 \text{ г/моль};$$

$$a(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) = T(\text{NaOH} / \text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}) \cdot V.$$

Ход работы

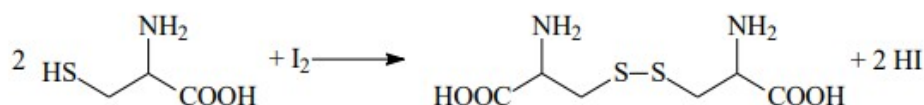
Навеску глицина 0,2 г помещают в колбу для титрования, растворяют в 20 мл дистиллированной воды, добавляют 2 мл формалина (40% раствор формальдегида) и 2-3 капли фенолфталеина. При этом образуется N-метиленовое производное, которое титруют 0,1 М раствором NaOH до бледно-розовой окраски, не исчезающей в течение 30 с. Определение, проводят несколько раз. Рассчитывают массовую долю (в %) глицина по формуле:

$$\omega_{(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH})} = \frac{V_{(\text{NaOH})} \cdot T_{(\text{NaOH}/\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH})} \cdot K_n \cdot 100}{a}$$

По полученным результатам рассчитывают среднее значение массовой доли глицина.

2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИСТЕИНА

Определяют методом йодометрии



Ход работы

0,15 г (точная навеска) субстанции растворяют в 20 мл 1 М раствора соляной кислоты, прибавляют 0,5 г калия йодида, охлаждают до 2-4 °С и медленно титруют 0,05 М раствором йода до бледно-желтого окрашивания.

1 мл 0,05 М раствора йода соответствует 12,12 мг цистеина.

3. ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ АМИНОКИСЛОТ

Флуоресцентными свойствами обладают три аминокислоты: фенилаланин (максимум флуоресценции 282 нм), тирозин (максимум флуоресценции 303 нм) и триптофан (максимум флуоресценции 350 нм).

Ход работы

На лист фильтровальной бумаги в разные места наносят капли 5% растворов аминокислот (фенилаланин, тирозин и триптофан). После высушивания рассматривают бумагу, поместив ее в осветитель в затемненном месте при разных длинах волн. В месте нанесения аминокислоты видна флуоресценция.

5. РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ С РАСТВОРАМИ ИНДИКАТОРОВ

В пробирки наливают по 1 мл 1% растворов глицина, аргинина и аспарагиновой кислоты. Добавляют по 1 капле растворов индикаторов на кислоты и основания. Что происходит с окраской индикаторов в растворах разных аминокислот?

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Амфотерность аминокислот. Напишите примеры реакций.
2. Способы качественного определения аминокислот.
3. Изоэлектрическая точка аминокислот и белков.
4. Способы расчета изоэлектрической точки. Напишите примеры.
5. Способы разделения аминокислот
6. Способы получения аминокислот
7. Энантиомеры аминокислот. Биологическое значение
8. Применение аминокислот.
9. Способы количественного определения аминокислот.
10. Аминокислотные анализаторы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕПТИДОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: научиться определять пептиды в биоматериале.

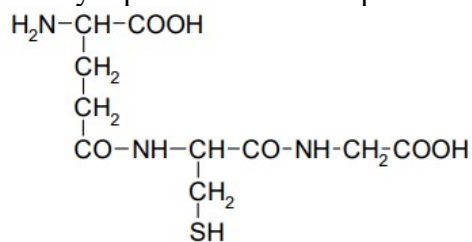
ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

С развитием биохимии термин «полипептиды», введенный Э.Фишером, приобрел более широкое значение. В настоящее время под полипептидами понимают соединения, состоящие из аминокислот, связанных между собой не только пептидными связями, но и связями других типов, а также содержащие в своей структуре не только протеиногенные аминокислоты, но и не встречающиеся в белках.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАТИОНА ПО МЕТОДУ ВУДВОРДА И ФРЕЯ В МОДИФИКАЦИИ ЧУЛКОВОЙ М.С.

Важную роль в клетках играет пептид глутатион (γ-глутаминилцистеилглицин)



HS-глутатион

Он состоит из трех аминокислот: глутаминовой, цистеина и гликоколя. При кислотном гидролизе глутатион распадается на составляющие его аминокислоты. Глутатион играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах, что обусловлено свойством сульфгидрильных групп -SH- легко окисляться, превращаясь в дисульфидную форму -S-S-.

1.1. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАТИОНА ДРОЖЖЕЙ

При старении дрожжей количество глутатиона в них возрастает, а хлебопекарные качества снижаются, поэтому определение глутатиона в дрожжевых клетках может служить для оценки возраста и качества дрожжей. Метод количественного вычисления глутатиона заключается в определении его восстановленной формы путем окисления SH-групп с помощью KJO₃.

Материалы и реактивы. Дрожжи; 5 %-й раствор метафосфорной кислоты HPO₃; 1,5 %-й раствор KJ; 1 %-й раствор крахмала, насыщенный раствор NaCl (индикатор); 0,001 н. раствор KJO₃; кварцевый песок.

Посуда и приборы. Мерная колба емкостью 50 мл; коническая колба объемом 100–150 мл; пипетки; бумажный фильтр; фарфоровая ступка с пестиком.

Ход работы

В ступке растирают 0,5 г дрожжей с кварцевым песком. Растертую массу при помощи дистиллированной воды количественно переносят в мерную колбу объемом 50 мл, доводя объем жидкости до 25 мл. Полученный раствор настаивают в течение 5 мин, после чего колбу сильно встряхивают в течение 2–3 мин.

Смесь фильтруют через сухой обезвоженный фильтр. В фильтрате определяют количество SH-групп и пересчитывают на содержание восстановленного глутатиона.

В коническую колбу пипеткой вносят 10 мл фильтрата, добавляют 1,0 мл 1,5 %-го раствора КJ и 5 капель 1 %-го раствора крахмала. Полученный раствор титруют 0,001 н. раствором КJО₃ до появления устойчивой синей окраски.

Расчет восстановленного глутатиона проводят по формуле

$$W_{(\text{GSH})} = V_{(\text{KJO}_3)} \cdot 0,307 \cdot 250.$$

Здесь W(GSH) – содержание глутатиона в образце дрожжей, взятом на анализ в мг/100 г биологического материала; V(KJO₃) – объем раствора йодата калия, пошедший на титрование; 250 – коэффициент, позволяющий учесть разведение раствора; 0,307 – титр раствора йодата калия по глутатиону.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛУТАТИОНА В МОЛОКЕ

Об уровне свободных SH-групп глутатиона (G-SH) судят по количеству пошедшего на титрование раствора йодноватистокислого калия. Окисленный глутатион переводят в восстановленную форму с помощью цинковой пыли и вновь оттитровывают SH-группы; получают общий глутатион (G-SH + G-S-S-G). Окисленный глутатион определяют по разнице (общий глутатион - G-SH).

Реактивы: 1. Сульфосалициловая кислота (ССК): 25% раствор 2. Сульфосалициловая кислота (ССК): 22% раствор 3. Сульфосалициловая кислота (ССК): 4% раствор 4. Йодистый калий: 5% раствор 5. Цинковая пыль 6. Крахмал: 1% раствор (готовится в день определения) 7. Основной раствор - 0,005N раствор йодноватистокислого калия (КJО₃): 0,1783 г в 1 л воды 8. Рабочий раствор для титрования - 0,001N раствор КJО₃: в мерную колбу на 250 мл вносят 50 мл основного раствора и 22,8 мл 22% раствора сульфосалициловой кислоты, перемешивают и доводят дистиллированной водой до метки

Ход работы

Для определения восстановленного глутатиона к 10 мл молока по каплям при постоянном взбалтывании приливают 2 мл 25% раствора сульфосалициловой кислоты (ССК), оставляют при комнатной температуре на 10 мин, после чего фильтруют через беззольный фильтр в сухую колбу. Фильтрат делят на две части:

а) определение восстановленного глутатиона: 5 мл фильтрата переносят в сухую колбу (колба №1);

б) определение общего глутатиона: к оставшейся части фильтрат вносят небольшое количество цинковой пыли и оставляют на 20 мин, взбалтывая время от времени. Затем жидкость фильтруют через беззольный фильтр и 5 мл фильтрата переносят в сухую колбу (колба №2).

В обе колбы (№1, №2) приливают по 2,5 мл 4% раствора ССК, по 2,5 мл 5% раствора йодистого калия, по 2-3 капли 1% раствора крахмала и титруют 0,001N раствором йодноватистого калия до появления слабо-голубого окрашивания.

Концентрацию глутатиона (А) в колбах №1 и №2 определяют по формуле:

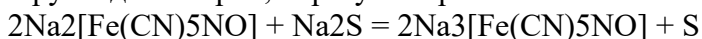
$$A = I \cdot 100 / 3,26 \text{ мг\%,}$$

где I - количество 0,001N раствора йодноватистого калия (мл), израсходованного на титрование пробы, 3,26 – число, соответствующее объему йодноватистого калия (мл), идущего на титрование 1 мг глутатиона, 100 – коэффициент пересчета на 100 мл исследуемой жидкости.

Окисленный глутатион определяют по разнице между общим и восстановленным.

3. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ГЛУТАТИОН

В щелочной среде от глутатиона отщепляется сульфид натрия, который, реагируя с нитропруссидом натрия, образует окрашенное в малиновый цвет соединение:



нитропруссид натрия окрашенный комплекс

Приборы: колба, штатив с пробирками, пипетки, спиртовка.

Реактивы: молоко, сульфат аммония (насыщенный раствор), нитропруссид натрия (2% раствор), аммиак концентрированный.

Ход работы

10 мл молока смешивают в колбе с 3-4 мл насыщенного раствора сульфата аммония. Содержимое разливают поровну в две пробирки.

Пробирка 1 служит контролем, ее нагревают до кипения для денатурации белка и глутатиона. В пробирке 2 (опыт) глутатион не разрушен.

В обе пробирки добавляют по 2 мл аммиака и по 1 мл раствора нитропрussa натрия. В пробирке 2 наблюдают появление малинового окрашивания.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Пептиды, определение. История открытия
2. Номенклатура пептидов. Примеры.
3. Классификация пептидов по биологической активности. Примеры
4. Классификация пептидов по качественному составу, по строению, примеры.
5. Нейропептиды. Опиоидные пептиды. Примеры
6. Вазоактивные пептиды. Примеры
7. Пептидные токсины. Примеры
8. Пептиды-антибиотики. Примеры
9. Вкусовые пептиды. Примеры
10. Пептиды-регуляторы pH. Примеры
11. Протекторные пептиды. Примеры
12. Пептиды-гормоны. Примеры
13. Защитные пептиды. Примеры
14. Регуляторные пептиды.
15. Функции пептидов
16. Пептиды применение
17. Циклические пептиды. Примеры
18. Изoeлектрическая точка пептидов. Способы расчета. Примеры.
19. Искусственно синтезированные пептиды. Применение, примеры
20. Пептидный синтез. Синтез пептидов на твердой фазе (синтез Мерифилда).

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с реакциями осаждения белков.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

- 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;
- 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 50С до 55С 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.

Ход работы

В 5 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% CH_3COOH 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 CH_3COOH , 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 CH_3COOH и 1 каплю насыщенного раствора NaCl . Образуется осадок белка вследствие адсорбции ионов и нейтрализации положительного заряда на частицах белка.

В пятую пробирку добавляют 2-3 капли 10% раствора NaOH 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	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 первую пробирку наливают 10 капель конц. HCl , во вторую – 10 капель конц. HNO_3 , в третью – 10 капель конц. H_2SO_4 . Затем, наклонив пробирки под углом 45°, осторожно по

стенке (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 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.

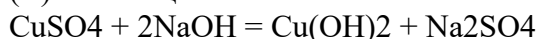
Ход работы

В две пробирки наливают по 5 капель 1% раствора белка, добавить 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 аминокислоты в мягких условиях дают хорошо кристаллизующиеся внутрикомплексные (хелатные) соли меди (II) синего цвета:



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 CuSO_4 , во вторую – 5% раствора $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$, в третью – 5% раствора AgNO_3 . Наблюдается образование осадка во всех трех пробирках.

Добавляют еще по 5-10 капель тех же самых растворов осадителей. Пронаблюдать, что происходит. Результаты опыта внести в таблицу 13.

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°C) 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

А. В пробирку наливают около 1 мл раствора белка, а затем при взбалтывании этиловый спирт до появления осадка. При добавлении 1-2 капель 1% раствора CH_3COOH образование осадка усиливается. Еще большее осаждение наблюдается при добавлении нескольких капель насыщенного раствора NaCl .

Б. Проделывают ту же реакцию, взяв вместо этилового спирта ацетон.

В. 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.

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

6. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА АЛКАЛОИДАМИ

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

7. ОСВОБОЖДЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ОТ БЕЛКА

В практической работе биохимических лабораторий иногда возникает необходимость определять в крови и других биологических жидкостях различные низкомолекулярные вещества. Присутствие белков препятствует такого рода определениям. Поэтому предварительно биологическую жидкость освобождают от белка. Необходимо определить реактив, который наиболее полно осаждает белок.

Ход работы

В 5 пробирок наливают по 1 мл 1% раствора белка. В первую пробирку добавляют 10 капель 8% раствора CCl_3COOH . Во вторую – 10 капель 5% раствора H_3PO_4 . В третью – 1 каплю 10% раствора CH_3COOH и кипятят. В четвертую – 5 мл 0,45% раствора ZnSO_4 и 1 мл 0,1 М раствора NaOH и кипятят. После образования осадка белка, содержимое каждой пробирки фильтруют.

С каждым фильтратом проводят качественную реакцию на белок с сульфосалициловой кислотой. Отрицательная реакция на белок свидетельствует о полном осаждении белка данным реактивом.

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица - Результаты лабораторной работы

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Структуры белковой молекулы. Особенности строения первичной структуры белка. Типы связей, обеспечивающих поддержание первичной структуры белковой

молекулы. Напишите пример.

2. Особенности строения вторичной структуры белка. Домены. Надвторичная структура.
3. Типы связей, обеспечивающих поддержание вторичной структуры белковой молекулы. Напишите примеры.
4. Особенности строения третичной структуры белка. Связи, стабилизирующие третичную структуру. Напишите примеры.
5. Особенности строения четвертичной структуры белка. Связи, стабилизирующие четвертичную структуру. Напишите примеры.
6. Назовите основные факторы, обуславливающие стабильность молекул белка в растворе. Характеристика обратимых и необратимых реакций осаждения белков.
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.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И ДИАЛИЗ БЕЛКОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: изучить способы выделения белков. Научиться выделять белки из различных легкодоступных природных материалов

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Классификация белков по растворимости (в воде, растворах солей, кислот, щелочей и спирта) применяется только для простых белков.

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.

Реактивы: мука пшеничная, гороховая; 10%-й и насыщенный растворы сульфата аммония, сухой сульфат аммония (мелко размолотый); 0,2%, 1%, 10%-е растворы гидроксида натрия; 0,1 н, 3%-е растворы уксусной кислоты; биуретовый реактив; 10%-й и насыщенный растворы хлорида натрия; сухой хлорид натрия (мелко размолотый); 70%-й раствор этилового спирта.

Посуда и приборы: капельницы; стеклянные воронки; фарфоровые ступки и пестики; фильтровальная бумага; марля; технические весы с разновесами; термостат; плоскодонные колбы объемом 100 мл; пробирки; пипетки; водяные бани.

1. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ БЕЛКОВ

1.1. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ

1.1.1. Выделение водорастворимых белков пшеницы

Пшеничную муку в количестве 2 г растереть в фарфоровой ступке с 10 мл дистиллированной воды. Полученной смеси дать отстояться 2...3 мин, затем отфильтровать. Остаток муки промыть два раза небольшими порциями дистиллированной воды и оставить для последующего извлечения глобулинов пшеницы.

Полученный фильтрат использовать при исследовании растворимости альбуминовых белков. К фильтрату альбуминовой фракции белков добавить сухой тонкоизмельченный порошок сульфата аммония при небольшом нагревании (не выше 40°C) до полного насыщения (до прекращения растворения сульфата аммония).

Выпавший осадок, представляющий собой альбуминовую фракцию белков пшеницы, отфильтровать. Осадок на фильтре растворить в 1 мл дистиллированной воды. В полученном растворе доказать наличие белков, добавив в него 1 мл биурстового реактива.

Отметить окраску.

Экстракцию белков **гороха** провести аналогично экстракции альбуминов пшеницы.

1.2. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ СОЛЕРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ

1.2.1. Выделение солерастворимых белков пшеницы

Промытый водой остаток муки (после извлечения альбуминовой фракции белков) растереть в ступке с 10 мл 10%-го раствора хлорида натрия, дать отстояться 2-3 мин и отфильтровать. Остаток муки промыть два раза небольшими порциями свежего раствора хлорида натрия и оставить для следующих опытов.

Полученный фильтрат использовать при исследовании растворимости глобулиновых белков пшеницы. Для этого добавить к фильтрату равный объем насыщенного раствора хлорида натрия, достигнув тем самым полунасыщения.

Выпавший осадок, представляющий собой глобулиновую фракцию белков пшеницы, отфильтровать. Осадок растворить на фильтре в 36 1 мл 10%-го раствора хлорида натрия. Провести реакцию с биуретовым реактивом. Отметить окраску.

1.2.2. Выделение солерастворимых белков гороха (легумина)

В гороховой муке содержится глобулиновый белок легумин, не растворимый в воде, но растворимый в растворах нейтральных солей. Для извлечения легумина 5 г гороховой муки залить 20 мл 10%-го раствора сульфата аммония и экстрагировать в термостате в течение 20 мин при температуре 30 С, периодически перемешивая.

Полученный раствор отфильтровать через складчатый фильтр, смоченный раствором соли. Фильтрат использовать для исследования растворимости глобулиновых белков гороха. Для этого добавить к 1 мл фильтрата 1 мл насыщенного раствора хлорида натрия. Выпавший осадок легумина отфильтровать и растворить на фильтре в 1 мл 10%-го раствора хлорида натрия. Провести реакцию с биуретовым реактивом.

1.3. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ РАСТВОРИМЫХ В ЩЕЛОЧАХ

Остаток муки (после удаления альбуминовой и глобулиновой фракции белков) растереть в фарфоровой ступке с 10 мл 0,2%-го раствора гидроксида натрия, дать отстояться 2-3 мин и отфильтровать. К фильтрату добавить по каплям 0,1 н раствор уксусной кислоты. Выпавший осадок представляет собой глютенин – глютелин пшеницы.

1.4. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ БЕЛКОВ РАСТВОРИМЫХ В СПИРТАХ

В фарфоровой ступке растереть 1 г пшеничной муки с 5 мл 70%-го этилового спирта. Полученной суспензии дать отстояться и отфильтровать. К 3 мл фильтрата добавить по каплям дистиллированную воду до выпадения осадка. Полученный осадок представляет собой глиадин – проламин пшеницы.

Результаты записать в таблицу.

Таблица - Результаты анализа фракционного состава исследуемого белка

Исходный материал	Растворитель	Название белка	Из какого растворителя высаливается	Реакция на белок

2. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ЖИВОТНЫХ БЕЛКОВ

2.1. 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.

2.1.1. Экстракция альбуминов

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 NH_4Cl 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.

2.1.2. 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 проводят 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.

2.1.3. 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.

Результаты записать в таблицу.

Таблица - Результаты анализа фракционного состава исследуемого белка

Исходный материал	Растворитель	Название белка	Из какого растворителя высаливается	Реакция на белок

3. ДИАЛИЗ БЕЛКА

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 используется для очистки белков от низкомолекулярных примесей.

Материалы и реактивы: целлофановый или коллодиевый мешочки; 1%-ный раствор яичного белка; 10%-ный раствор азотной кислоты; 1%-ный раствор нитрата серебра; 10%-ный раствор гидроксида натрия; 1%-ный раствор сульфата меди.

Оборудование: стеклянные палочки, пробирки, капельницы, пипетки, диализатор (или стеклянный стакан объемом 0,5 л), штатив для пробирок.

Ход работы

В пробирку наливают 2 мл раствора яичного белка. Прибавляют при перемешивании до полного насыщения раствора, т.е. до момента, когда часть кристаллов солей перестают растворяться, тонко измельченного NaCl, 5 минут в пробирках появляется осадок, который отфильтровывают. Осадок выбрасывают, а фильтрат оставляют для дальнейшего опыта.

С помощью биуретовой реакции определяют, содержит ли исследуемый раствор белок. Для этого отбирают 5-6 капель раствора и добавляют 2-3 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия и одну каплю 1%-ного раствора сульфата меди и смесь перемешивают. Фиолетовая окраска свидетельствует о наличии в растворе белка.

Целлофановый (коллодиевый) мешочек наполняют на 1/3 объема 1%-ным раствором исследуемого белка. Мешочек помещают в диализатор, заполненный дистиллированной водой (или в стеклянный стакан с водой), зажимая у верхнего края двумя стеклянными палочками, которые скреплены резиновыми колечками.

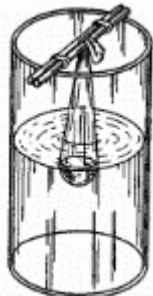


Рисунок - Вариант устройства системы для диализа белка

Через 30 минс диализатор (наружная жидкость) и используемой для диализа дистиллированной водой проводят реакцию на обнаружение хлоридов.

Готовят две пробирки, в одну из них добавляют 1 мл дистиллированной воды, в другую – 1 мл диализата, затем по одной капле 10%-ного раствора азотной кислоты и 1%-ного раствора нитрата серебра. В пробирке, содержащей диализат, наблюдают выпадение белого осадка хлорида серебра, а в пробирке с дистиллированной водой такого осадка нет. Делают вывод о том, что при диализе солевого раствора белка хлориды проникли в диализат через полупроницаемую мембрану.

Для проверки содержания белка в первую пробирку добавляют 3 мл диализата, во вторую – 3 мл диализируемой жидкости, а так же по 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1-2 капли 1%-ного раствора сульфата меди (проводят биуретовую реакцию). Содержимое перемешивают и наблюдают красно-фиолетовый цвет в пробирке, содержащей диализируемую жидкость. Такое окрашивание отсутствует в пробирке с диализатором.

Делают вывод о том, что белок не проникает через полупроницаемую мембрану.

Результат оформить в виде таблицы, отметив знаками « + » или « - » наличие реакции.

Таблица – Результаты эксперимента

Изучаемые	До диализа	После диализа
-----------	------------	---------------

компоненты	Жидкость из стаканчика	Жидкость из мешочка	Жидкость из стаканчика	Жидкость из мешочка
Белок				
Cl^{-}				

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРАНИЦ ВЫСАЛИВАНИЯ

Нижняя граница высаливания - минимальная концентрация соли, при которой белок начинает высаливаться. Верхняя граница высаливания – концентрация соли, при которой растворенный белок выпадает в осадок полностью, то есть дальнейшее увеличение концентрации соли не меняет массу осадка белка.

Оборудование, реактивы: Пробирки; пипетки; воронки; белок яичный (1%-й раствор); сульфат аммония (насыщ. раствор); сульфат аммония (крист.).

Ход работы

Берут девять пробирок. В каждую из девяти пробирок вносят раствор белка, насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$ и воду в количествах, указанных в таблице.

Содержимое пробирок перемешивают. Нижнюю границу высаливания (минимальную концентрацию соли, при которой происходит высаливание), определяют для пробирки, в которой образуется самое заметное помутнение по сравнению с другими пробирками.

Для определения верхней границы выпавшие в других пробирках осадки белка отфильтровывают, к фильтратам добавляют кристаллический $(NH_4)_2SO_4$ до насыщения раствора. Верхнюю границу высаливания определяют в пробирке, в которой не выпал осадок белка при добавлении твердого $(NH_4)_2SO_4$ до насыщения.

Таблица – Определение границ высаливания

№	Объем, мл				Полнота насыщения %
	Раствора альбумина	Насыщен. р-ра сульфата аммония	Воды	Общий	
1	1	2	7	10	20
2	1	3	6	10	30
3	1	4	5	10	40
4	1	5	4	10	50
5	1	6	3	10	60
6	1	7	2	10	70
7	1	8	1	10	80
8	1	9	0	10	90
9	1	9+тв. соль	0	10	100

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Способы гомогенизации биологического материала. Методы определения гомогенности белковых препаратов.
2. Методы дезинтеграции биоматериала.
3. Методы гидролиза белков. Экстракция белков
4. Методы фракционирования белков. Методы очистки белков
5. Методы осаждения белков.
6. Методы получения нативных белков. Высушивание и хранение белковых препаратов
7. Хроматографические методы разделения белков. История создания метода. Афинная хроматография. Метод молекулярных сит. Адсорбционная хроматография.
8. Получение белков из различных объектов, особенности выделения разных белков
9. Денатурация белков. Причины. Ренатурация белков, когда она возможна?
10. Применение белков в различных областях

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ БЕЛКОВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ БЕЛКА

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить некоторые свойства белков различного происхождения.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Белки образуют коллоидные растворы, которые имеют следующие характеристики: низкое осмотическое давление, высокая вязкость, низкая способность к диффузии и др.

1. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ЖЕЛАТИНА

При определенных условиях белковые растворы превращаются в гели. В гелях растворитель и белок образуют одну внешне гомогенную массу, подобную студню. Высушенный гель, помещенный в воду, впитывает ее в очень больших количествах. Это впитывание воды называется набуханием геля. Процессы набухания белков играют важную роль в пищевой промышленности.

1.1. Исследование защитного действия желатина на золь гидроксида железа

Золь получают путём гидролиза хлорида железа кипящей дистиллированной водой. Реакция протекает по уравнению: $\text{FeCl}_3 + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3 + 3\text{HCl}$.

Отмерить в колбу (или стакан) 10 мл дистиллированной воды и нагреть её до кипения. Не снимая колбы с электроплитки, добавить к кипящей воде по каплям 1 мл 10%-ного раствора хлорида железа (III). Образовавшийся золь прокипятить ещё 1 минуту, затем охладить до комнатной температуры.

Ход работы

В две пробирки налить по 1 мл золя гидроксида железа. В первую пробирку добавить 1 мл 0,5% раствора желатина. Во вторую пробирку 1 мл дистиллированной воды. Обе пробирки тщательно встряхнуть. В каждую пробирку по каплям добавлять раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до появления мути. Зафиксировать количество капель, добавленных в каждую пробирку.

Ожидаемые результаты: в первой пробирке (с желатином) потребуется значительно больше капель $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ для коагуляции золя. Во второй пробирке (с водой) коагуляция наступит при меньшем количестве добавленных капель.

Объяснение: желатин, как высокомолекулярное защитное вещество, адсорбируется на частицах золя и создает защитный слой, препятствующий коагуляции. Поэтому для достижения помутнения в первой пробирке потребуется большее количество коагулянта.

Вывод: эксперимент демонстрирует защитное действие желатина по отношению к золю гидроксида железа, что проявляется в повышении порога коагуляции в присутствии защитного коллоида. Это подтверждает теорию о том, что высокомолекулярные вещества способны стабилизировать коллоидные системы.

1.2. Влияние кислот, щелочей, солей на набухание сухого белка

В шесть пробирок налить по 5 мл различных растворов (см. таблицу) и внести по 0,3 г порошка желатина. По полоске миллиметровой бумаги определить высоту осадка.

Оставить пробирки на 1 час, встряхнуть и после оседания вновь измерить высоту осадка. Результаты занести в таблицу. Рассчитать степень набухания по формуле:

$$a = \frac{h_2 - h_1}{h_1} \cdot 100\%.$$

Сравнить степени набухания желатина в различных электролитах и сделать вывод.

Таблица - Влияние кислот, щелочей и солей на степень набухания сухого желатина

№пробирки	Раствор	Концентрация, %	Высота осадка		Степень набухания а, %
			До набухания	После набухания	
1	H_2O	-			

2	HCl	0.025			
3	NaOH	0.025			
4	Na ₂ SO ₄	0.1			
5	NaCl	0.1			

1.3. Влияние электролитов на процесс желатинирования

В пробирки с 3 мл 8%-ного раствора желатина налить по 2 мл 1н растворов солей калия (по таблице) и определить время желатинирования. Сделать вывод.

Таблица - Влияние анионов на время желатинирования

Показатели	Номер пробирки						
	1	2	3	4	5	6	7
Электролит	H ₂ O	K ₂ SO ₄	KCl	KNO ₃	KI	KNCS	CH ₃ COOK
Время желатинирования, мин							

2. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ КАЗЕИНА

Фосфопротеин казеиноген в молоке находится в виде растворенной кальциевой соли, то есть в виде анионов. Свободный казеиноген в форме электронейтральных молекул характеризуется малой стабильностью в растворе.

2.1. Определение жиросвязывающей способности казеина

Метод основан на гравиметрическом определении количества жира, удерживаемого белком в результате равновесного набухания абсорбента (белка).

Ход работы

К навеске 0,5 г изучаемого белка добавляют 3 мл рафинированного подсолнечного масла, настаивают в течение 30 мин при слабом перемешивании. Смесь центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 мин, сливают жидкость с осадка, осадок взвешивают.

Жирсвязывающую способность определяют по разности массы осадка после центрифугирования и массы взятой навески:

$$G = M1/M2 \cdot 100$$

где M1 – масса абсорбированного жира, г; M2 – масса навески, г

2.2. Определение влагосвязывающей способности казеина

Метод основан на гравиметрическом определении количества связанной воды, удерживаемой белком в результате равновесного набухания белка.

Ход работы

К навеске 2,5 г изучаемого белка добавить 15 мл дистиллированной воды, перемешивать в течение 30 мин до образования гомогенной смеси. Смесь отцентрифугировать. Надосадочную воду слить с осадка, взвесить. Количество связанной воды (влагосвязывающую способность белка) определяют по разности массы абсорбированной воды после центрифугирования набухшего осадка и массы взятой навески:

$$G = M1/M2 \cdot 100$$

где M1 – масса абсорбированной воды, г; M2 – масса навески, г

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ БЕЛКА ИНДИКАТОРНЫМ СПОСОБОМ

В качестве индикатора используют фенолфталеин, приобретающий окраску в нейтральной и щелочной среде.

Ход работы

В колбу вместимостью 100 см³ отмеривают 20 см³ молока, 0,25 см³ (10...12 капель) 1%-го раствора фенолфталеина и титруют раствором гидроксида натрия с концентрацией 0,1 моль/дм³ до появления розовой окраски, соответствующей цвету эталона (смешивают 20 см³ молока и 0,5 см³ 2,5%-ного раствора сульфата кобальта).

Затем вносят прибором для автоматического отмеривания 4 см³ (4 объема)

нейтрализованного 40%-ного формалина и вновь титруют раствором гидроксида натрия с концентрацией 0,1 моль/дм³ до появления окраски эталона.

Количество щелочи, пошедшее на второе титрование (при первом титровании она расходуется на нейтрализацию веществ, обуславливающих кислотность молока), умножают на коэффициент 0,959 и получают массовую долю белков в молоке в процентах.

Для перевода количества раствора гидроксида натрия с концентрацией 0,1 моль/дм³ в проценты белка можно пользоваться таблицей.

Таблица - Зависимость массовой доли белков от объема раствора щелочи ($C_{\text{э}} = 0,1$ моль/дм³), затраченного на титрование проб молока в присутствии формалина

Расход раствора NaOH, см ³	Массовая доля белков в молоке, %	Расход раствора NaOH, см ³	Массовая доля белков в молоке, %	Расход раств NaOH, см ³	Массовая белков в мо %
2,45	2,35	2,95	2,83	3,45	3,31
2,50	2,40	3,00	2,88	3,50	3,35
2,55	2,44	3,05	2,93	3,55	3,40
2,60	2,49	3,10	2,98	3,60	3,45
2,65	2,54	3,15	3,03	3,65	3,50
2,70	2,59	3,20	3,07	3,70	3,55
2,75	2,64	3,25	3,12	3,75	3,60
2,80	2,69	3,30	3,16	3,80	3,65
2,85	2,73	3,35	3,21		
2,90	2,78	3,40	3,25		

Оформить результаты в исследуемых образцах молока, сделать выводы.

4. ОБНАРУЖЕНИЕ КОЛЛАГЕНА В ТКАНИ КОЖИ

Коллаген из гомогенатов тканей полностью экстрагируется горячим раствором ТХУ. При этом другие тканевые белки выпадают в осадок. В экстракте коллаген обнаруживается биуретовой реакцией.

Оборудование: штатив с пробирками, пробирки центрифужные, пипетки объемом 1 мл, 2 мл, 5 мл, баня водяная кипящая, центрифуга лабораторная, весы центрифужные, фарфоровая ступка, ножницы.

Реактивы: 1. Трихлоруксусная кислота (ТХУ), 5 % раствор; 2. Едкого натра (NaOH) и едкого калия (KOH), 10 % раствор; 3. Сернокислая медь (CuSO₄), 1 % раствор.

Исследуемый материал: сырая кожа крысы, куницы или кролика.

Ход работы

В ступке 0,2 г сырой кожи (курица или др.) измельчить ножницами и, растерев до кашицеобразной массы, перенести в центрифужную пробирку, добавить 3,0 мл 5 % раствора ТХУ, перемешать и поставить в водяную баню при 90 °С на 10 мин. Затем пробирку центрифугировать 5 мин при 1500 об/мин, 0,5 - 1 мл центрифугата перенести в пробирку, добавить равный объем 10 % раствора NaOH (KOH) и 1 каплю 1 % раствора сернокислой меди. Отметить появление фиолетового окрашивания.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Элементарный состав белка.
2. Содержание белков в тканях и органах.
3. Классификации белков. Приведите конкретные примеры в каждом классе
4. Форма белковых молекул.
5. Функции белков. Приведите конкретные примеры
6. Простые белки, классификация, примеры каждого класса
7. Химические свойства белков.
8. Цветные реакции на белки

9. Физические свойства белков.

10. От чего зависит заряд белка в водном растворе. Почему он различен у белков?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

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

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

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.

1. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ ДРОЖЖЕЙ



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

Ход работы

1 дрожжей помещают в ступку, добавляют 1 мл диэтилового эфира и 1 мл капель воды. Вносят щепотку песка и тщательно растирают. К гомогенату приливают 10 мл 0,4% раствора NaOH и продолжают растирать в течение 10-15 мин. Содержимое ступки переносят в центрифужный стакан, центрифугируют 3 мин при 2000 об/мин.

Центрифугат сливают в стакан и, постоянно помешивая, приливают 4 мл 10% раствор CH_3COOH до осаждения нуклеопротеида. Осадок нуклеопротеида собирают путем повторного центрифугирования и используют для качественной реакции. Надосадочную жидкость подвергают гидролизу.

2. ГИДРОЛИЗ НУКЛЕОПРОТЕИДА

Реактивы и оборудование: надосадочная жидкость, полученная в предыдущем опыте, 20%-ный раствор серной кислоты, круглодонная колба на 100 мл, бумажный складчатый фильтр, стеклянная воронка, обратный холодильник.

Ход работы

Надосадочную жидкость, полученную в предыдущем опыте помещают в круглодонную колбу. Добавляют 10 мл 20% раствора серной кислоты и делают карандашом по стеклу отметку исходного объема смеси.

Колбу закрывают пробкой с длинной стеклянной трубкой (обратный холодильник) и кипятят в течение 30 мин на асбестовой сетке при слабом нагревании.

После окончания гидролиза содержимое охлаждают, доводят дистиллированной водой до первоначального объема и фильтруют.

С полученным фильтратом проводят качественные реакции на составные части нуклеопротеинов.

3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ

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

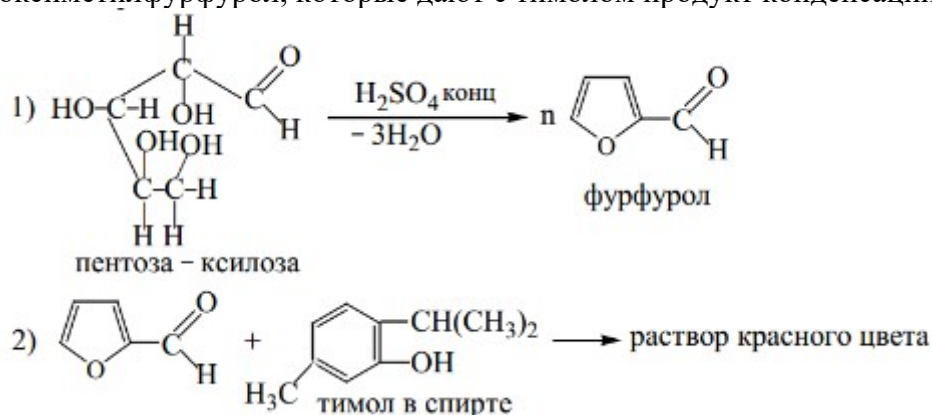
3.1. ОТКРЫТИЕ ПОЛИПЕПТИДОВ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИЕЙ

К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 10 капель 10% 1% NaOH и 2 капли раствора CuSO₄. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

3.2. ОТКРЫТИЕ УГЛЕВОДОВ

2.2.1. ОТКРЫТИЕ ПЕНТОЗЫ (реакция Молиша)

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.

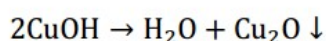
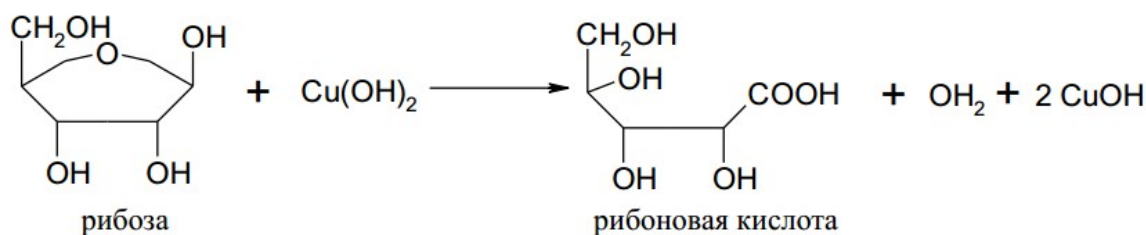
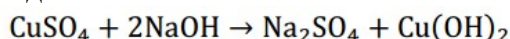


Ход работы

К 10 каплям гидролизата дрожжей прибавляют 3 капли 1% раствора тимола и по стенке пробирки 20 капель конц. H₂SO₄. При встряхивании на дне пробирки появляется красное окрашивание.

2.2.2. ОТКРЫТИЕ ПЕНТОЗЫ (реакция Тромера)

Метод основан на окислении альдегидной группы рибозы и дезоксирибозы до карбоксильной, при этом гидроксид меди (II) восстанавливается в гидроксид или оксид меди (I) и выпадает в осадок.



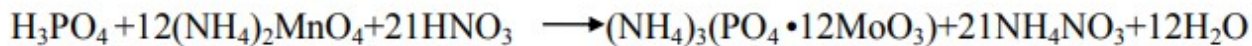
Ход работы

К 10 каплям гидролизата добавляют 5 капель 10 % раствора NaOH до щелочной среды и добавляют по каплям 7% раствор сульфата меди CuSO₄ до появления голубой мути, далее пробирку нагревают до кипения, при этом выпадает желтый осадок CuOH или образуется осадок меди Cu₂O красного цвета.

Внимание! Избыток CuSO₄ мешает реакции, так как образующийся при нагревании Cu(OH)₂ дает оксид меди (II) CuO черного цвета

2.3. ОТКРЫТИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

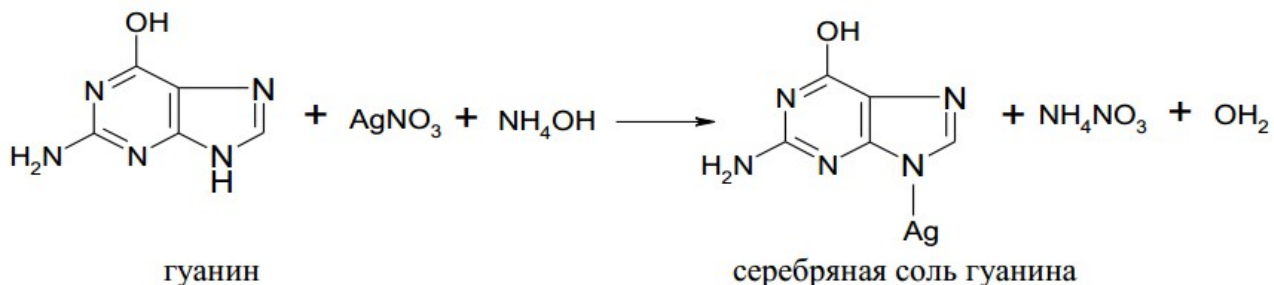
К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель 2,5 % молибдата аммония, кипятят на пламени горелки. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. Пробирку охлаждают под струей воды и наблюдают выпадение осадка фосфорномолибденовокислого аммония.



Молибдат аммония

Фосфомолибдат аммония

2.4. ОТКРЫТИЕ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ОСНОВАНИЙ



К 1 мл гидролизата приливают 1-2 капли конц. раствор NH₃ до щелочной реакции по лакмусу и добавляют 5 капель 1% аммиачного раствора оксида серебра. Выпадает осадок.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. История открытия нуклеиновых кислот.
2. Методы выделения нуклеиновых кислот
3. Функции и виды нуклеиновых кислот
4. Строение нуклеиновых кислот. Сходство и различия в строении ДНК и РНК
5. Пуриновые и пиримидиновые основания. Напишите формулы
6. Углеводные компоненты нуклеиновых кислот. Напишите формулы
7. Опишите.
8. Что такое нуклеотиды и нуклеозиды? Напишите формулы
9. Циклические нуклеотиды строение и функции. Напишите формулы
10. Физико-химические свойства нуклеиновых кислот

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНК И РНК

Цель работы: получить препарат ДНК из различной биомассы.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Дезоксирибонуклеопротеиды являются главной составной частью клеточных ядер. Выделение ДНК является первым этапом генетического анализа.

1. ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА ДНК ИЗ РАЗЛИЧНОГО БИОМАТЕРИАЛА

2-3 г биоматериала (зеленый горошек, лук, яблоко, киви, банан и др.) растолочь до однородного состояния с помощью ступки и пестика добавив 5 мл холодного физ. раствора с добавлением 0,1 г гидрокарбоната натрия (пищевой соды), рН такого раствора должен быть примерно 8-9.

В равномерно растертую массу надо добавить детергент лаурилсульфат натрия (моющее средство) и хорошо перемешивают. Его задача – растворить мембраны клеток и ядер, внутри которых и содержится ДНК. Эти мембраны построены из липидов, поэтому моющее средство эти липиды разбивает на мелкие капли, а ДНК взаимодействует с соевым раствором и оказывается в воде. Полученную смесь энергично перемешивайте в течение 2-3 мин – в это время происходит разрушение клеточных стенок детергентом и выход содержимого клеток в раствор.

Далее нужно отделить раствор, содержащий ДНК и другие молекулы, от нерастворимых остатков биоматериала. Для этого можно использовать центрифугу или профильтровать смесь через кусок капрона. Для дальнейшей работы достаточно жидкости объемом 2-3 мл.

Добавить в пробирку несколько капель протеазы (раствор препарата «Панкреатин» или раствор для контактных линз или сок ананаса) и осторожно встряхнуть, переворачивая и наклоняя пробирку во избежание разлома ДНК. Инкубировать в течении 5 мин. (можно зажать пробирку в кулаке на это время, т.к. процесс лучше идет при температуре тела).

В пробирку долить холодный этанол в объеме в 2 раза больше исходного в пробирке. Доливать осторожно, тонкой струйкой по стеночке пробирки.

Поставьте пробирку в штатив и оставьте ее на 2-3 минуты. ДНК в спирте не растворяется и образует в его нижнем слое колечко или путанную смесь из своих отдельных нитей.

Нити ДНК подцепить палочкой и вытащить из пробирки. ДНК рассмотреть с помощью микроскопа на предметном стекле. Знаменитую двойную спираль увидеть можно в электронном микроскопе. А в световом микроскопе можно видеть ДНК как вещество, множество молекул. В оставшемся растворе еще остались нити ДНК. Для того чтобы их увидеть, можно добавить 1 каплю красителя (метиленовый синий), который свяжется с заряженными фрагментами ДНК, оставляя раствор неокрашенным.

2. ВЫДЕЛЕНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВ ИЗ СЕЛЕЗЕНКИ

Метод основан на способности дезоксирибонуклеопротеинов растворяться в растворах солей, с образованием вязких растворов и снова осаждаться при разведении.

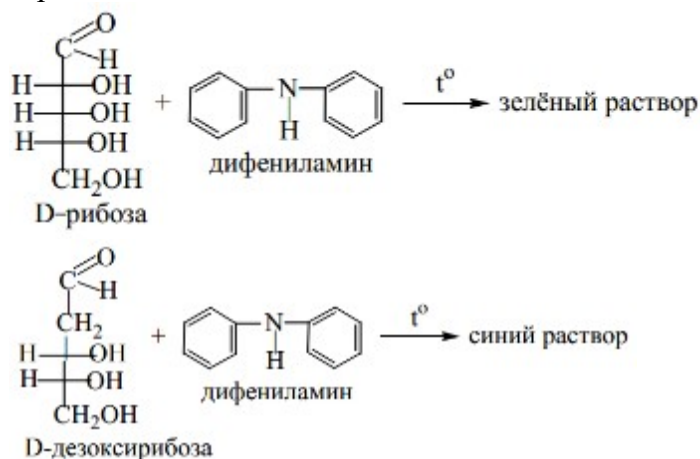
Ход работы

2-3 г ткани селезенки тщательно растирают в ступке с песком, приливая постепенно небольшими порциями 15 мл 5% раствора хлорида натрия. Растирайте селезенку в течение 15 минут постепенно добавляя еще 15 мл 5% NaCl содержащего 0,04 % трёхзамещённого цитрата натрия (ингибитор ДНК-азы). Вылейте гомогенат в центрифужную пробирку и отцентрифугируйте в течение 15 минут при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость аккуратно влейте, помешивая деревянной палочкой, в стакан с 60 мл дистиллированной воды. На палочку постепенно наматываются нити дезоксирибонуклеопротеида.

3. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ ДИШЕ

Приготовление дифениламинового реактива: 1г дифениламина растворяют в 100мл ледяной уксусной кислоты и добавляют 2,75 мл концентрированной серной кислоты.

Дифениламиновая проба лежит в основе методов качественного и количественного определения нуклеопротеинов и нуклеиновых кислот в биологическом материале. В клинической цитологии эти реакции применяют при нативной окраске нуклеиновых кислот в мазках клеток крови. Метод основан на способности дезоксирибозы, входящей в ДНК дезоксирибонуклеопротеида, образовывать соединение синего цвета с дифениламином при нагревании в среде, содержащей смесь ледяной уксусной и конц. серной кислот.



Ход работы

К $\frac{1}{4}$ части осадка дезоксирибонуклеопротеида приливают 1 мл 0,4%-ного раствора гидроксида натрия (до растворения). Добавляют 0,5 мл дифениламинового реактива. Содержимое пробирки перемешивают и ставят на кипящую водяную баню на 15-20 мин. Отмечают окрашивание в пробах.

Дифениламин с дезоксирибозой дает синее окрашивание, а с рибозой – зеленое.

4. ИЗВЛЕЧЕНИЕ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВ ДРОЖЖЕЙ

В фарфоровую ступку помещают 1 г дрожжей, добавляют 5 капель этилацетата, 10 капель дистиллированной воды, около 0.1 г стеклянного песка. Дрожжевую массу растирают пестиком 1–2 мин, затем в ступку добавляют 4 мл 0.5 %-ного раствора NaOH и растирание продолжают в течение 5 мин. Содержимое ступки пипеткой переносят в центрифужную пробирку, уравнивают с другой пробиркой с водой и центрифугируют в течение 10 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость переносят в стакан с 30–40 мл воды, подкислённой уксусной кислотой до pH = 4.5. Выпавший осадок РНК-протеина отделяют центрифугированием. 10 минут при 2000 об/мин.

5. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ОПРЕДЕЛЕНИЕ D-РИБОЗЫ В РНК

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ

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

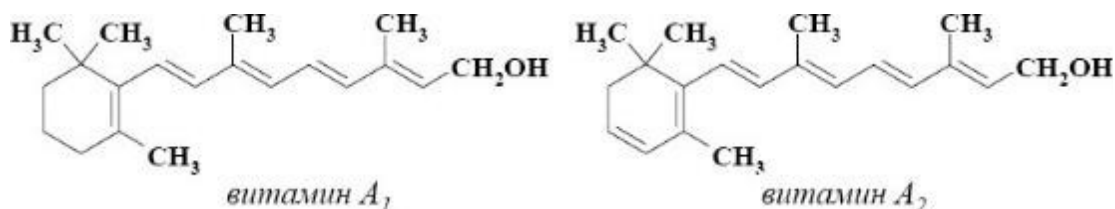
ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

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.

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 противоинфекционным 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.

1.1. РЕАКЦИЯ С КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ (Друммонда)

В сухую пробирку помещают 3 капли масляного раствора витамина А или рыбьего жира. Затем осторожно приливают каплю конц. H₂SO₄. В месте соприкосновения витамина А с серной кислотой появляется фиолетовое окрашивание, переходящее в вишнево-красное.

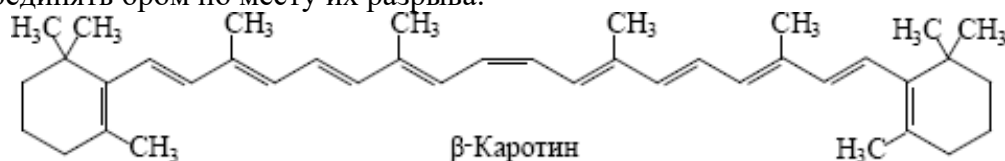
1.2. РЕАКЦИЯ С СУЛЬФАТОМ ЖЕЛЕЗА (II)

В пробирку к 2-3 каплям масляного раствора витамина А или рыбьего жира приливают 5-10 капель ледяной CH₃COOH, насыщенной CuSO₄, 1-2 капли конц. H₂SO₄. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в красно-розовое. Каротины дают при этой реакции зеленое окрашивание.

2. ОБНАРУЖЕНИЕ КАРОТИНА

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:

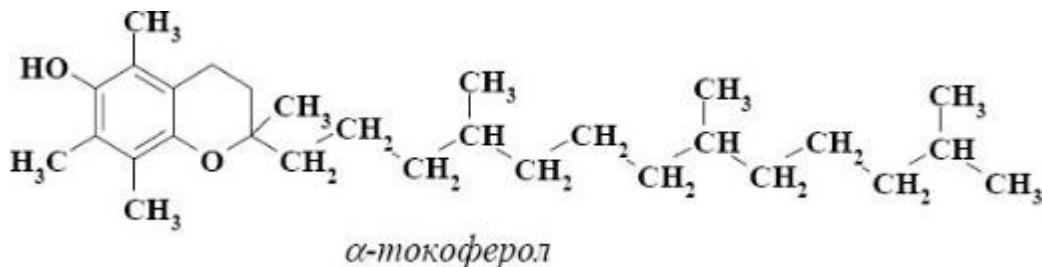


2.1. ОБНАРУЖЕНИЕ КАРОТИНА В ШИПОВНИКЕ

Одну ягоду шиповника растирают в ступке, затем добавляют 2 мл хлороформа и растирание продолжают еще 1 мин. Содержимое ступки фильтруют через заранее приготовленный фильтр в сухую пробирку. Фильтрат окрашен каротинами в оранжевый цвет. В сухую пробирку вносят несколько капель хлороформной вытяжки и добавляют 1 каплю конц. H₂SO₄. Появляется синяя окраска, переходящая в зеленую.

3. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ТОКОФЕРОЛ

Под общим названием витамина Е известен ряд веществ, дающих витаминными свойствами и являющихся производными хромана. Самым активным из них является 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 противоокислительным 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 токоферола с концентрированной азотной кислотой приводит к окрашиванию реакционной смеси в красный цвет. Это обусловлено тем, что продукт окисления токоферол имеет хиноидную структуру. При взаимодействии с хлорным железом (III) токоферол окисляется до токоферилхинона – соединения, окрашенного в красный цвет.

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 конц. HNO₃. Пробирку интенсивно встряхивают и наблюдают постепенное появление красного окрашивания. Эмульсию оставляют стоять до расслоения. Окраска остается в верхнем масляном слое.

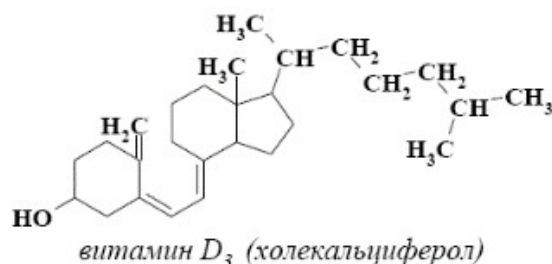
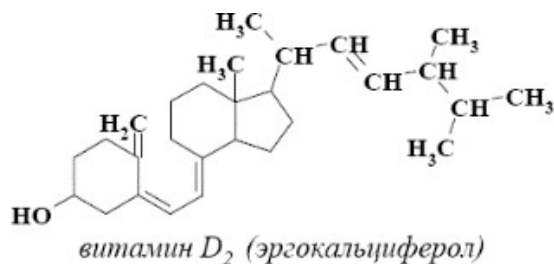
3.2. РЕАКЦИЯ С ХЛОРНЫМ ЖЕЛЕЗОМ

Ход работы

В сухую пробирку вносят 0,5 мл спиртового раствора токоферола, затем 0,5 мл 1% раствора FeCl₃ и тщательно содержимое пробирки. Наблюдают появление окрашивания.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИФЕРОЛА (ВИТАМИН D)

Известно несколько витаминов группы D (кальциферолы). Они образуются из провитаминов путем воздействия ультрафиолетового света.



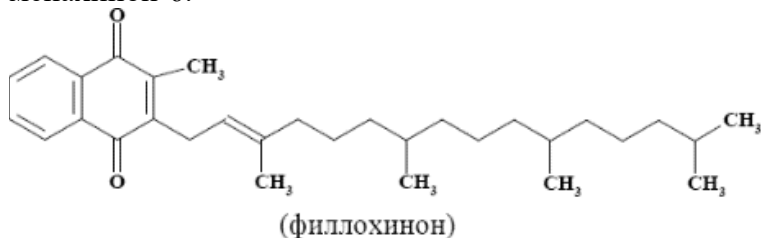
Провитаминами являются стерины, у которых в кольце В имеются две двойные связи. Естественным витамином, находящимся в тканях животного и человека, а также в рыбьем жире, является витамин D₃ (холекальциферол), который образуется из 7-дегидрохолестерина в коже под влиянием ультрафиолетовых солнечных лучей. Витамин D при взаимодействии с анилиновым реактивом при нагревании окрашивается в красный цвет, при взаимодействии с раствором брома в хлороформе в зеленовато-голубой.

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.

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.



5.1. РЕАКЦИЯ С ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТОМ

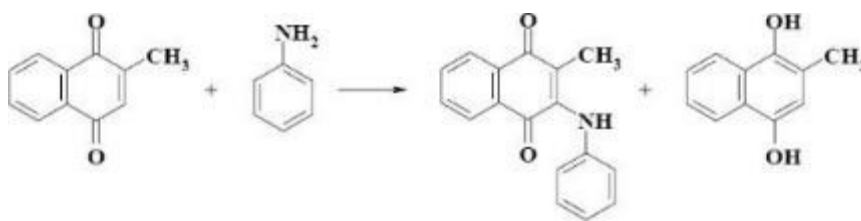
В пробирку вносят 4 капли спиртового раствора витамина К, добавляют 8 капель 5% раствора диэтилдитиокарбамата натрия и 4 капли 4% спиртового раствора NaOH. Содержимое пробирки встряхивают. Постепенно появляется окраска.

5.2. РЕАКЦИЯ СО ЩЕЛОЧНЫМ РАСТВОРОМ ЦИСТЕИНА

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

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.

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

6. ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ ТСХ

Определение А, D₂, Е и β-каротина при совместном присутствии включает выделение жирорастворимых витаминов из субстанции экстракцией 96%-ным этанолом, отделение спиртового экстракта витаминов с помощью делительной воронки, последовательное хроматографирование с использованием силикагелевых пластинок марки «Sorbfil» ПТСХ-П-А на полимерной подложке при участии двух элюентов с различной величиной пробега, время насыщения камеры парами элюента - 20 мин, время элюирования - 55 мин; высушивание при температуре не менее 80°C пластин в термостате в течение 3-5 мин, обработку пластины проявителем - 5%-ным спиртовым раствором кислоты фосфорномолибденовой, согласно изобретению в качестве элюентов использованы гексан:хлороформ (19:1) и гексан:хлороформ (3:1), а детектирование хроматографической зоны β-каротина проводят до обработки пластины проявителем при дневном свете.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Витамины. История их открытия. Роль отечественных ученых.
2. Гиповитаминоз, гипервитаминоз, авитаминоз. Причины возникновения.
3. Номенклатура витаминов
4. Классификация витаминов.
5. Витамин Q (убихинон). Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
6. Витамин Е. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
7. Каротин. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
8. Витамин А. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
9. Витамин Д. Химическая структура витаминов D₂ и D₃, роль в фосфорнокальциевом обмене. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
10. Витамин К. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12. КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ

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

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

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.

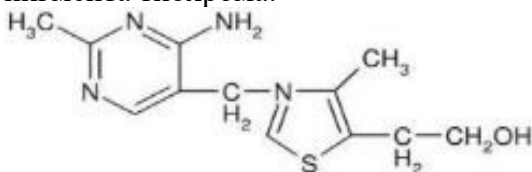
1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИАМИНА (ВИТАМИН В1)

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 ($-\text{CH}_2-$) группой.

При недостаточности тиамин 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.

1.1. ОКИСЛЕНИЕ ТИАМИНА

Под действием железосинеродистого калия тиамин окисляется с образованием желтого пигмента тioxрома.



Ход работы

К 1 мг порошка тиамин добавляют 1мл 5% раствора $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 1мл 10% раствора NaOH , 2 мл бутилового или изоамилового спирта, хорошо встряхивают и дают отстояться и перемешивают. В верхнем спиртовом слое возникает наблюдаемая в ультрафиолетовом свете синяя флюоресценция, исчезающая при подкислении и вновь возникающая при подщелачивании раствора. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет, вследствие превращения тиамин в тioxром.

1.2. ОТКРЫТИЕ ТИАМИНА В ДРОЖЖАХ

1 г сухих дрожжей тщательно растирают в ступке, добавляя постепенно 1 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты. Суспензию центрифугируют, надосадочный раствор обрабатывают, как указано выше.

1.3. ДИАЗОРЕАКЦИЯ

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

Приготовление раствора диазореактива.

В мерную колбу емкостью 100 мл помещают 0,90 г сульфаниловой кислоты, 9 мл концентрированной соляной кислоты, 60–70 мл воды, перемешивают и доводят водой до метки. 5 мл приготовленного раствора помещают в мерную колбу емкостью 100 мл, поставленную на лед, прибавляют 2,5 мл 10%-ного раствора нитрита натрия и смесь оставляют на льду в течение 5 мин. Затем прибавляют ещё 10 мл 10%-ного раствора

нитрита натрия, перемешивают, выдерживают на льду 5 мин и доводят водой до метки. Хранят в холодильнике. Реактив годен в день приготовления.

Ход работы

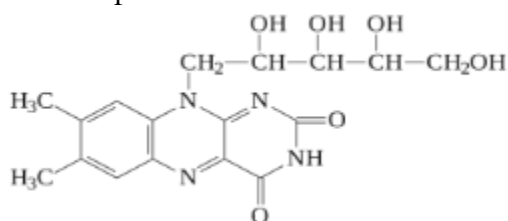
В пробирку вносят 1 мл диазореактива и добавляют на кончике скальпеля порошок тиамин и затем по стенке наклоненной пробирки осторожно приливают 5-7 капель 10 % раствора Na_2CO_3 . Появляется желто-оранжевое окрашивание, при стоянии переходящее в красное.

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.

2.1. Обнаружение с метиленовым синим

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.

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.

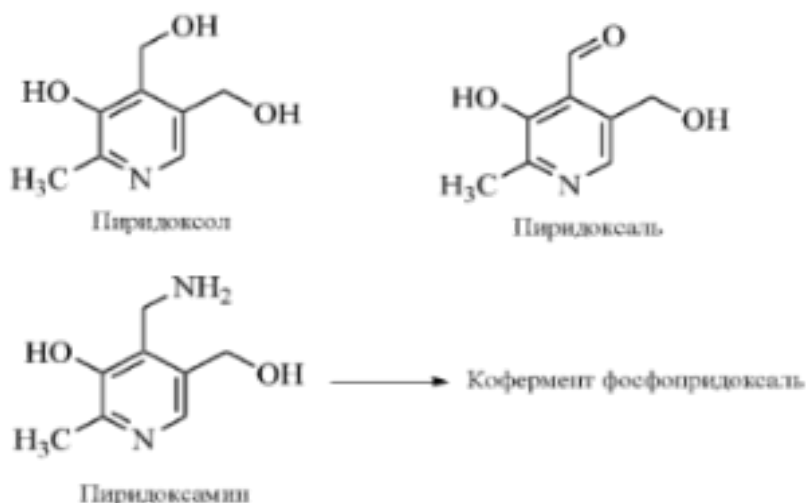
Ход работы

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 конц. HCl (начинается выделение пузырьков водорода). Отметить окраску через 10-15 мин.

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 аминокислот. Термин «витамин В6» применяется ко всем трем производным 3-оксипиридоксина, которые обладают витаминной активностью: пиридоксину, пиридоксалу и пиридоксамину.

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.



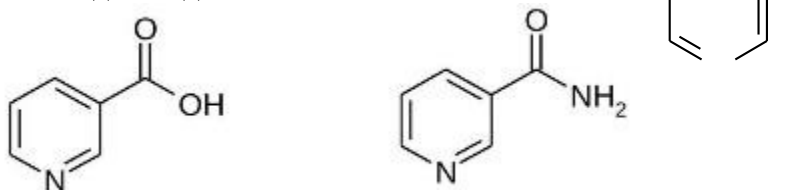
Ход работы

К 5 каплям раствора витамин В6 прибавляют 1 каплю 5% раствора FeCl₃. Встряхивают, жидкость приобретает красную окраску.

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИН РР)

Никотиновая кислота (витамин РР) – в виде амида 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.



4.1. РЕАКЦИЯ 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 СН₃СООН. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем раствора (СН₃СОО)₂Сu. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает осадок синего цвета медной соли никотиновой кислоты.

4.2. ОТКРЫТИЕ 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.

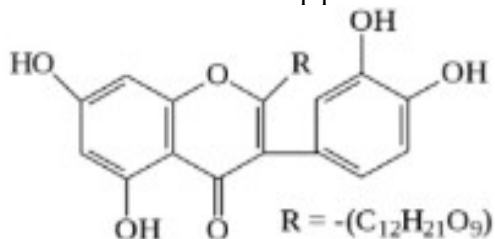
Ход работы

В пробирку помещают немного соды и равное количество никотиновой кислоты. Нагревают смесь в пламени горелки в вытяжном шкафу при включенной тяге. Устанавливают выделение пиридина по появлению характерного запаха.

5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА (ВИТАМИН Р)

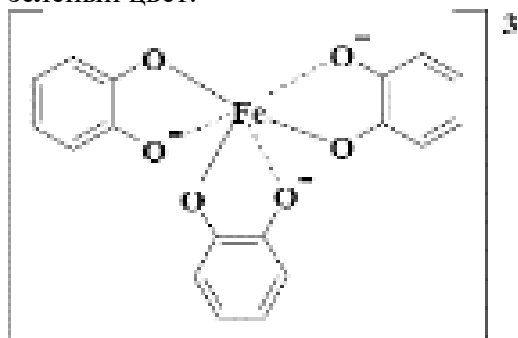
Известно несколько соединений, обладающих Р-витаминной активностью. В основе их лежит скелет флавонола. Рутин – кристаллическое вещество желто- оранжевой окраски.

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.



5.1. РЕАКЦИЯ С ХЛОРИДОМ ЖЕЛЕЗА

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



Ход работы

А. К 12 мл насыщенного водного раствора рутина прибавляют несколько капель 1% раствора $FeCl_3$. Возникает зеленое окрашивание.

Б. Налить в пробирку 1 мл чайной заварки (в ней содержится витамин Р) и добавить к ней 5 капель $FeCl_3$. Осторожно встряхнуть пробирку и разбавить полученный раствор, добавив 2 мл дистиллированной воды. Отметить изменение раствора.

5.2. 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 конц. H_2SO_4 . На границе двух жидкостей возникает окрашенное в желтый цвет кольцо.

5.3. 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 HCl . Смесь доводят до кипения, кипятят в течение 1 мин, затем отфильтровывают. К полученному фильтрату приливают 3 мл 10% раствора $NaOH$ и 3 мл Фелинговой жидкости, нагревают до кипения. Выпадает красный осадок оксида меди.

5.4. РЕАКЦИЯ С МАГНИЕМ И СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

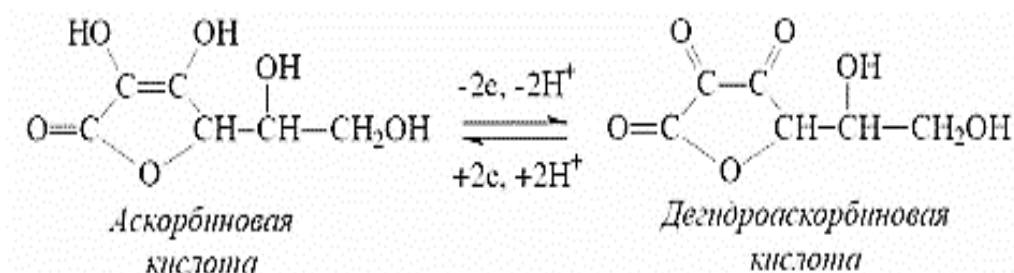
Флавоноиды реагируют с магнием и соляной кислотой, легко восстанавливаются, давая окрашенные соединения. При восстановлении кверцетина образуется цианидин.

Ход работы

К 1 мл насыщенного спиртового раствора кверцетина на кончике скальпеля добавляют порошок Mg и 3-4 капли конц. HCl . Жидкость сначала окрашивается в розовый цвет, при стоянии интенсивность окраски усиливается.

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Витамин С – водорастворимое соединение, содержащее шесть атомов углерода. Представляет собой лактон. В основе качественных реакций и количественных методов определения аскорбиновой кислоты лежит окислительно-восстановительный процесс: аскорбиновая кислота окисляется дегидроаскорбиновую, а другое вещество восстанавливается.



7.1. РЕАКЦИЯ С ЖЕЛЕЗОСИНЕРОДИСТЫМ КАЛИЕМ

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

Ход работы

В пробирку помещают 10 капель вытяжки из шиповника, добавляют 2 капли 10% раствора NaOH, 2 капли 5% раствора $K_3Fe(CN)_6$ и перемешивают.

К содержимому пробирки добавляют 6 капель 10% раствора HCl и 2 капли 1% раствора $FeCl_3$. 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.

7.2. РЕАКЦИЯ С МЕТИЛЕНОВОЙ СИНЬЮ

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

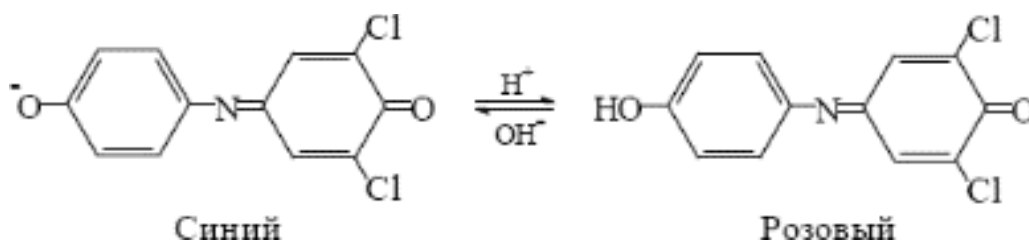
Ход работы

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

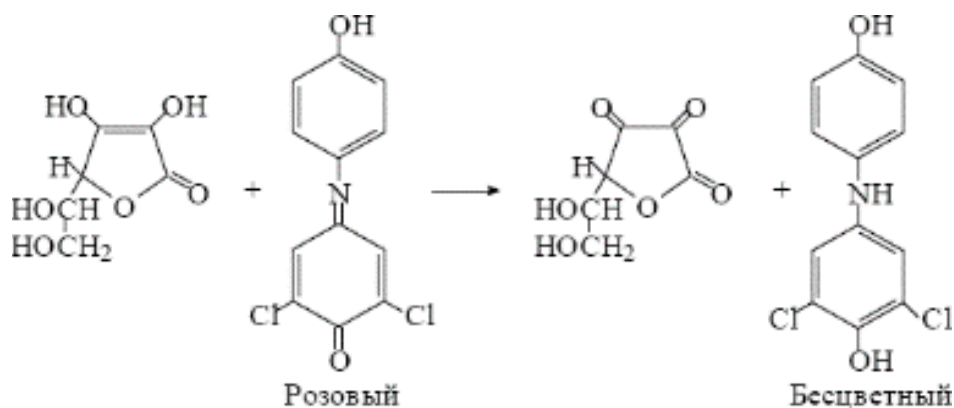
Для контроля проделывают ту же реакцию, беря вместо вытяжки из шиповника дистиллированную воду. Обесцвечивания жидкости не происходит.

7.3. РЕАКЦИЯ С 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛОМ (метод Тильманса)

Титрование аскорбиновой кислоты 6-дихлорфенолиндофенолом 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.

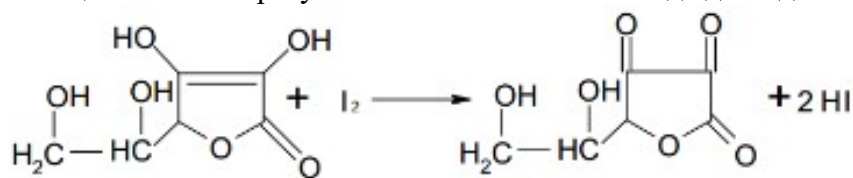


Ход работы

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.

7.4. РЕАКЦИЯ С РАСТВОРОМ ЛЮГОЛЯ

При взаимодействии аскорбиновой кислоты с раствором Люголя происходит обесцвечивание в результате восстановления йода до йодистоводородной кислоты.

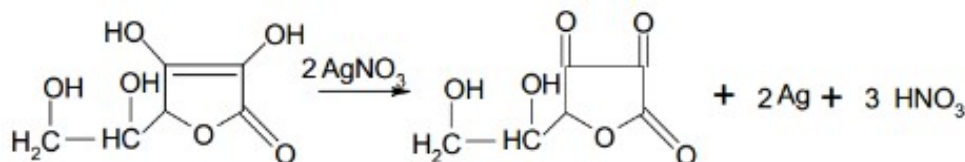


Ход работы

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

7.5. СЕРЕБРЯНАЯ ПРОБА НА ВИТАМИН С

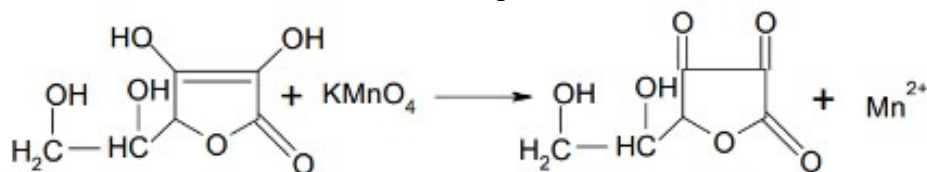
При добавлении витамина С к нитрату серебра выпадает в осадок в виде металлического серебра.



В две пробирки (опыт и контроль) вносят по 5 капель 1% раствора аскорбиновой кислоты; затем в опытную пробирку добавляют 1-2 капли 1% раствора AgNO_3 , а в контрольную 1-2 капли дистиллированной воды. В опытной пробе наблюдается появление темного осадка металлического серебра.

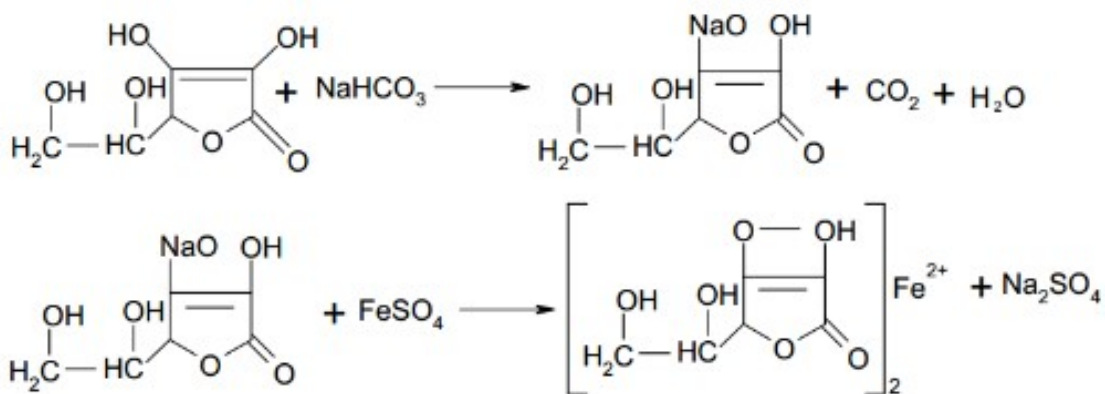
7.6. РЕАКЦИЯ С КАЛИЯ ПЕРМАНГНАТОМ

К 1 мл реактива раствора перманганата калия по каплям добавляют извлечение из сырья, содержащее аскорбиновую кислоту. Наблюдают обесцвечивание раствора перманганата калия вследствие восстановления марганца до Mn^{2+} .



1.6. РЕАКЦИЯ С СОЛЬЮ ЖЕЛЕЗА (II)

К 1 мл извлечения добавляют 1 мл раствора гидрокарбоната натрия и 1 мл сульфата железа (II). Наблюдают образование аскорбината железа фиолетового цвета



Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица - Результаты лабораторной работы

8. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЦИАНОКОБАЛАМИН (ВИТАМИН В12)

При взаимодействии ионов кобальта, содержащихся в витамине, с тиомочевинной при нагревании образуется роданид кобальта зеленого цвета.

Ход работы

На беззольный фильтр наносят 2-3 капли тиомочевинны, высушивают над плиткой. Затем на фильтр наносят 1-2 капли минерализата витамина В12 и вновь высушивают. На фильтре по краям пятна появляется зеленое окрашивание, свидетельствующее о наличии кобальта.

№	Биоматериал	Витамин	Реактивы	Наблюдение	Реакция

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Витамин В1. Химическая природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
 2. Витамин В2. Строение и участие его в окислительно-восстановительных реакциях. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
 3. Витамин В6. Формы и значения. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
 4. Витамин В12. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
 5. Витамин С. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
 6. Витамин Р. Природа и механизм действия. Взаимообусловленность действия витаминов С и Р. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
 7. Витамин Н. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
 8. Витамин РР. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
 9. Витамин В9 (фолиевая кислота). Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы
- Витамин В5 (пантотеновая кислота). Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность. Напишите формулы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13. ОТКРЫТИЕ ФЕРМЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СВОЙСТВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с методами определения ферментов.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

На V Международном биохимическом конгрессе был утвержден научно обоснованный проект номенклатуры. Название фермента необходимо формировать из химического названия субстрата и названия катализируемой реакции. Если реакция сопровождается переносом группировки атомов от субстрата к акцептору, в название фермента включает наименование акцептора. В основу классификации лежит тип катализируемой реакции.

В августе 2018 г был введен 7 класс ферментов. Таким образом согласно современной классификации ферменты делят на семь классов:

КФ 1. Оксидоредуктазы (окислительно–восстановительные реакции).

КФ 2. Трансферазы (реакции межмолекулярного переноса атомов, групп атомов, радикалов).

КФ 3. Гидролазы (расщепление внутримолекулярных связей органических молекул с участием воды).

КФ 4. Лиазы (разрыв связей C–O, C–C, C–N, а также обратимые реакции отщепления различных групп от субстратов негидролитическим путем).

КФ 5. Изомеразы (взаимопревращения оптических и геометрических изомеров, т.е. ускоряют пространственные или структурные перестройки в пределах одной молекулы).

КФ 6. Лигаза (синтез органических веществ из двух исходных молекул с использованием энергии распада АТФ).

КФ 7. Транслоказы (объединяет мембранные ферменты, функцией которых является перенос ионов).

1. ОТКРЫТИЕ ФЕРМЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ

1.1. Обнаружение пероксидазы

Навеску редьки (капусты) массой 1-2 г измельчают, растирают в ступке и переносят в стакан, смывая водой, общий объем вытяжки 10 мл, вытяжку фильтруют. В пробирку вносят 2 мл вытяжки из растения и кипятят. После охлаждения в 4 пробирки вносят по 1 мл 2 % раствора пирогаллола и добавляют в пробирки номер 1 и 4 пробирки по 1 мл нативной вытяжки растения, в пробирку номер 2 вносят 1 мл прокипяченной вытяжки, в пробирку номер 3 вносят 1 мл воды. После этого в пробирки 1, 2, 3 добавляют 2–3 капли 1% раствора H_2O_2 , взбалтывают и наблюдают образование осадка.

1.2. Обнаружение тирозиназы в картофеле

Навеску картофеля массой 2 г измельчают и растирают в ступке с 10 мл воды, 5 минут настаивают, встряхивают и фильтруют. Полученный фильтрат разливают в две пробирки вносят по 1 мл вытяжки из картофеля. Содержимое одной из них кипятят и охлаждают. В обе пробирки вносят по 5 капель 0,1 % раствора тирозина и термостатируют при температуре 37 °С. Через 5 минут пробирки вынимают и встряхивают. Если изменений нет, оставляют в термостате еще на 5 минут. Жидкость в пробирке постепенно будет окрашиваться в разные цвета.

1.3. Обнаружение амилазы слюны

В пробирку наливают 5-10 мл 1%-го раствора крахмала и около 2 мл разбавленной в 10 раз слюны. Содержимое пробирки перемешивают и ставят на водяную баню с температурой 37 °С. Затем через 2 мин стеклянной палочкой отбирают 2 капли раствора крахмала и смешивают на стекле с одной каплей раствора йода. Вначале жидкость, взятая из пробирки, будет давать с йодом синее окрашивание, затем капли постепенно будут окрашиваться с йодом в темно-коричневый, коричневый и, наконец, окажутся бледно-желтыми.

1.4. Обнаружение амилазы в меде

Пронумеровать стеклогграфом 3 пробирки, в каждую из которой внести по 5 мл 1 % раствора крахмала. В пробирку 1 внести 5 капель уксусной кислоты, в пробирку 2 внести

5 капель раствора соды. В пробирку 3 прибавьте 5 капель дистиллированной воды. Содержимое всех пробирок перемешайте и в каждую внесите по 1 мл 10% водного раствора меда. Через 10 мин из всех пробирок отберите на стекло по 2 капли жидкости и прибавьте 2 капли раствора иода. Пробирки вновь поместите в термостат. Еще через 10 мин повторите эксперимент. Крахмал и декстрины, дают различную окраску с подом, и по мере разрушения крахмала амилазой цвет меняется. Так можно судить не только о распаде крахмала, но и о том, какая среда – кислая, нейтральная или щелочная – более благоприятна для этого процесса.

1.5. Обнаружение липазы в мышечной ткани

Для получения экстракта мышечной ткани берут 5 мл воды на 1 г ткани, настаивают несколько минут, периодически встряхивая и фильтруют. В 1-ю пробирку добавляем 1 мл экстракта мышечной ткани, во вторую пробирку – 1 мл воды. В обе пробирки доливаем по 1 капле 0,5 %-го раствора фенолфталеина и по каплям 1 %-ный раствор карбоната натрия до появления бледно-розовой окраски при pH - 8 (нельзя приливать избыток раствора карбоната натрия). Пробирки помещают в термостат при температуре 37 °C на 30 мин наблюдают обесцвечивание окраски в пробирке, содержащей липазу.

1.6. Обнаружение липазы в молоке

В две пробирки вносят по 10 капель 5 % раствора молока. В первую пробирку добавляют 5 капель 5 % раствора панкреатина, во вторую – 5 капель воды. Затем в обе пробирки вносят по 1 капле 1 % раствора фенолфталеина и по каплям 1 % раствор Na₂CO₃ до появления бледно-розовой окраски. Пробирки помещают в термостат при температуре 37 °C на 30 мин, после чего наблюдают изменение окраски.

1.7. Обнаружение сахаразы дрожжей

Навеску 0,5 г дрожжей растирают в фарфоровой ступке в течение 2 мин с песком и 5 мл воды, затем фильтруют. Фильтрат должен быть прозрачным. Берут четыре пробирки и приливают по 1 мл экстракта дрожжей, в первые две добавляют по 1 мл 5 % раствора NaOH и нагревают до кипения. Затем во все четыре пробирки приливают по 3 мл 1 % раствора сахарозы. Пробирки три и четыре ставят термостатируют в течение 15 мин при 37 °C. Затем добавляют по 1 мл 5 % гидроксида натрия. Пробирки охлаждают и вносят по 3 мл фелинговой жидкости и кипятят. Выпадает красный осадок гидрата закиси меди. По количеству осадка судят об активности инвертазы

1.8. Обнаружение дегидраз дрожжей

В первую пробирку помещают по 3 мл суспензии из свежих дрожжей в 5 % растворе сахарозы, во вторую пробирку вносят аналогичную суспензию, но уже прокипяченных дрожжей. Вносят в каждую 2–3 капли метиленовой сини и термостатируют при 37 °C в течение 10 мин. В одной из пробирок наблюдают изменение окраски.

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

Материалы и реактивы: раствор слюны, 0,1 % раствор крахмала, вода, раствор йода, дистиллированная вода.

Ход работы

В 10 пронумерованных пробирок наливают по 1 мл воды. В первую 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 вторую; из второй таким же образом в третью и т.д. до десятой 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

№	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		

Пример расчета: если с красно-бурой окраской жидкость была отмечена в 5 пробирке, где слюна разбавлена в 160 раз и куда было добавлено 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, 1 мл 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 мин 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.

Диагностическое значение. Амилазная активность слюны резко возрастает при воспалении околоушной слюнной железы.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Понятие о ферментах, история их открытия. Доказательства белковой природы большинства ферментов. Рибозимы, открытие, роль, применение
2. Локализация ферментов в клетке. Источники сырья для выделения ферментов
3. Специфичность действия ферментов. Виды специфичности ферментов. Напишите уравнения реакций.
4. Центры ферментов. Активный центр, каталитический центр, адсорбционный (связывающий) центр. Характеристика активного центра. Аллостерические центры
5. Сравнение ферментов и небиологических катализаторов
6. Классификация ферментов. История, современное положение. Примеры реакций для каждого класса
7. Активаторы ферментов. Роль металлов в активировании ферментов. Активирование разных ферментов одинаковым металлом.
8. Понятие о ингибиторах. Классификация ингибиторов. Примеры. Необратимые ингибиторы. Примеры. Обратимые ингибиторы. Примеры. Неконкурентное ингибирование. Примеры. Бесконкурентное ингибирование. Примеры. Ретроингибирование.
9. Понятие о простых и сложных ферментах. Кофакторы и коферменты. Протетическая группа. Классификация коферментов и кофакторов. По способу действия. По химическому строению. Классификация по способу действия. Примеры
10. Изоферменты. Примеры, применение. Написать уравнение с участием фермента, значение в диагностике, локализация.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: определить оптимальные условия действия ферментов.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Скорость ферментативной реакции зависит от температуры. Т.к. ферменты являются белками, то при повышении температуры до определенного уровня они будут подвергаться тепловой денатурации, что приведет к прекращению ферментативной реакции. При температурах ниже нуля ферменты не денатурируют, однако их активность падает. При температуре свыше 50 °С многие ферменты утрачивают биологическую активность. Однако существуют и термостабильные ферменты. Например, микроорганизмы, обитающие в горячих источниках, имеют такие термоустойчивые ферменты. Таq-полимераза, содержащаяся у микроорганизмов обитающих в горячих источниках, не денатурирует при температуре до 95 °С. Таq-полимеразу используют в медицине для диагностики заболеваний с использованием метода ПЦР.

1. ТЕРМОЛАБИЛЬНОСТЬ α -АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ

Ферменты термоллабильны, т.е. чувствительны к высокой температуре. Свойство ферментов инактивироваться при кипячении можно показать на примере α -амилазы слюны.

Материалы и реактивы: 1 % раствор крахмала, раствор Люголя, раствор слюны, реактивы для реакции Троммера (10 % раствор гидроксида натрия, 5 % раствор сульфата меди).

Приборы и посуда: пробирки, штатив, спиртовки, пипетки, пипетатор, термостат.

Ход работы

В пробирку отливают около 2 мл разбавленной слюны и кипятят в течение 2–3 мин (следя за тем, чтобы образующаяся пена также прогревалась), после чего охлаждают. В две пробирки наливают по 10 капель 1 % раствора крахмала. В одну из них добавляют 10 капель разбавленной слюны, в другую – 10 капель разбавленной слюны, предварительно прокипяченной и остуженной.

Содержимое обеих пробирок перемешивают и помещают в термостат при 37 °С на 10 мин. После действия фермента на субстрат из каждой пробирки отбирают по 3–5 капель жидкости в заранее заготовленные пробирки с 1–2 каплями раствора Люголя. Проба из пробирки с не прокипячённой слюной окрашивания с йодом не дает. Проба из пробирки с предварительно прокипяченной слюной дает с йодом синее окрашивание.

С оставшейся жидкостью в обеих пробирках производят реакцию Троммера, внося 1 мл 10 % раствора гидроксида натрия и добавляя по каплям 5 % раствор сульфата меди. Реакция Троммера будет положительна с не прокипячённой слюной, и отрицательна в случае действия на крахмал прокипяченной слюны. Полученные данные внести в таблицу.

Таблица – Термоллабильность амилазы

Фермент	Субстрат	Реакция с крахмалом	Реакция Троммера
Нативная α -амилаза			
Инактивированная α -амилаза			

2. ЗАВИСИМОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ОТ РЕАКЦИИ СРЕДЫ

Большинство ферментов активны в диапазоне pH от 6 до 8. Кривая зависимости между активностью фермента и pH может иметь форму плато, если при значениях pH, намного превышающих pH кислой зоны, в которой достигается максимальная активность, начинает действовать фактор, ограничивающий ферментативную активность при высоких pH.

Величина pH крови сохраняется на постоянном уровне, в норме pH, близко к 7,3–7,4. Даже небольшие сдвиги pH могут привести к значительным изменениям скорости жизненно необходимых организму ферментативных реакций, идущих, например, в скелетных мышцах или мозге. Нарушение механизмов, отвечающих за регуляцию pH,

наблюдающиеся, например, при некоторых заболеваниях – диабете в результате ацидоза, из-за усиленной выработки метаболитических кислот, приводит к падению рН крови до 6,8 и ниже, что может привести к тяжелым последствиям и смертельному исходу. Аналогичные проблемы могут возникнуть при повышении уровня рН при алкалозе.

Ферменты, как и все белки, имеют заряженные группы. Общий заряд молекулы зависит от уровня Н. Ферменты, как правило, активны в пределах определенной зоны концентрации водородных ионов. Точка, в которой фермент максимально активен, считается его оптимумом рН.

Материалы и реактивы: 0,2 М гидрофосфат натрия, 0,1 М лимонная кислота, раствор слюны, 1% раствор крахмал, раствор Люголя, раствор йода, лед.

Приборы и посуда: термостат, пробирки, предметное стекло, штатив, пипетки, пипетатор.

Ход работы

Готовят буферные растворы, как указано в таблице.

Таблица – Приготовление буферных растворов

№	Количество 0,2 М Na_2HPO_3 , мл	Количество 0,1 М лимонной кислоты, мл	рН
1	0,58	0,42	5,6
2	0,77	0,23	6,8
3	0,97	0,03	8,0

К 1 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 мин. После чего из пробирки 3 отбирают несколько капель жидкости и на стекле смешивают с раствором Люголя.

Если получается синее окрашивание, то реакцию с йодом повторяют каждые 5 мин до тех пор, пока не будет красного или оранжевого окрашивания, которое указывает на близкий конец гидролиза. Через 2–3 мин 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 рН 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 степень распада крахмала.

Результаты занести в таблицу.

Таблица – Зависимость активности амилазы слюны от рН среды

№	рН среды	Окраска с йодом	Оптимум рН
1			
2			
3			

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

3. ИНГИБИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Из ингибиторов ферментов известны соли синильной кислоты, угнетающие некоторые «геминные» ферменты, монойодуксусная кислота, приостанавливающая спиртовое и молочнокислое брожение, фосфорорганические соединения, необратимо инактивирующие ряд эстераз и др.

Материалы и реактивы: вода, молоко, 1 % раствор хлорида натрия, 1 % раствор суфата меди, раствор слюны, 1 % раствор крахмала, раствор йода, 1 % раствор $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$.

Приборы и посуда: пробирки, штатив, пипетки, пипетатор, термостат.

Ход работы

В пробирку номер один вносят 1 мл воды, в пробирку номер два вносят 0,3 мл воды и 0,2 мл 1 % раствора хлорида натрия, в пробирку номер три вносят 0,8 мл воды и 0,2 мл 1 % раствора сульфата меди и во все пробирки вносят по 1 мл разбавленной слюны. Содержимое пробирок перемешивают и добавляют по 0,5 мл 1 % раствора крахмала. Все пробирки термостатируют при 37 °С в течение 5 мин и одновременно охлаждают в емкости со льдом. Затем во все пробирки вносят несколько капель раствора йода.

В четвертую пробирку вносят 1 мл амилазы, 1 мл крахмала, 1 мл 1 % раствора ацетата свинца и 1 мл молока. Во пятую пробирку вносят все те же реактивы, но вместо молока добавляют 1 мл воды. Содержимое пробирок перемешивают и термостатируют в течение 20 мин при 30 °С. По окончании термостатирования в обе пробирки вносят по 1 капле йода. В пробирках есть ионы свинца, инактивирующие амилазу, однако в присутствии молочных белков активность амилазы сохраняется, о чем свидетельствует отсутствие синего цвета раствора после внесения йода.

Результаты работы заносят в таблицу .

Таблица – Активирование и ингибирование фермента

№	Добавленное вещество	Окраска после добавления йода	Вывод
1	Вода		
2	NaCl		
3	CuSO ₄		
4	(CH ₃ COO) ₂ Pb		

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Зависимость активности ферментов от температуры. Температурный оптимум действия ферментов. Как влияет снижение температуры ниже 0 °С на активность ферментов? Приведите примеры термолабильных ферментов. Постройте график зависимости ферментативной активности в зависимости от влияния температуры.
2. Какое практическое значение в медицине может иметь определение активности ферментов в биологических жидкостях, например, в сыворотке крови или в моче человека?
3. Зависимость ферментативной активности от pH среды. Графики и примеры. Оптимальное значение pH среды для ферментативной активности ферментов? Каковы физико–химические основы влияния оптимального значения pH среды на ферментивную активность? Каково влияние на ферментативную активность сдвига pH от оптимума? Примеры активности ферментов с оптимумом pH среды
4. Активаторы ферментов. Роль металлов в активировании ферментов. Активирование разных ферментов одинаковым металлом.
5. Понятие о ингибиторах. Классификация ингибиторов. Примеры. Типы ингибирования, примеры реакций. Субстратное ингибирование. Ретроингибирование. Примеры

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 15. РЕАКЦИИ НА ОТКРЫТИЕ МОНОСАХАРИДОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с методами выделения моносахаридов и качественными реакциями наиболее распространенных представителей класса углеводов.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

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 тетрозы (C4), пентозы (C5), гексозы (C6) и т.д. В каждую из этих групп включают и альдозы и кетозы.

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.

1. ГАЛАКТОЗА ИЗ ЛАКТОЗЫ

Галактозу получают гидролитическим расщеплением молочного сахара. Галактоза как структурная часть входит также в состав трисахарида рафинозы, выделяемой из свекловичной патоки и из таких сложных продуктов, как пектин, слизи, камеди, галактаны и некоторые сапонины. Галактоза, восстанавливаясь амальгамой натрия, образует спирт дульцит, а окисляясь, дает одноосновную галактоновую кислоту и затем двухосновную – слизевую.

Ход работы

2 г лактозы растворяют в 10 мл воды, приливают 1 мл конц. H₂SO₄ и кипятят 2 ч в круглодонной колбе емкостью 100 мл, снабженной обратным холодильником. К горячему (но не кипящему) раствору осторожно добавляют около 0,5 г активного угля, перемешивают и нейтрализуют горячим насыщенным раствором Ba(OH)₂. Нейтрализацию контролируют бумажкой конго.

Осадок отфильтровывают, к фильтрату добавляют около 0,5 мл ледяной CH₃COOH и упаривают на водяной бане при температуре не выше 45°C.

Подтвердить наличие галактозы в гидролизате качественными реакциями.

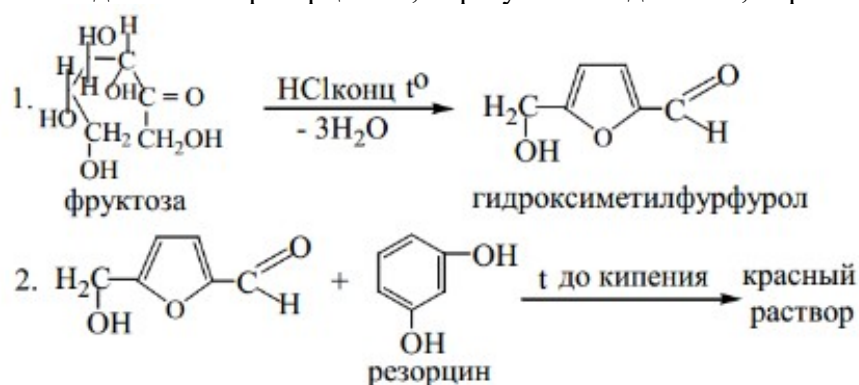
1. С 1% раствором флороглюцина в соляной кислоте галактоза дает красное окрашивание.

2. Азотная кислота окисляет галактозу, превращая ее в нерастворимую в воде кислоту.

2. 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.



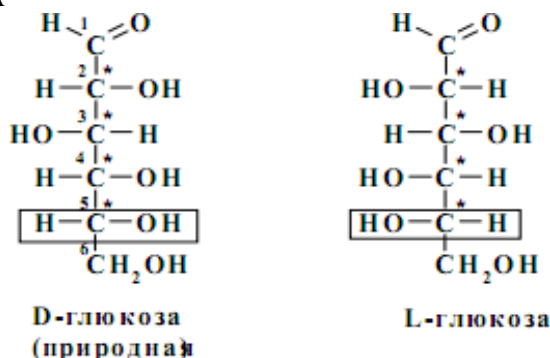
Ход работы

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?

3. ОТКРЫТИЕ ГЛЮКОЗЫ

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.

3.1. ПРОБА БЕНЕДИКТА



Реактив Бенедикта: В колбу на 1 л наливают 700 мл дистиллированной воды, добавляют 173 г лимоннокислого натрия, 100 г безводного (или 200 г кристаллического) Na_2CO_3 . Нагревают до растворения. Отдельно растворяют 17,3 г CuSO_4 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 горелке или 5 мин на водяной бане. Раствор охлаждают и через 5 мин отмечают результаты. При наличии глюкозы раствор окрашивается в зеленый, желтый или красный цвет, на дне образуется осадок.

3.2. 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 CuSO_4 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.

3.3. ОТКРЫТИЕ 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.

3.4. РЕАКЦИЯ С ПИКРИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

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

Ход работы

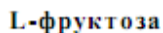
К 1 мл 1% раствора глюкозы приливают 0,5 мл 10% раствора NaOH и 1 мл 1% раствора пикриновой кислоты. Смесь нагревают на водяной бане.

Что происходит?

4. ОТКРЫТИЕ ФРУКТОЗЫ

4.1. КОНДЕНСАЦИЯ С ВАНИЛИНОМ

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



Ход работы

4.2. РЕАКЦИЯ С АРГИНИНОМ

Ход работы

5. РЕАКЦИЯ «СЕРЕБРЯНОГО ЗЕРКАЛА»

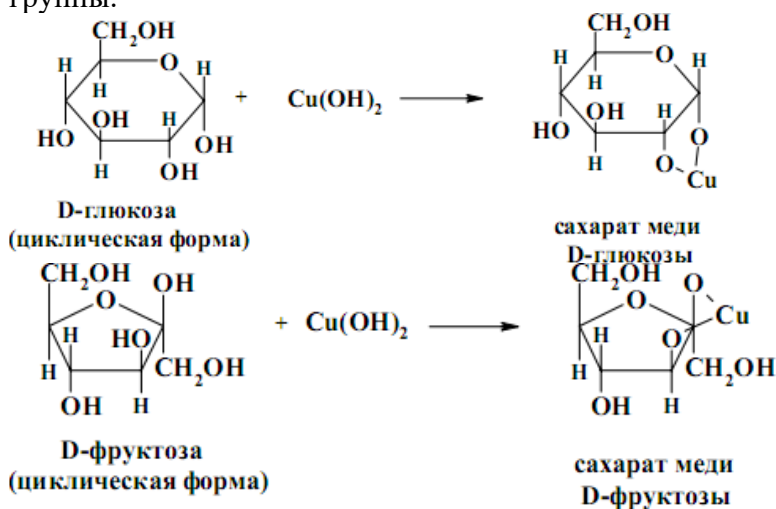
$$\begin{array}{c}
 \text{H}-\text{C}=\text{O} \\
 | \\
 \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\
 | \\
 \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\
 | \\
 \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\
 | \\
 \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\
 | \\
 \text{CH}_2\text{OH} \\
 \text{D-глюкоза}
 \end{array}
 \xrightarrow{\text{Ag}_2\text{O}, \text{NH}_4\text{OH}}
 \begin{array}{c}
 \text{HO}-\text{C}=\text{O} \\
 | \\
 \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\
 | \\
 \text{HO}-\text{C}-\text{H} \\
 | \\
 \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\
 | \\
 \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\
 | \\
 \text{CH}_2\text{OH} \\
 \text{D-глюконовая кислота}
 \end{array}
 + \text{Ag}\downarrow + \text{NH}_3\uparrow + \text{H}_2\text{O}$$

Ход работы

6. ОТКРЫТИЕ АЛЬДЕГИДНЫХ ГРУПП (реакция Троммера)

64

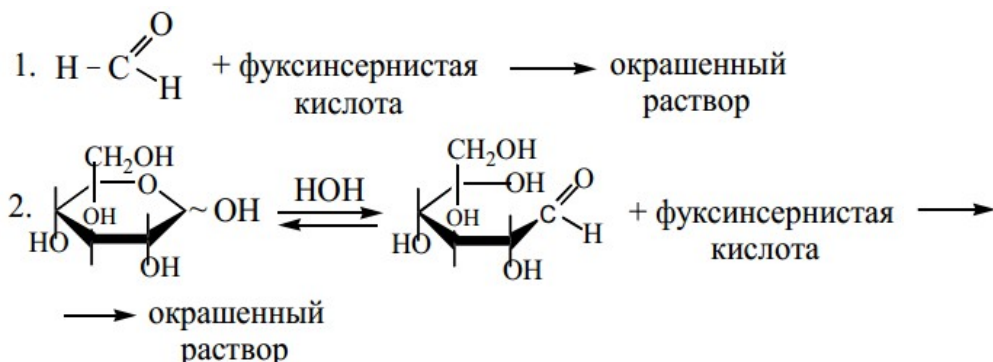
моносахаридам. У невосстанавливающих углеводов не содержится свободного полуацетального гидроксила и не проявляются характерные реакции для альдегидной группы.



Ход работы

В большую пробирку поместить 0,5 мл 0,5% раствора глюкозы и 6-8 капель 2 н NaOH. Затем по каплям добавлять 0,2 н раствор CuSO₄, пока не прекратится его растворение. Осторожно нагреть пробирку. Голубой не растворимый в воде осадок гидрата окиси меди постепенно переходит в желтый, а затем в красный осадок закиси меди. Аналогичный опыт проделать с 0,5% раствором фруктозы.

7. ОТКРЫТИЕ КАРБОНИЛЬНЫХ ГРУПП



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?

8. 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.

8.1. 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 конц. H₂SO₄, 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.

8.2. РЕАКЦИЯ С СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

Небольшое количество глюкозы смешать с 2 мл конц. HCl, кипятят 20-30 с, раствор охлаждают и добавляют воду до 2/3 высоты пробирки. Повторяют этот же опыт, заменив глюкозу фруктозой. Что наблюдается?

9. 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% 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, фруктоза), дисахариды (сахароза, лактоза, мальтоза), добавляют вдвое меньший объем конц. 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 H₂SO₄. Окраска бледнеет и появляется отчетливый запах карамели (жженого сахара).

10. ОКИСЛЕНИЕ АЛЬДОЗЫ И КЕТОЗЫ ЙОДОМ

Опыт проводят параллельно с растворами (2% 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.

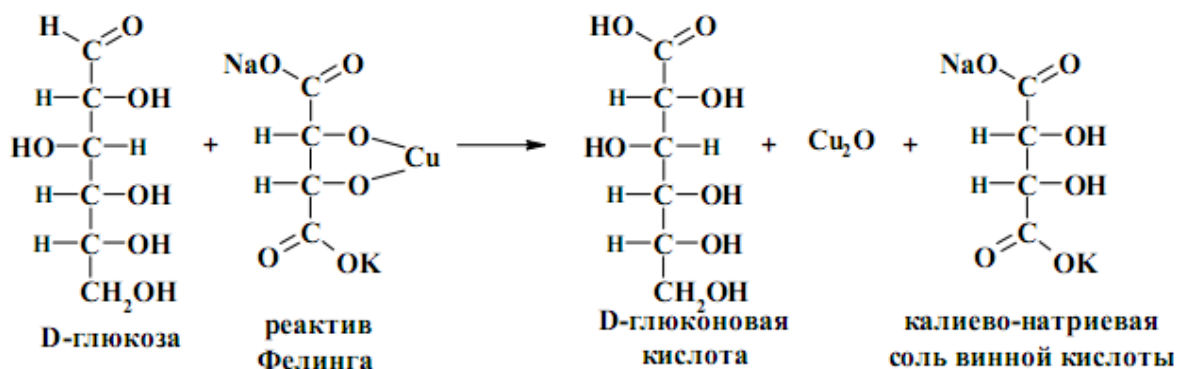
Через 7-8 мин приливают в обе пробирки по 0,5 мл разбавленной H₂SO₄ и сравнивают появляющуюся окраску.

11. 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 Na₂CO₃.



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 первую налить 1 мл раствора глюкозы, во вторую – 1 мл раствора формалина, в третью – 1 мл воды. В каждую пробирку добавить 1 мл реактива Фелинга. Нагреть все пробирки и сделать выводы.

12. ГЛЮКОЗА – ВОССТАНОВИТЕЛЬ КРАСИТЕЛЯ

Данная реакция не бесконечная, она будет идти до тех пор, пока в растворе есть глюкоза и доступ кислорода. Смысл данной реакции в том, что как только к глюкозе в щелочной среде мы добавляем индикатор, глюкоза – окисляется, а индикатор восстанавливается и меняет свой цвет. Когда мы встряхиваем раствор, индикатор реагирует с кислородом, который содержится в воздухе, и назад окисляется.

Ход работы

Взять колбу на 250 мл, прилить 200 мл воды и растворить в ней пару ложек глюкозы (около 2–3 г).

В этом растворе растворить 0,5 ложки щелочи (3–5 г) (раствор №1).

Взять новую колбу, прилить туда 50 мл воды и растворить в ней индигокармин на кончике шпателя (0,05 г).

Получаем раствор ярко синего цвета. Если переборщили с индикатором, то раствор лучше разбавить.

Добавляем 100 мл первого раствора глюкозы. В начале раствор окрасился в зеленый цвет, затем в красный и теперь он желтый, поэтому опыт называется «химический светофор».

Чтобы обратить реакцию вспять, нужно перемешать раствор.

Если хотите получить более насыщенные цвета – добавьте немного индикатора.

В другой стаканчик наливаем 50 мл воды и добавляем немного метиленового синего.

Приливаем остаток раствора с глюкозой №1.

Размешайте и дайте немного постоять. Раствор обесцвечивается. Реакция идет по такому же принципу, как и с индигокармином. На поверхности, где раствор пересекается с кислородом воздуха остается синяя полоска.

После перемешивания, синий цвет раствора возвращается.

Слейте вместе 2 раствора с индигокармином и с метиленовым синим.

Опишите какие цвета мы наблюдаем?

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Углеводы – определение, распространение, функции. Напишите примеры формул.
2. Классификация и номенклатура углеводов. Напишите примеры.
3. Уровни структурной организации полисахаридов. Примеры
4. Способы написания формул углеводов, формулы Фишера, Колли—Толленса, Хеуорса, конформационные формулы. Напишите примеры формул
5. Физико-химические свойства моносахаридов. Напишите реакции.
6. Виды изомерии моносахаридов. **Стереоизомерия моносахаридов.** Энантиомеры, диастереомеры, оптическая активность, аномеры, мутаротация, рацемическая смесь. Напишите формулы.
7. Представители моносахаридов. Триозы. Тетрозы Напишите примеры формул.
8. Представители моносахаридов. Пентозы. Напишите примеры формул.
9. Представители моносахаридов. Гексозы. Напишите примеры формул.
10. Представители моносахаридов. Гептозы. Напишите примеры формул.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 16. ПОЛУЧЕНИЕ И РЕАКЦИИ НА ОТКРЫТИЕ ОЛИГОСАХАРИДОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить представления о химии углеводов. Научиться получать и идентифицировать дисахариды на основе качественных реакций.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Олигосахариды – углеводы, молекулы которых содержат от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями. В соответствии с этим различают дисахариды, трисахариды и т.д.

В природе олигосахариды (содержащие от 3 до 8 остатков моносахаров) практически не встречаются, обнаруживаясь в очень незначительных количествах в клетке, как полупродукты синтеза амилозы. Олигосахариды классифицируют:

- в зависимости от числа моносахаридных фрагментов, входящих в олигосахариды: дисахариды, трисахариды, тетрасахариды и т. д.;

по составу моносахаридных остатков:

- гомоолигосахариды, состоящие из остатков одного вида моносахарида;
- гетероолигосахариды, состоящие из остатков разных сахаров;
- в зависимости от порядка соединения мономеров:
- линейные и разветвленные;
- восстанавливающие и невосстанавливающие.

Из олигосахаридов в природе наиболее широко распространены дисахариды.

1. ОТКРЫТИЕ ЛАКТОЗЫ В МОЛОКЕ

В пробирку наливают 0,5 мл молока, добавляют 5 капель 10% раствора NaOH и по каплям 2% раствор CuSO₄ до образования легкой не исчезающей мути. Пробирку нагревают, появляется желтое окрашивание, а затем образуется красно-коричневый осадок.

2. ВОССТАНАВЛИВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ЛАКТОЗЫ

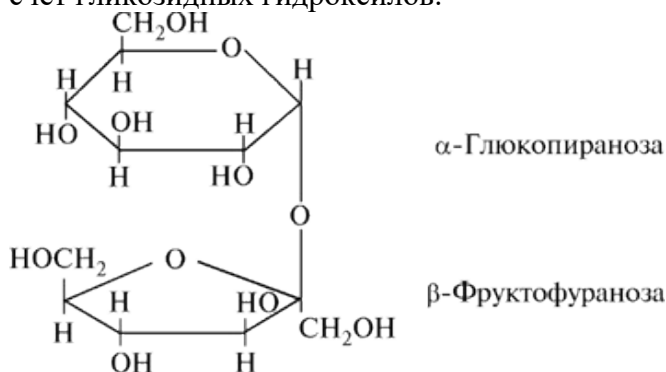
У восстанавливающих дисахаридов связь между мономерами осуществляется за счет спиртового и полуацетального гидроксильных. Таким образом, одно из моносахаридных звеньев сохраняет свободный полуацетальный гидроксил, который определяет восстанавливающие свойства и все реакции, свойственные моносахаридам.

Ход работы

В пробирку вносят 0,5 мл 1 % раствора лактозы и 6-8 капель 2 н раствора NaOH. Затем по каплям добавляют 0,2 н раствора CuSO₄ до полного растворения. Осторожно нагревают, голубой осадок гидрата окиси меди переходит в желто-оранжевый.

3. ОТСУТСТВИЕ ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ САХАРОЗЫ

Сахароза состоит из D-глюкопиранозы и D-фруктофуранозы, соединенных 1-2 связью за счет гликозидных гидроксильных.



У невосстанавливающих дисахаридов гликозидная связь образована за счет полуацетальных гидроксильных обоих моносахаридов. Они не содержат свободного полуацетального гидроксильного и не проявляют характерных реакций альдегидной группы.

Ход работы

В пробирку вносят 0,5 мл 0,5% раствора сахарозы и 6 капель 2 н раствора NaOH. Затем по каплям добавляют 0,2 н раствора CuSO₄, пока не прекратится его растворение. Осторожно нагревают пробирку на спиртовке. Что происходит?

4. РЕАКЦИЯ С ТИМОЛОМ

Является одной из наиболее чувствительных общих реакций на углеводы и углеводные компоненты в сложных соединениях. Углеводы при взаимодействии с концентрированной серной кислотой разлагаются с образованием фурфурола и 5-оксиметилфурфурола, которые конденсируются с тимолом, образуя хромоген, который окисляется в серной кислоте, дает окрашенное хиноидное соединение.

Ход работы

Несколько кристалликов сахара нагревают с 10 мл конц. HCl и добавляют 5% спиртовой раствор тимола. Появляется красная окраска.

5. РЕАКЦИЯ БАРФЕДА

Реакция Барфедда позволяет отличить моносахариды от дисахаридов мальтозного типа, обладающих восстанавливающими свойствами (лактозы, мальтозы, целлобиозы). Она основана на том, что восстанавливающие свойства моносахаридов сохраняются также в кислой среде, тогда как дисахариды восстанавливают металлы только при щелочной реакции. При взаимодействии дисахаридов с реактивом Барфедда красный осадок закиси меди появляется не сразу, а лишь спустя некоторое время (15-20 мин), когда произойдет их гидролитический распад, который катализируется кислотами.

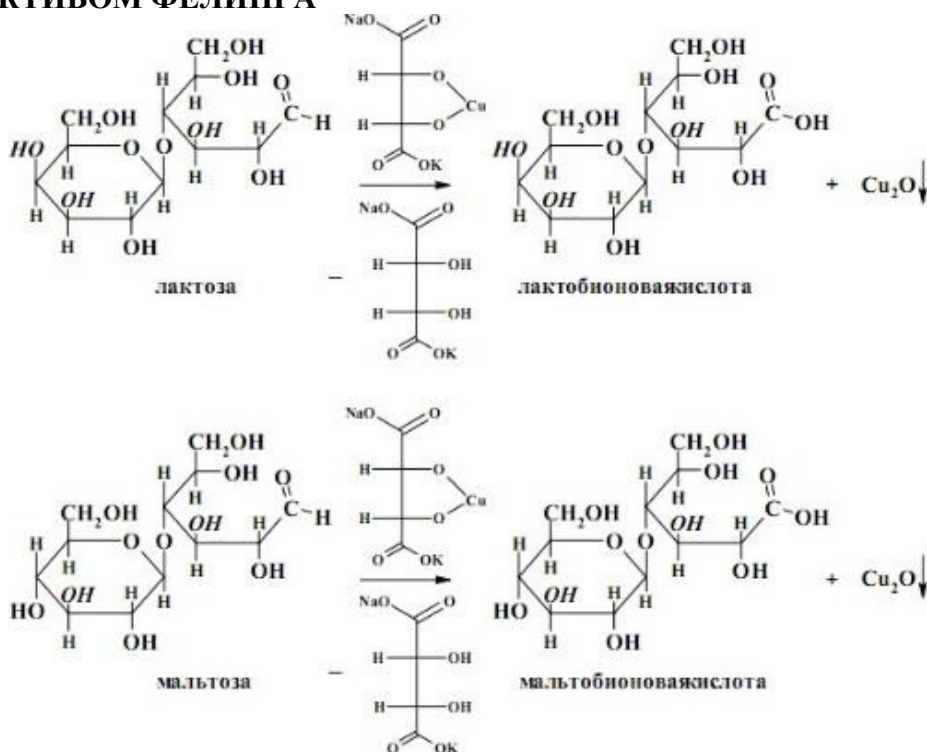
Ход работы

Реактив Барфедда готовят из 6% раствора $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Cu}$ в 1% CH_3COOH . Десять объемов раствора исследуемого сахара нагревают с одним объемом реактива. Моносахариды восстанавливают реактив до Cu_2O ; дисахариды – нет.

6. РЕАКЦИЯ САХАРОЗЫ С СОЛЯМИ

В 2 пробирки наливают по 2 мл 10% раствора сахарозы и по 1 мл 5% раствора гидроксида натрия. Затем в первую пробирку добавляют несколько капель 5% CoSO_4 , а в другую – 5% NiSO_4 . В пробирке с солью кобальта появляется фиолетовое окрашивание, а в пробирке с солью никеля – зеленое.

7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЬДЕГИДНОЙ ГРУППЫ В ДИСАХАРИДАХ РЕАКТИВОМ ФЕЛИНГА



Ход работы

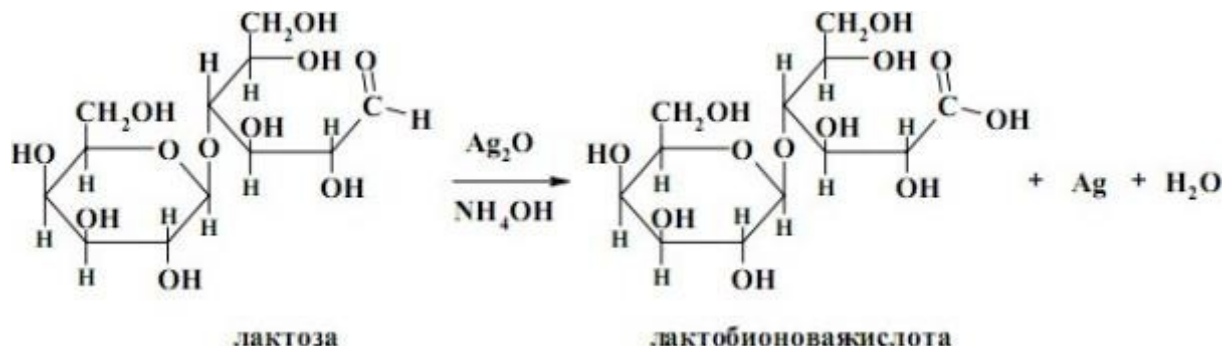
В три пробирки налить по 5 капель реактива Фелинга. В первую добавить 4 капли раствора лактозы, во вторую – 4 капли раствора мальтозы, в третью – 4 капли раствора сахарозы. Содержимое пробирок тщательно перемешать и поместить их в кипящую

водяную баню на 5 мин. После завершения реакции выдержать пробирки в штативе при комнатной температуре в течение 5-10 мин, не встряхивая.

Какие изменения произошли в пробирках? В каких пробирках изменилась окраска?

Наблюдается ли выпадение осадка? Какой цвет имеет осадок?

8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИСАХАРИДОВ АММИАЧНЫМ РАСТВОРОМ ОКСИДА СЕРЕБРА



Ход работы

В три пробирки налить по 5 капель аммиачного раствора оксида серебра. Затем в первую пробирку добавить 3 капли раствора лактозы, во вторую – 3 капли раствора сахарозы, а в третью – 3 капли раствора крахмала.

Содержимое пробирок тщательно перемешать и нагреть на водяной бане в течение 5 мин. Какие видимые изменения произошли в пробирках? Что образовалось на стеклянной поверхности одной из пробирок? Какой именно?

9. ИЗМЕНЕНИЕ САХАРА ПРИ НАГРЕВАНИИ

Нагревают в пробирке или фарфоровой чашке сахар до плавления (160°C). Выливают часть расплава на бумагу. По мере остывания образуется леденец.

При более сильном нагревании (до 200°C и выше) сахар окрашивается в желтый цвет, при этом образуется карамель. Если сахар нагревают далее, он еще более темнеет и обугливается, выделяя белый дым (сухая перегонка). Выделяющиеся газообразные продукты можно поджечь.

10. ГИДРОЛИЗ САХАРОЗЫ



Ход работы

Поместить в пробирку 9 капель раствора сахарозы и 5 капель 2 н раствора H₂SO₄, тщательно перемешать и выдержать на водяной бане в течение 5-7 мин. Охладить раствор и разделить его на две пробирки.

В первую пробирку добавить при постоянном перемешивании по каплям 2 н раствор NaOH до щелочной реакции по универсальному индикатору, а затем 5 капель реактива Фелинга. Если раствор сразу обесцветился, то прибавить еще несколько капель NaOH

(среда должна быть щелочной), и снова 5 капель реактива Фелинга. Реакционную смесь выдержать на кипящей водяной бане до изменения окраски.

Во вторую пробирку внести 5 капель реактива Селиванов и выдержать на водяной бане до изменения окраски. Как изменилась окраска реактивов Фелинга и Селиванова в каждой из пробирок?

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. **Олигосахариды**, общая характеристика, классификация. Номенклатура
2. Физические и химические свойства олигосахаридов. Напишите уравнения
3. Характеристика представителей олигосахаридов. Мальтоза. Сахароза. Лактоза. Целлобиоза. Напишите формулы.
4. Три- и тетрасахариды. Мелицитоза. Генцианоза. Стахиоза. Напишите формулы
5. Лактулоза. Трегалоза. Изомальтулоза. Характеристика. Напишите формулы.
6. Восстанавливающие и невосстанавливающие дисахариды. Напишите примеры формул.
7. Гидролиз олигосахаридов? Напишите уравнение реакции гидролиза сахарозы, мальтозы, лактозы.
8. Приведите примеры восстанавливающих и невосстанавливающих дисахаридов. Напишите формулы
9. Что такое редуцирующие сахара? Приведите примеры. Напишите формулы редуцирующих сахаров.
10. Опишите способы определения редуцирующих сахаров.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 17. ЛИПИДЫ. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить биологические функции липидов, освоить методы их идентификации.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Липидами называют соединения, разнообразные по химической структуре, которым присущи три особенности – они присутствуют в живых тканях, растворимы в органических растворителях и нерастворимы в воде (возможны исключения, например, лизолецитин).

Липиды входят в состав клеточных мембран, выполняя структурную функцию и обуславливая определенную степень проницаемости этих образований для различных веществ. Важна роль липидов как теплорегулятора и амортизатора. К липоидам относятся фосфолипиды, гликолипиды, сульфоллипиды, стерины и стериды.

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАССОВОЙ ДОЛИ СВОБОДНО ИЗВЛЕКАЕМОГО ЖИРА

Метод основан на растворении липидов в бинарной смеси органических растворителей, их отделении и гравиметрическом определении массовой доли извлекаемого жира.

Ход работы

Навеску образца массой около 2 г помещают в делительную воронку, приливают 20 мл экстрагирующей смеси, состоящей из хлороформа и этилового спирта (2:1), и проводят экстракцию, встряхивая воронку в течение 2 мин.

Полученный экстракт отгоняют с обратным холодильником. Экстракцию проводят еще два раза. Все экстракты собирают в мерной колбе, доводят до 20 мл добавлением экстрагирующей смеси. Смесь тщательно перемешивают. Затем отбирают пипеткой 10 мл и переносят в предварительно взвешенную колбу. Для удаления растворителей колбу нагревают на кипящей водяной бане до исчезновения запаха растворителей.

Колбу с жиром сушат в течение 10 мин при температуре 70 С, охлаждают в эксикаторе над CaCl₂ и взвешивают на весах.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕЛИПИДНЫХ ПРИМЕСЕЙ

В колбу с подсушенной навеской жира приливают 5 мл хлороформа и через 5 мин сливают. Такое отделение липидов растворением повторяют еще два раза. После этого колбу помещают в сушильный шкаф и подсушивают в течение 5 мин при температуре 100°С, охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Массовую долю жира (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(g_1 - g_2) \cdot a}{b \cdot g} \cdot 100,$$

где: g₁ – масса бюкса с жиром, г; g₂ – масса бюкса с нелипидной фракцией, г; a – общий объем экстракта, мл; g – масса навески, г; b – объем экстракта, взятый для высушивания, мл.

3. ЖИРОВЫЕ ЭМУЛЬСИИ

3.1. ОЦЕНКА ЭМУЛЬГИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ЭМУЛЬГАТОРА

Метод основан на измерении объема слоя, образованного в результате диспергирования липидной эмульсии по отношению к общему объему дисперсионной среды.

Метод предназначен для оценки эмульгирующей способности растворов белков и других ПАВ по отношению к жидким жирам (или расплавам жиров).

Ход работы

К 10 мл исследуемого водного раствора эмульгатора, например 7% раствора белка, добавляют 10 мл рафинированного подсолнечного масла, эмульгируют смесь на диспергаторе со скоростью 8000 об/мин в течение 2-3 мин.

Жиро-эмульгирующую способность (ЭМ, %) оценивают по формуле:

$$\text{ЭМ} = V_1/V_2 \cdot 100,$$

где V₁ – объем эмульгированного слоя, мл; V₂ – общий объем, мл.

3.2. ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ЖИРОВОЙ ЭМУЛЬСИИ

Метод основан на измерении объема слоя образованного в результате нагревающего разрушения липидной эмульсии по отношению к общему объему дисперсионной среды.

Ход работы

К 10 мл водного раствора эмульгатора добавляют 10 мл рафинированного подсолнечного масла, эмульгируют смесь на диспергаторе или миксере со скоростью 8000 об/мин в течение 2-3 мин. Полученную эмульсию нагревают в течение 0,5 ч при температуре 80°С, затем смесь охлаждают холодной водой в течение 10 мин.

После этого эмульсию центрифугируют в течение 2-3 мин со скоростью 2000 об/мин.

Стабильность эмульсии (СЭ, %) оценивают по формуле:

$$\text{СЭ} = V_1/V_2 \cdot 100$$

где V₁ – объем эмульгированного слоя, мл; V₂ – общий объем, мл

4. РАСТВОРЕНИЕ И ЭМУЛЬГИРОВАНИЕ ЖИРОВ

Жиры растворяются в органических растворителях и не растворяются в воде. Эмульгирование жиров используется в технике и быту для удаления жира. В организме человека только эмульгированные жиры подвергаются действию ферментов.

Ход работы

В 5 пробирок вносят по 3 капли растительного масла и затем добавляют по 10 капель: в первую пробирку – бензина, во вторую – бензола, в третью – хлороформа, в четвертую – диэтилового эфира, в пятую – этилового спирта. Пробирки встряхивают и наблюдают растворение жира во всех пробирках, кроме последней.

Результаты опыта внести в таблицу.

Таблица - Исследование растворимости липидов

Растворитель

№	Бензин	Бензол	Хлороформ	Диэтиловый эфир	Этиловый спирт

5. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ЭМУЛЬГАТОРОВ

Эмульгирование жиров необходимо для ускорения переваривания жиров пищи в полости кишечника ферментом липазой, так как оно вызывает увеличение поверхности соприкосновения жира с водным раствором липазы. Эмульгаторами являются ПАВ – белки, соли желчных кислот, мыла. Наибольшей эмульгирующей активностью обладают щелочно-реагирующие соли желчных кислот, которые вместе с желчью изливаются в двенадцатиперстную кишку через желчный проток. Они адсорбируются на поверхности жировых капель, образуя тончайший слой, причем гидрофильные группы желчных кислот обращены в сторону водной фазы, а гидрофобные радикалы направлены к жиру. При этом происходит уменьшение поверхностного натяжения на разделе двух фаз (вода/жир), что приводит к распаду капелек жира на более мелкие.

Ход работы

В 6 пробирок вносят по 2 капли растительного масла и 3 капли дистиллированной воды. Затем добавляют по 4 капли: в первую пробирку – раствора белка, во вторую – 10% раствор КОН, в третью – 10% раствор Na_2CO_3 , в четвертую – мыльного раствора, в пятую – желчи, шестая пробирка служит для контроля.

Пробирки встряхивают. Укажите, в присутствии каких эмульгаторов получалась наиболее стойкая эмульсия.

Результаты внести в таблицу.

Таблица Исследование действия эмульгатора

№	Устойчивость эмульсии при добавлении эмульгатора					
	Белок	Гидроокись калия	Бикарбонат натрия	Мыльный раствор	Желчь	Дистиллированная вода

6. ПЛАВЛЕНИЕ И ЗАТВЕРДЕВАНИЕ ЖИРОВ

Жиры представляют собой смесь различных веществ, преимущественно эфиров глицерина. Поэтому они, как и нефть, не имеют постоянной температуры кипения и плавления. Температурой плавления жира считается та конечная температура, при которой плавящийся жир превращается в прозрачную жидкость. Температурой застывания считается та максимальная температура, при которой происходит затвердевание жира.

Ход работы

В пробирку помещают 2-5 г жира и закрывают пробкой с двумя отверстиями. Через одно отверстие проходит термометр, помещенный в жир. Другое отверстие служит для выхода воздуха. Нагревают пробирку с жиром в стакане с водой. Наблюдают начало плавления жира, но в качестве температуры плавления отмечают ту температуру, при которой жир становится прозрачным. Для определения температуры затвердевания в пробирку наливают растительное масло и охлаждают снегом или смесью снега с солью (в зависимости от сорта масла).

Чтобы охлаждение его было более равномерным, масло необходимо постоянно помешивать. Когда масло начнет затвердевать, понижение столбика ртути вначале прекращается, затем уровень ртути немного повышается, после чего снова начинает падать. Максимальную температуру отмечают как температуру застывания масла.

Сравните температуры плавления и затвердевания нескольких видов твердых липидов.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Липиды - определение, общая характеристика. Структура липидов.
2. Применение липидов в различных отраслях.

3. Классификация липидов
4. Номенклатура липидов
5. История открытия липидов. Роль отечественных ученых
6. Физические свойства липидов.
7. Химические свойства липидов. Напишите уравнения реакций
8. Функции липидов.
9. Ассоциаты липидов
10. Выделение и получение липидов. Примеры реакций

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №18. ВЫДЕЛЕНИЕ ЛИПИДОВ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЛИПИДЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Научиться выделять и идентифицировать липиды.

ПРОВЕРКА ИСХОДНОГО УРОВНЯ ЗНАНИЙ СТУДЕНТОВ - метод фронтального опроса, тестовый контроль.

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

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

1.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА В ЖЕЛТКЕ КУРИНОГО ЯЙЦА

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. ОТКРЫТИЕ ЛЕЦИТИНА ХЛОРИДОМ КАДМИЯ

К 2-3 мл спиртового раствора лецитина, полученного в предыдущем опыте, добавляют 1 мл насыщенного спиртового раствора CdCl_2 . Выпадает белый хлопьевидный осадок комплексного соединения.

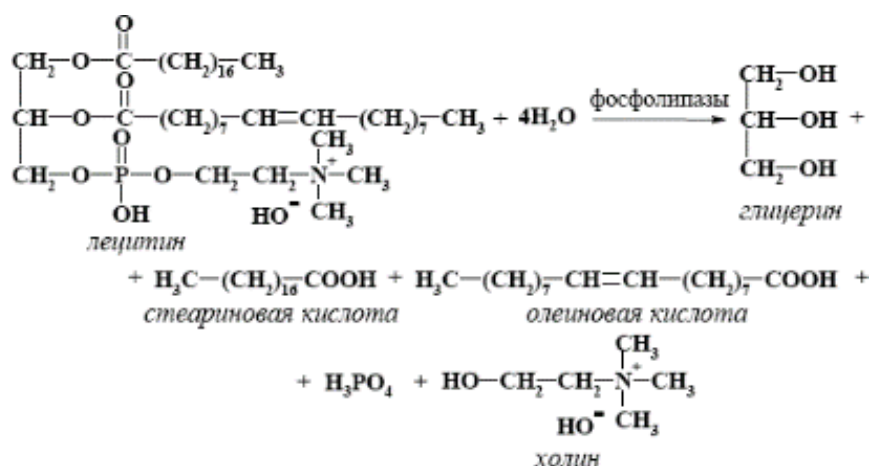
1.3. ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПОСОМ ИЗ ЯИЧНОГО ЖЕЛТКА

Метод основан на экстракции горячим этанолом фосфатидилхолина из яичного желтка с последующим осаждением ацетоном и на способности фосфолипидов образовывать на поверхности раздела двух фаз (вода – липиды) тонкий слой сферической формы.

Ход работы

Поместить в пробирку 1,0 г яичного желтка, добавить 5,0 мл горячего спирта (для этого спирт предварительно помещают в водяную баню с температурой 75-78° С), перемешивать содержимое пробирки 8-10 минут. По окончании извлечения жидкость фильтруют через бумажный фильтр. С фильтратом проводят реакцию на фосфатидилхолин с ацетоном, для чего к 10 каплям ацетона прибавляют по каплям фильтрат. Постепенно жидкость мутнеет вследствие осаждения нерастворимого в ацетоне фосфатидилхолина. К 3-4 мл полученного ранее спиртового раствора фосфатидилхолина добавляют равный объем фосфатного буфера с pH 6,8 и интенсивно диспергируют (встряхивают) в течение не менее 10 минут. Каплю полученной жидкости – взвеси липосом – наносят на предметное стекло и микроскопируют при малом увеличении. Наблюдают липосомы в виде везикул.

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% раствора NaOH и кипятят 5-10 мин. При нагревании ощущается запах селедочного рассола, характерный для триметиламина, образующегося из холина.

2.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

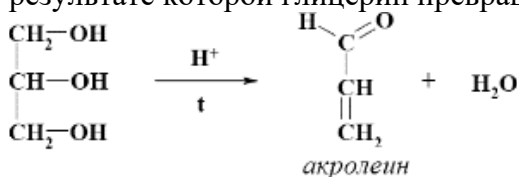
Полученный гидролизат разбавляют небольшим количеством воды и подкисляют 10% раствором HCl. Выпадает осадок свободных жирных кислот, который отфильтровывают, фильтрат нейтрализуют 10% раствором щелочи и упаривают на водяной бане досуха.

2.3. ОБНАРУЖЕНИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

Другую часть сухого остатка сплавляют в тигле с небольшим количеством KNO₃ и Na₂CO₃. К охлажденному сплаву приливают 2 мл конц. HNO₃ и растирают палочкой, раствор сливают в пробирку и нагревают с небольшим избытком молибденовокислого аммония (5-6 мл). При охлаждении образуется желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

3. ОТКРЫТИЕ ГЛИЦЕРИНСОДЕРЖАЩИХ ЛИПИДОВ. АКРОЛЕИНОВАЯ ПРОБА

Образование акролеина определяют по характерному запаху 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 KHSO₄. В первую пробирку добавить 5 капель растительного масла, во вторую – 5 капель глицерина. Обе пробирки нагреть. Обнаружить акролеин можно при внесении в пары фильтровальной бумаги, смоченной аммиачным раствором серебра. Бумага при этом темнеет.

4. ОТКРЫТИЕ СТЕРОЛОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАСЛЕ

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 сернокислотный (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.

5. ОТКРЫТИЕ ХОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ

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, 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 pH=8, 2мл хлороформа и перемешивают переворачиванием пробирки, не допуская образования пены, на протяжении 30 с. Оставляют пробирку на несколько минут для расслаивания. В присутствии холинсодержащих фосфолипидов хлороформный слой окрашивается в желтый цвет.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Омыляемые (ацильные) нейтральные липиды. Ацилглицеролы. Общая характеристика. Примеры формул
2. Воски. Общая характеристика. Номенклатура и классификация. Примеры формул
3. Фосфолипиды. Общая характеристика. Номенклатура и классификация.
4. Фосфатидилсерин. Функции. Напишите формулу
5. Фосфатидилинозитолы. Напишите формулу
6. Кардиолипин. Напишите формулу
7. Лицетин. Функции. Напишите формулу
8. Кефалин. Функции. Напишите формулу
9. Цеберрозиды. Функции. Напишите формулу
10. Алкоксиллипиды и плазмогены. Функции. Напишите формулу

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 «Биохимия»

05.03.06 Экология и природопользование

Направленность (профиль)

Экология и экологическая безопасность

Ставрополь, 2026

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.

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 «Биохимия»

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 «Биохимия»

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>