

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 и молекулярная биология»

для студентов направления подготовки

44.03.05 Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки «География и
биология»)

Ставрополь 2026

Введение

«Биохимия и молекулярная биология» 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.

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

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

Задачей курса 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 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 призван формировать на лабораторных занятиях студентам интерес к биохимии, умение работать в коллективе и лаборатории, чувство ответственности и долга.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. АМИНОКИСЛОТЫ. ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Для аминокислот и белков характерны определенные цветные реакции. Часть этих реакций обусловлена присутствием тех или иных атомных группировок, общих для молекул различных белков, и поэтому такие реакции являются общими цветными реакциями на белки.

Другие реакции связаны с наличием в молекуле белка остатка, какой либо аминокислоты и, следовательно, характерны для белков, в молекулу которых входит данная аминокислота. Эти реакции ценны тем, что с их помощью легко составить общее представление о качественном аминокислотном составе исследуемого белка. Некоторые из цветных реакций на отдельные аминокислоты применены только к свободным аминокислотам, т.е. лишь в растворах, получающихся после гидролиза белков.

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

1.1.1. ОБНАРУЖЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Ход работы

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

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

Результаты всех реакций вносят в табл. 1.

Таблица 1. Биуретовая реакция на белки и аминокислоты

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

1.1.2. ОБНАРУЖЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ В МОЛЕКУЛЕ ГРАМИЦИДИНА

Ход работы

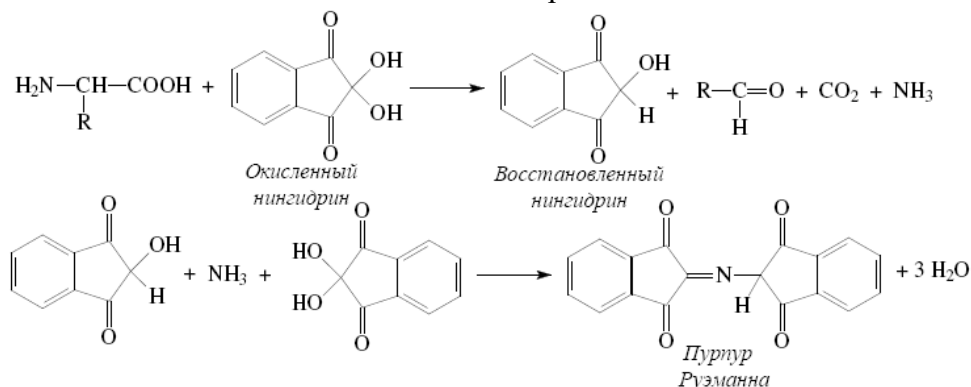
Содержимое одной таблетки с грамицидином растирают и вносят в пробирку, прибавляют тройной объем 30%-ного раствора гидроксида натрия и хорошо

перемешивают. Затем из капельницы добавляют несколько капель 1%-ного раствора сульфата меди и снова хорошо перемешивают. Развивается интенсивное сине-фиолетовое окрашивание, свидетельствующее о наличии пептидных связей в молекуле грамицидина.

1.2. НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (РЕАКЦИЯ РУЭМАННА)

При нагревании растворов белков и полипептидов с нингидрином образуется синее окрашивание. Эта реакция обусловлена присутствием α -аминокислот со свободной α -аминогруппой, которые реагируют с нингидрином, причем образуются альдегид, аммиак, CO_2 и восстановленный нингидрин. Восстановленная форма нингидрина реагирует с избытком нингидрина и с аммиаком. При этом образуется продукт конденсации сине-фиолетового цвета.

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



Ход работы

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

1.3. КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (МУЛЬДЕРА)

(на тирозин, триптофан, фенилаланин)

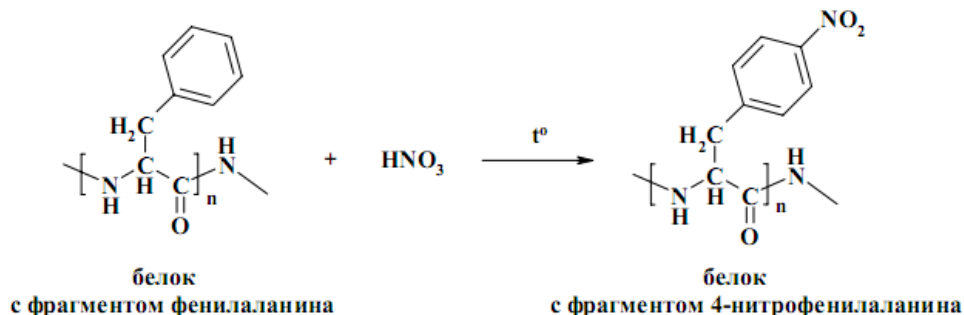
Если смешать раствор белка с концентрированной азотной кислотой, то выпадает осадок белка, который при нагревании смеси частью растворяется с образованием желто окрашенного раствора (греческое «Ксантос» — желтый). При этом происходит образование нитросоединений триптофана и тирозина. Если далее к полученному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



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

Ксантопротеиновую реакцию (желтое окрашивание) можно наблюдать на коже,

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

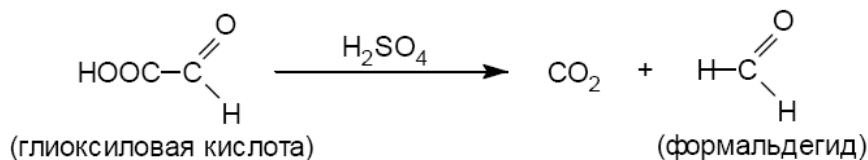


Ход работы

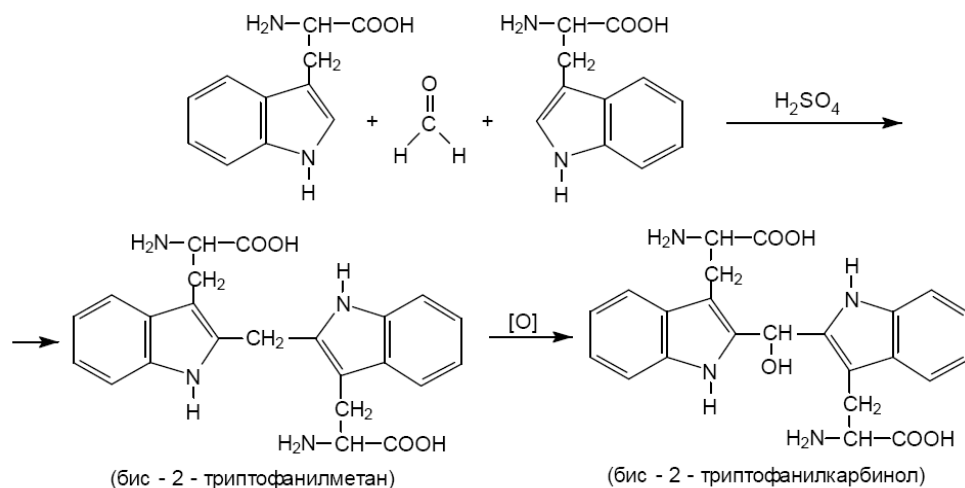
К 1 мл раствора белка добавляют 0,2-0,3 мл концентрированной азотной кислоты, появляется белый осадок или раствор мутнеет. Затем нагревают смесь на горелке до кипения и поддерживают его в течение 1-2 мин. При этом раствор и осадок окрашиваются в ярко-желтый цвет. При кипячении выделившийся осадок может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

1.4. РЕАКЦИЯ АДАМКЕВИЧА

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



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



Ход работы

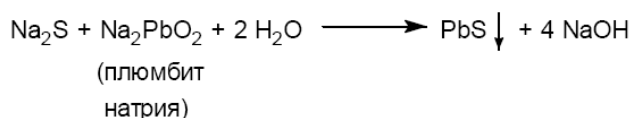
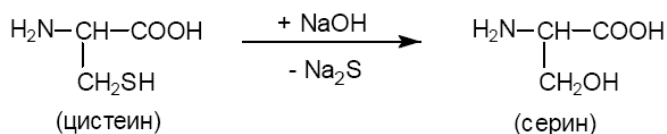
В пробирку наливают несколько капель белка, прибавляют около 1 мл уксусной

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

1.5. РЕАКЦИЯ НА ЦИСТЕИН (РЕАКЦИЯ ФОЛЯ)

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

Эти аминокислоты под влиянием щелочи при нагревании разрушаются с образованием сероводорода. Последний в щелочной среде дает сернистый натрий, который, реагируя с плюмбитом натрия, образует черный осадок сернистого свинца. Для выявления сульфида натрия используют ацетат свинца, который при взаимодействии с гидроксидом натрия превращается в плюмбит. В результате взаимодействия ионов серы и свинца образуется сульфид свинца черного или бурого цвета. При нагревании со щелочью часть белка подвергается гидролизу. Кроме того происходит отщепление части аминокрупп (реакция дезаминирования) в виде аммиака, который можно обнаружить по запаху и посредством смоченной водой красной лакмусовой бумажки, поднесенной к отверстию пробирки (не касаться стенок!).



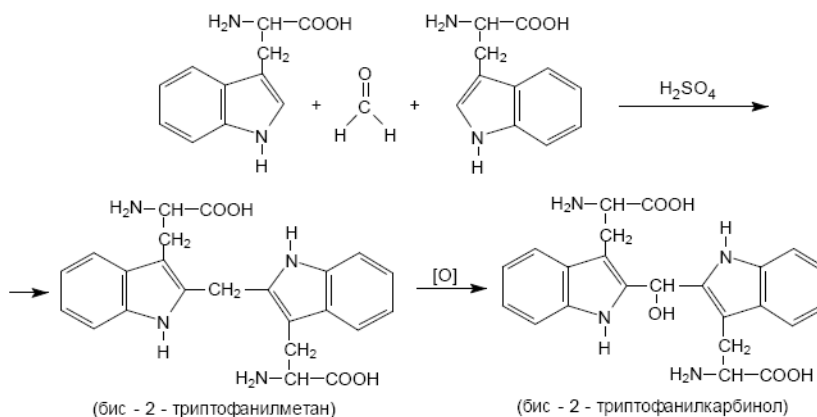
Ход работы

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

1.6. РЕАКЦИЯ ВАУЗЕНЕ (НА ТРИПТОФАН)

Белки, содержащие триптофан, дают в кислой среде в присутствии нитрита натрия и формальдегида сине-фиолетовое окрашивание.

В этой реакции триптофан взаимодействует с формальдегидом с образованием продукта конденсации (бис-2-триптофанилметана), который окисляется нитритом натрия до бис-2-триптофанилкарбинола. Последний в присутствии минеральных кислот образует соли сине-фиолетового цвета.

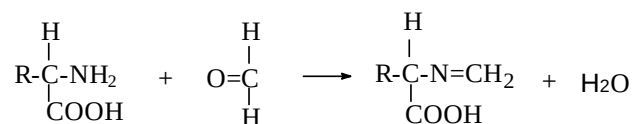


Ход работы

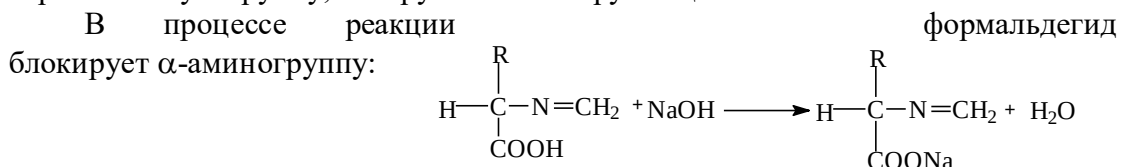
К 1 мл 1% раствора яичного белка добавляют 1 каплю 2,5% раствора формальдегида. К полученной смеси, тщательно перемешивая, добавляют осторожно по каплям 3 мл концентрированной серной кислоты, охлаждая пробирку в ванночке со льдом. Через 10 минут добавляют, перемешивая, 5 капель 0,5% раствора нитрита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

1.7. РЕАКЦИЯ С ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

При взаимодействии α-аминокислот с формальдегидом образуются относительно устойчивые карбиноламины – N-метилольные производные, содержащие свободную



карбоксильную группу, которую затем титруют щелочью:



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

Ход работы

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

1.8. РЕАКЦИЯ ШУЛЬЦЕ-РАСПАЙЛЯ

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

Образование оксиметилфурфуrolа из фруктозы в присутствии концентрированной серной кислоты происходит в результате следующей реакции:

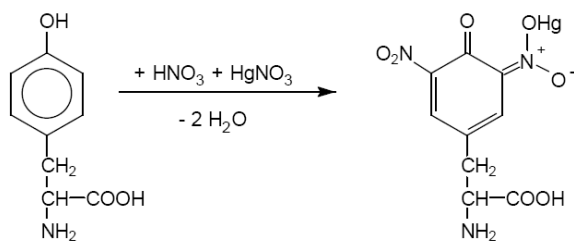
Ход работы

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

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

1.9. РЕАКЦИЯ МИЛЛОНА

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



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

Ход работы

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

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

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

1.10. РЕАКЦИЯ ПАУЛИ (НА ГИСТИДИН И ТИРОЗИН)

Реакция Паули позволяет обнаружить в белке аминокислоты гистидин и тирозин, которые образуют с диазобензолсульфоновой кислотой комплексные соединения вишнево-красного цвета.

Диазобензолсульфоновая кислота образуется в реакции диазотирования при взаимодействии сульфаниловой кислоты с нитритом натрия (или калия) в кислой среде.

Ход работы

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

1.11. РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ С АЗОТИСТОЙ КИСЛОТОЙ (ПРОБА ГЕЛЛЕРА)

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

Ход работы

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

1.12. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМИНОКИСЛОТ С СОЛЯМИ МЕДИ (II)

Ход работы

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

1.13. ДИАЗОРЕКЦИЯ

Белки дают оранжево-красное окрашивание с диазореактивом (сульфаниловая

кислота, растворенная в концентрированной хлоридной кислоты). Окрашивание зависит от образования азосоединений с остатками аминокислот - тирозина, триптофана, гистидина, которые входят в состав белковой молекулы.

Ход работы

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

1.14. РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

Одна из классификаций аминокислот основана на природе заряда аминокислоты. Если радикал нейтральный (такие аминокислоты содержат только одну амино- и одну карбоксильную группы), то они называются нейтральными аминокислотами. Если аминокислота содержит избыток амино- или карбоксильных групп, то она называется соответственно основной или кислой аминокислотой. В связи с этим выделяют моноаминомонокарбоновые аминокислоты, моноаминодикарбоновые и диаминомонокарбоновые.

Ход работы

В пробирки поместить по 5 капель растворов: в 1-ю пробирку – аланина или глицина, во 2-ю - глутаминовой или аспарагиновой кислоты, в 3-ю пробирку – аргинина или лизина. Во всех пробирках универсальным индикатором измерить уровень pH. Сделайте заключение о реакции среды. Напишите уравнения реакций, описывая поведение аминокислот в водных растворах.

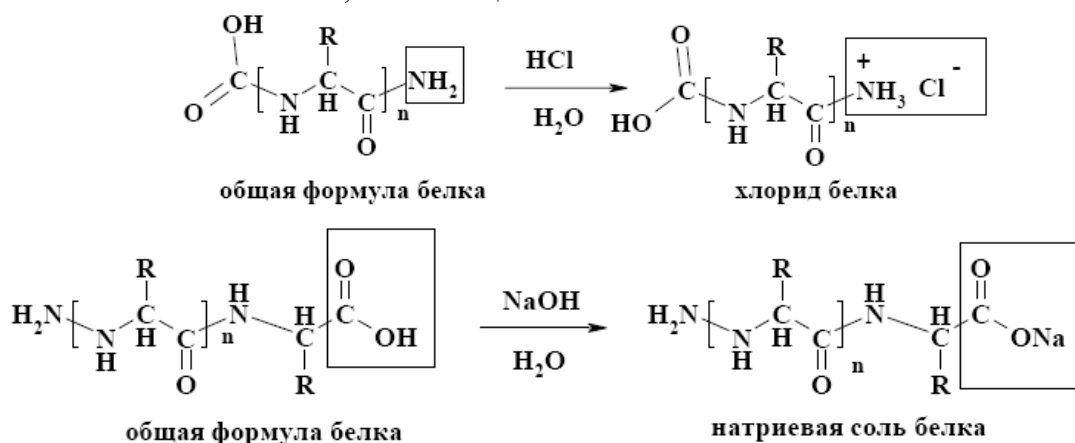
Результаты опыта занести в таблицу 2.

Таблица 2. Реакции аминокислот в водных растворах

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

1.15. АМФОТЕРНОСТЬ АМИНОКИСЛОТ

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



Ход работы

Проделайте опыт по схеме приведенной в таблице 3, отметьте результаты.

Таблица 3. Амфотерность аминокислот

№	Исследуемая жидкость	Индикатор	Раствор для титрования	Количество капель
1	1 мл глицина	фенолфталеин	0,1 н NaOH	
2	1 мл воды	фенолфталеин	0,1 н NaOH	

3	1 мл глицина	конго-рот	0,1 н HCl	
4	1 мл воды	конго-рот	0,1 н HCl	

Объясните, почему идет различное количество капель гидроксида натрия и соляной кислоты для получения одинакового pH в воде и глицине?

Напишите уравнения реакций взаимодействия глицина и данными кислотой и щелочью.

1.16. РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ С ИНДИКАТОРАМИ

Ход работы

В три пробирки наливают по 1 мл 2% раствора глицина и добавляют по 2-3 капли растворов индикаторов: в 1-ю – метилового красного, во 2-ю – метилового оранжевого, в 3-ю – лакмуса. Что происходит с окраской индикаторов? Сделайте выводы.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

№	Название	Реактивы и условия	Окраска	Аминокислоты

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Общая характеристика пептидов, полипептидов, белков и их строения.
2. Перечислите цветные реакции на белки и аминокислоты.
3. Какая реакция открывает пептидные связи? Её химизм.
4. Что характеризуют цвет и интенсивность окраски при положительной биуретовой реакции?
5. Что открывает нингидриновая реакция? Её химизм.
6. Назовите аминокислоты имеющие в радикале бензольное кольцо. Какой реакцией можно обнаружить ароматические аминокислоты? Её химизм.
7. Назовите аминокислоты содержащие серу. Какую из них обнаруживает реакция Фоля? Химизм реакции.
8. Какую цветную реакцию используют для количественного определения белков в растворе и почему?
9. Какую цветную реакцию используют для количественного определения α -аминокислот и почему?
10. Классификация аминокислот (примеры).
11. Амфотерность и реакционная способность белков.
12. Химические свойства аминокислот.
13. Физические свойства белков и аминокислот.
14. Методы количественного определения аминокислот.
15. От чего зависит заряд белка в водном растворе. Почему он не одинаков у различных белков?
16. Структура белковой молекулы. Типы связей, обеспечивающих поддержание структур белковой молекулы.
17. Особенности строения вторичной структуры белка. Домены.
18. Между какими атомами образуется водородная связь в молекулах белков?
19. Назовите связи, стабилизирующие третичную и четвертичную структуры.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ БЕЛКОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить свойства простых белков. Ознакомиться с реакциями осаждения белков.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

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

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

2.1. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА ПРИ НАГРЕВАНИИ

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

Ход работы

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

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

В третью пробирку добавляют 2-3 капли 10% раствора уксусной кислоты, и содержимое нагревают. Осадка белка не образуется даже при кипячении, т.к. в кислой среде частицы белка перезаряжаются, приобретая положительный заряд.

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

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

Результаты опыта внести в таблицу 5.

Таблица 5. Осаждение белка при нагревании

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

2.2. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА КОНЦЕНТРИРОВАННЫМИ МИНЕРАЛЬНЫМИ КИСЛОТАМИ

Осаждение белка концентрированными минеральными кислотами объясняется как явлениями дегидратации белковых частиц и нейтрализации их зарядов, так и рядом

других причин (денатурацией, образованием солей).

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

Ход работы

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

2.3. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА ОРГАНИЧЕСКИМИ КИСЛОТАМИ

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

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

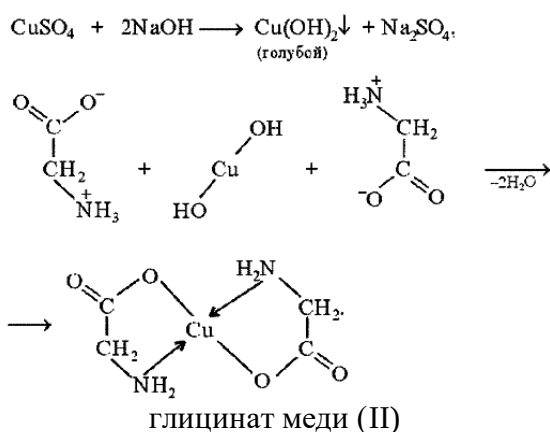
Ход работы

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

2.4. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

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

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



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

Ход работы

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

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

2.5. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

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

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

Ход работы

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

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

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

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

2.6. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА РЕАКТИВАМИ НА АЛКАЛОИДЫ

Алкалоидные реактивы осаждают как белки, так и азотистые основания растений. Объясняется это наличием в белке азотистых гетероциклических группировок, аналогичных тем, которые находятся в молекулах алкалоидов (пиррольные, индольные, юшдазольные). Осаждение белков алкалоидными реактивами протекает в кислой среде и обусловлено образованием нерастворимых солеобразных соединений с основными азотистыми группами белков. При этом происходит адсорбция аниона осадителя, например $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, на белковой молекуле, являющейся вследствие подкисления катионом. Белки, обладающие основным характером (протамины, гистоны), осаждаются алкалоидными реактивами в нейтральной среде.

Ход работы

1. К 5 каплям раствора белка прибавляют 1 - 2 капли насыщенного раствора танина и 1 - 2 капли 1% раствора уксусной кислоты. Выпадает осадок белка.

2. Добавить к раствору белка, подкисленного уксусной кислотой, 4-5 капель насыщенного раствора пикриновой кислоты. Образуется желтоватый осадок.

3. К подкисленному уксусной кислотой раствору белка добавить по каплям 5% раствор $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Выпадает осадок.

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты проделанной работы оформить в виде таблицы 6.

Таблица 6. Результаты лабораторной работы

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

Спирты			
Алкалоиды			

2.7. ВЫСАЛИВАНИЕ 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.

2.7.1. ВЫСАЛИВАНИЕ БЕЛКОВ СЕРНОКИСЛЫМ АММОНИЕМ

Ход работы

В пробирку наливают 20 капель неразведенного яичного белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сернокислого аммония и перемешивают. Получается полунасыщенный раствор сернокислого аммония, при котором выпадает осадок глобулинов. Через 5 минут осадок отфильтровывают. В фильтрате остается другой белок альбумин. К фильтрату добавляют измельченный порошок сернокислого аммония до полного насыщения. Выпавший осадок отфильтровывается. Фильтрат проверяют на полноту осаждения, проделав биуретовую реакцию. Для этого к фильтрату добавляют несколько капель 10% едкого натра и 1% раствора сернокислой меди. Если прошло неполное высаливание белков, фильтрат приобретает сине-фиолетовое окрашивание, что свидетельствует о наличии белка.

2.7.2. ВЫСАЛИВАНИЕ БЕЛКОВ ХЛОРИСТЫМ НАТРИЕМ И СЕРНОКИСЛЫМ МАГНИЕМ

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

Содержимое пробирок отфильтровывают и прибавляют к фильтрату несколько капель разбавленной уксусной кислоты до слабокислой реакции. Что при этом происходит?

Результаты опыта занести в таблицу.

Таблица Высаливание белков

Белок	Используемая соль	Степень насыщения	Образование осадка
Глобулин			
Альбумин			

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Общая характеристика метода хроматографии и ее роль в биохимии.
2. Назовите основные виды хроматографии.
3. Общая характеристика принципа хроматографии.
4. Назовите разновидности метода хроматографии на бумаге и чем они отличаются.
5. Как рассчитывается коэффициент подвижности (R_f) и что он характеризует?
6. Что такое «идентификация аминокислот» и как её проводят.
7. Способы гомогенизации биологического материала.
8. Методы определения гомогенности белковых препаратов.
9. Методы гидролиза белков.
10. Как осуществляется экстракция белков?
11. Методы фракционирования белков.
12. Методы очистки белков.
13. 1. Назовите основные факторы, обуславливающие стабильность молекул белка в

растворе.

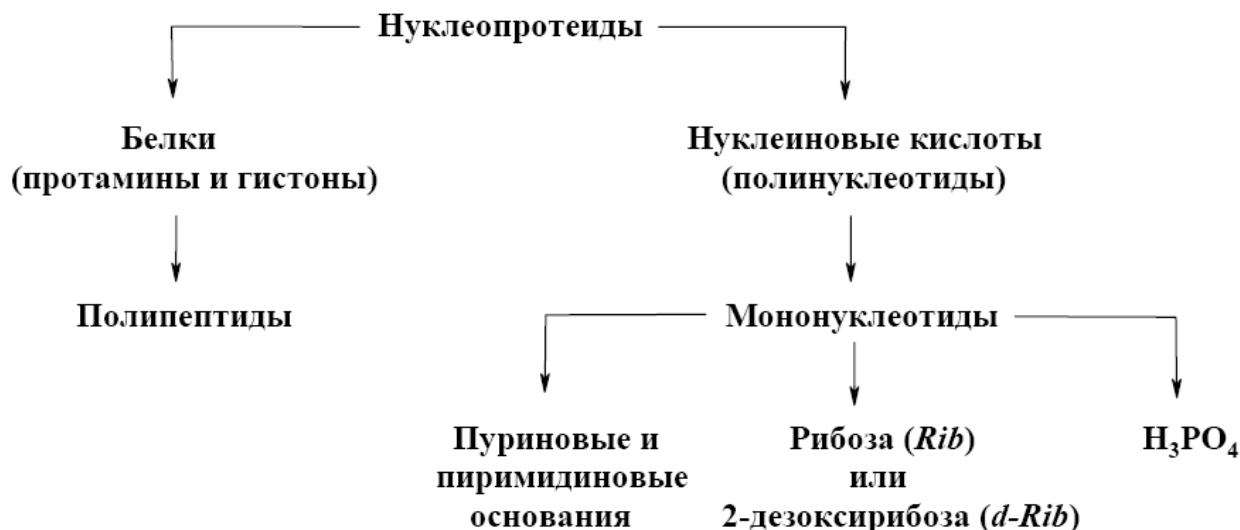
14. Причины осаждения белков нагреванием при pH около 7,0?
15. Характеристика обратимых и необратимых реакций осаждения белков.
16. Почему в растворе при pH<7,0 белки при нагревании не выпадают в осадок?
17. Почему в растворе при pH>7,0 белки при нагревании не выпадают в осадок?
18. Почему в растворе при pH<7,0 с добавлением хлорида натрия белки при нагревании выпадают в осадок?
19. Механизм осаждения белков.
20. Ренатурация белков, всегда ли она возможна?
21. Изoeлектрическое состояние белковой молекулы.
22. Молекулярный вес белков, методы его определения.
23. Физические свойства белков.
24. Элементарный состав белка. Содержание белков в тканях и органах.
25. Какие свойства положены в основу классификации белков.
26. Форма белковых молекул.
27. Функции белков.
28. Использование белков, пептидов и аминокислот в народном хозяйстве.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3. ИССЛЕДОВАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить свойства нуклеиновых кислот. Ознакомиться с методами их выделения.

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.



3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

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

Ход работы

1 г дрожжей помещают в ступку, добавляют 2-3 капли эфира и 2-3 капли воды.

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

3.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ

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

Ход работы

3.2.1. ПОЛИПЕПТИДЫ ОТКРЫВАЮТ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИЕЙ

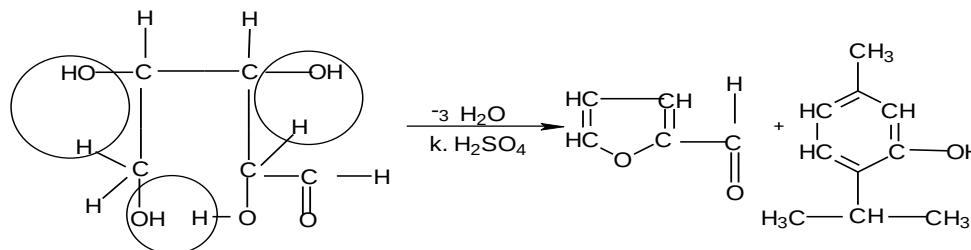
К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 10 капель гидроксид натрия и 2 капли раствора сульфата меди. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

3.2.2. УГЛЕВОДЫ (РИБОЗУ И ДЕЗОКСИРИБОЗУ) ОПРЕДЕЛЯЮТ ФЕЛИНГОВОЙ ПРОБОЙ

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

3.2.3. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ МОЛИША НА ПЕНТОЗУ

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



Ход работы

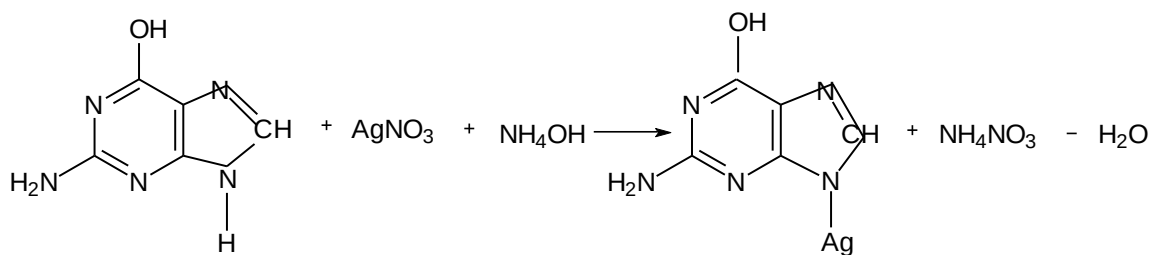
К 10 каплям гидролизата дрожжей прибавляют 3 капли раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно!) - 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки появляется красное окрашивание.

3.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

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



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



3.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ

Для выделения растительного ДНК можно взять зелёный горошек или лук.

Ход работы

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

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

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

Деревянной палочкой выловите их и рассмотрите под микроскопом.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. ВИТАМИНЫ КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ

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

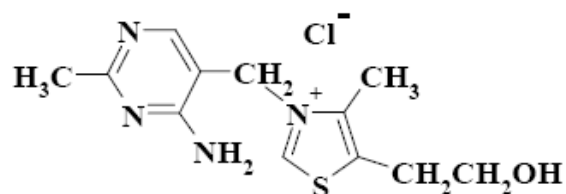
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

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.

4.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИАМИНА (ВИТАМИН В₁)

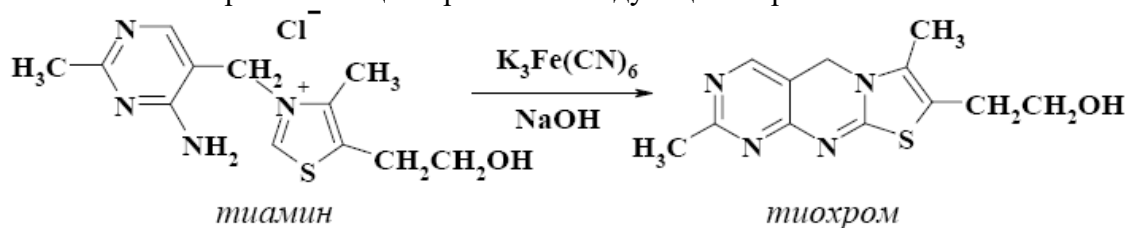
Тиамин (витамин В₁) - водорастворимый витамин. Наряду с аминогруппой витамин В₁ содержит атом серы, и поэтому он получил название тиамин. В химической структуре его содержится два кольца: пиримидиновое и тиазоловое, соединенные метиленовой (-CH₂) группой.



При недостаточности тиамин развивается тяжелое заболевание - бери-бери. Это заболевание представляет собой комбинированный авитаминоз, при котором организм испытывает потребность и в других витаминах - рибофлавине, пиридоксине, витаминах PP, C 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.

4.1.1. РЕАКЦИЯ ОКИСЛЕНИЯ

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



Ход работы

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

4.1.2. ДИАЗОРЕАКЦИЯ

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

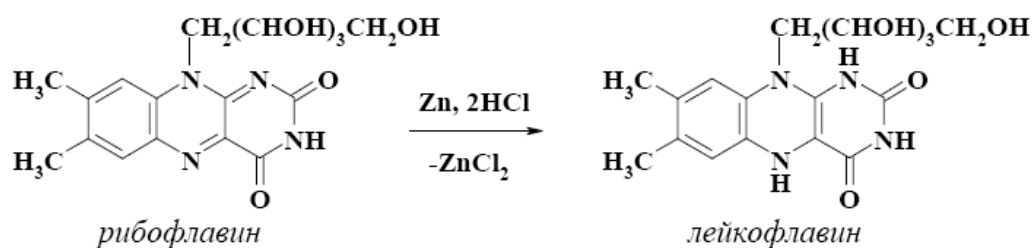
Ход работы

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

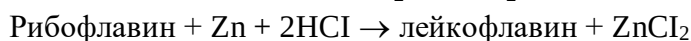
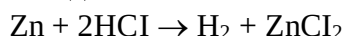
4.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОФЛАВИНА (ВИТАМИН В₂)

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

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



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



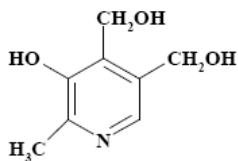
Розовую жидкость сливают в другую пробирку и наблюдают за изменением окраски. Водород в жидкость больше не поступает, а уже растворенный в ней уходит в воздух и переносится через рибофлавин и метиленовый синий на кислород воздуха.

Ход работы

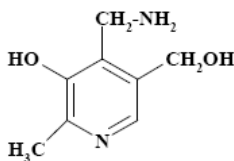
В пробирку вносят 4-6 капель воды, 1 каплю взвеси рибофлавина и по каплям метиленовой сини - до синего или зеленоватого окрашивания раствора. Внести в пробирку кусочек цинка и 2-3 капли концентрированной соляной кислоты (начинается выделение пузырьков водорода). Отметить окраску через 10-15 минут.

4.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРИДОКСИНА (ВИТАМИН В₆)

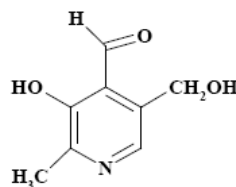
Пиридоксин - витамин В₆. Пиридоксаль (витамин В₆) - альдегидное производное пиридоксина. В виде фосфорного эфира - пиридоксальфосфата - входит в состав ряда ферментов, катализирующих реакции переаминирования и декарбоксилирования α-аминокислот. Термин "витамин В₆" применяется ко всем трем производным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



(пиридоксин)



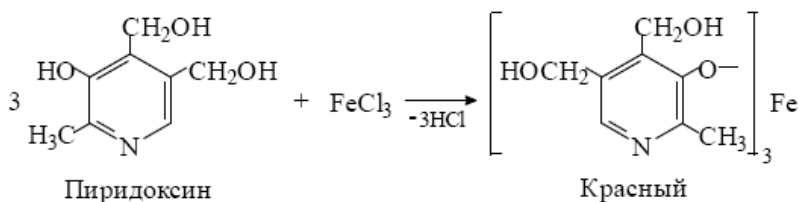
(пиридоксамин)



(пиридоксаль)

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

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

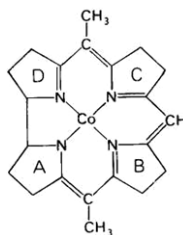


Ход работы

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

4.4. РЕАКЦИЯ НА ЦИАНКОБАЛАМИН (ВИТАМИН В₁₂)

При действии сильного окислителя на витамин В₁₂ происходит его разрушение.



Корриновое ядро кобаламина

Витамин В₁₂ — это единственный витамин, в молекуле которого содержится кобальт (4,5%). Его можно обнаружить после минерализации раствора витамина и последующей обработки тиомочевинной.

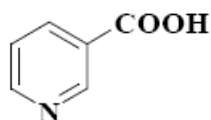
Витамин В₁₂ находится главным образом в продуктах животного происхождения. Наиболее богата им печень рогатого скота и цыплят.

Ход работы

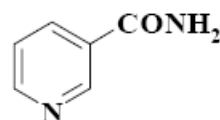
Половину содержимого витамина В₁₂ из ампулы переносят в фарфоровый тигель, выпаривают досуха и прокалывают на небольшом огне. После охлаждения доливают 1 мл концентрированной азотной кислоты и 3 мл концентрированной соляной кислоты и кипятят в вытяжном шкафу до полного испарения жидкости и охлаждают.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

4.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИН РР)

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



никотиновая кислота



никотинамид

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

4.5.1. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ С УКСУСНОКИСЛОЙ МЕДЬЮ

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

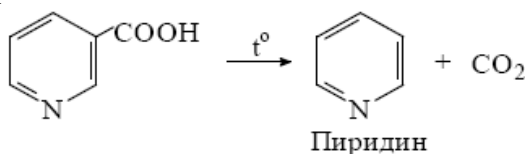
Ход работы

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

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

4.5.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ПИРИДИНОВОГО КОЛЬЦА В МОЛЕКУЛЕ ВИТАМИНА РР

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



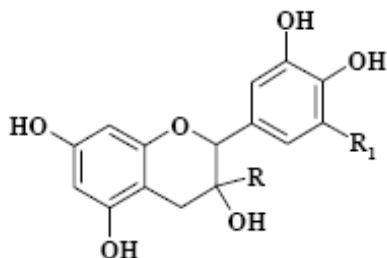
Ход работы

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

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

4.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА (ВИТАМИН Р)

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



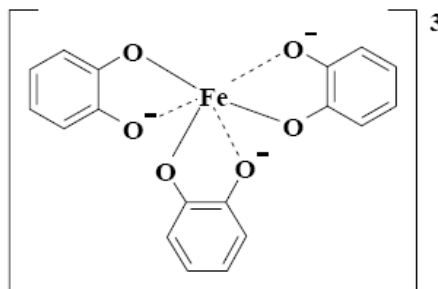
R и R₁ – H или OH

Витамин Р (*цитрин*)

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.

4.6.1. РЕАКЦИЯ С ХЛОРИДОМ ЖЕЛЕЗА

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



Ход работы

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

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

4.6.2. РЕАКЦИЯ С СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

Концентрированная серная кислота образует с флавонами и флавоноидами

оксониевые соли, растворы которых имеют ярко-желтую окраску.

Ход работы

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

4.6.3. РЕАКЦИЯ С РЕАКТИВОМ ФЕЛИНГА

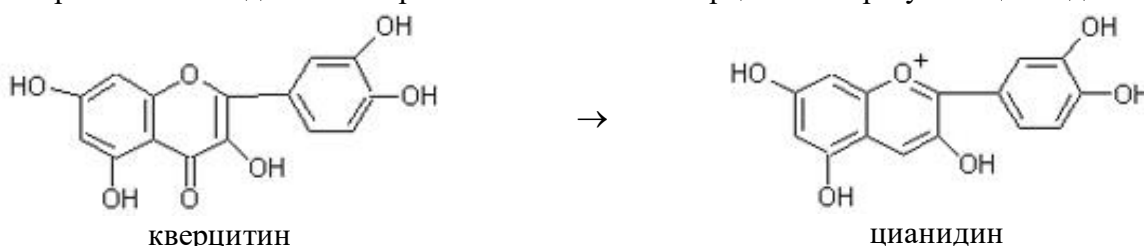
При кислотном гидролизе рутина отщепляется молекула рутинозы, которая распадается на глюкозу и рамнозу, обладающих восстанавливающими свойствами.

Ход работы

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

4.6.4. РЕАКЦИЯ С МАГНИЕМ И СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

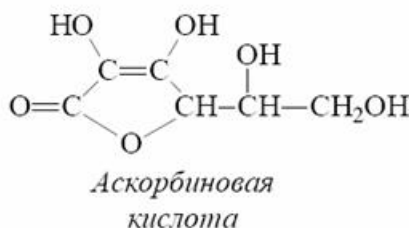
Флавоноиды реагируют с магнием и соляной кислотой, легко восстанавливаются, давая окрашенные соединения. При восстановлении кверцетина образуется цианидин.



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

4.7. КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИН С)

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

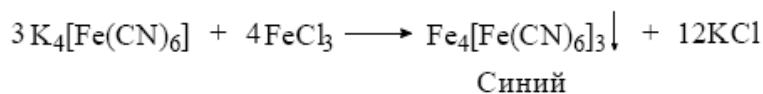
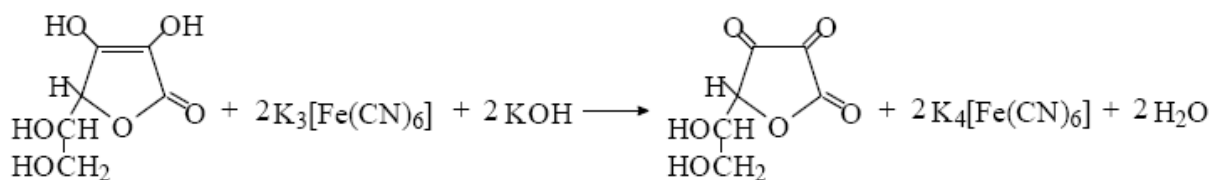


При недостатке витамина С в пище у человека развивается цинга. При цинге повышается хрупкость сосудов, возникают кровоизлияния, повреждаются кости особенно зубы. Суточная потребность в аскорбиновой кислоте взрослого человека при средних затратах физического труда — 50 мг. Богаты витамином С лимоны, черная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

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

4.7.1. РЕАКЦИЯ С ЖЕЛЕЗОСИНЕРОДИСТЫМ КАЛИЕМ

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



Ход работы

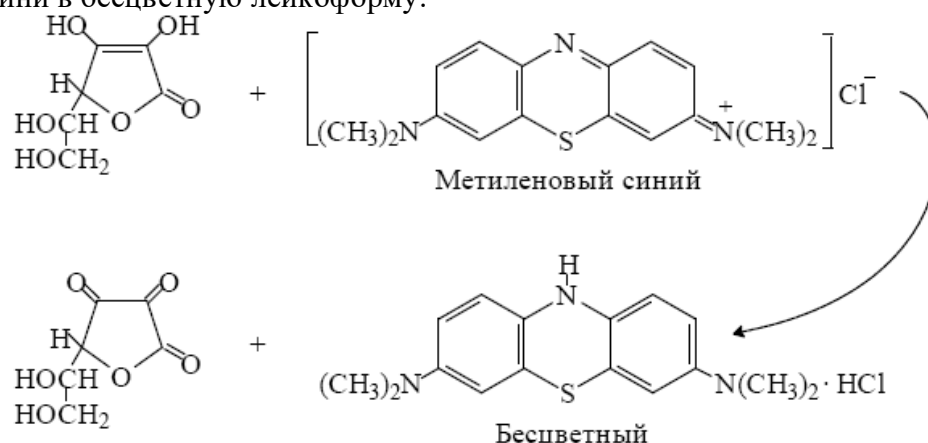
В пробирку отмеривают 10 капель вытяжки из шиповника, добавляют 2 капли 10% раствора гидроксида натрия, 2 капли 5% раствора железосинеродистого калия и перемешивают.

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

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

4.7.2. РЕАКЦИЯ С МЕТИЛЕНОВОЙ СИНЬЮ

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



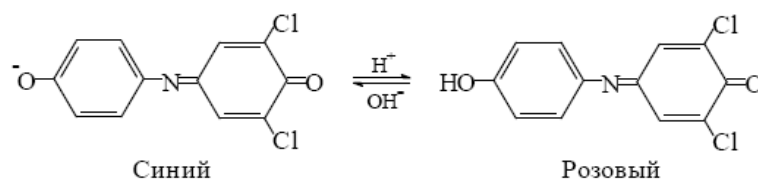
Ход работы

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.

4.7.3. РЕАКЦИЯ С 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛОМ

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



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



4.7.4. РЕАКЦИЯ С РАСТВОРОМ ЛЮГОЛЯ

$$3 \text{ C}_5\text{H}_8\text{O}_6 + \text{KJO}_3 \longrightarrow 3 \text{ C}_5\text{H}_6\text{O}_6 + \text{KJ} + 3 \text{ H}_2\text{O}$$

Ход работы

4.7.5. СЕРЕБРЯНАЯ ПРОБА НА ВИТАМИН С

$$\begin{array}{c} \text{HO} \quad \text{OH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} = \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{O} \\ | \quad | \\ \text{HOCH} \quad \text{O} \\ | \quad | \\ \text{HOCH}_2 \end{array} + 2 \text{AgNO}_3 \longrightarrow \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} = \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{O} \\ | \quad | \\ \text{HOCH} \quad \text{O} \\ | \quad | \\ \text{HOCH}_2 \end{array} + 2 \text{Ag} \downarrow + 2 \text{HNO}_3$$

Ход работы

4.8. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕТИНОЛА (ВИТАМИН А)

витамин A_1

витамин A_2

24

контакт с поверхностно-активными веществами приводит к цис-транс- изомерным переходам. Витамин обладает противомикробным действием, участвует в процессе восприятия света. Наибольшее содержание каротиноидов в моркови, перце, томате. Суточная потребность в витамине А для взрослого человека составляет 1—2,5 мг витамина А.

Ход работы

4.8.1. РЕАКЦИЯ С ТРЕХХЛОРИСТОЙ СУРЬМОЙ

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

4.8.2. РЕАКЦИЯ ДРУММОНДА С КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

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

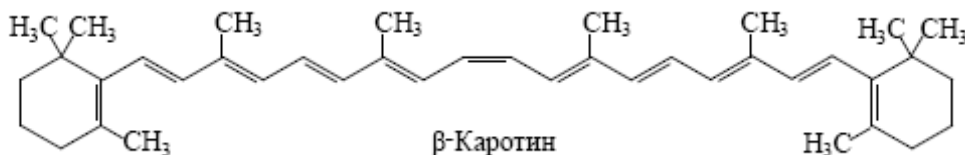
4.8.3. РЕАКЦИЯ С СУЛЬФАТОМ ЖЕЛЕЗА (II)

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

4.9. ОБНАРУЖЕНИЕ КАРОТИНА В ШИПОВНИКЕ

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

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



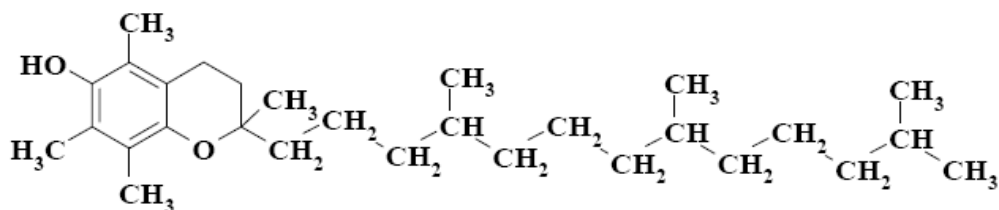
Ход работы

1. Одну-две сухие ягоды шиповника растирают в ступке, затем добавляют 2—3 мл хлороформа и растирание продолжают еще 1 минуту.
2. Содержимое ступки фильтруют через заранее приготовленный фильтр в сухую пробирку. Фильтрат окрашен каротинами в оранжевый цвет.
3. В сухой пробирке к нескольким каплям хлороформной вытяжки, содержащей каротин, добавляют около 20 капель раствора хлористой сурьмы в хлороформе. Появляется голубая окраска, которая даже при длительном стоянии не переходит в розово-фиолетовую.
4. В сухую пробирку вносят несколько капель хлороформной вытяжки и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется синяя окраска, переходящая в зеленую.
5. К нескольким каплям хлороформной вытяжки добавляют 1—2 капли бромной воды и встряхивают. Бромная вода обесцвечивается. В ходе реакции происходит не только обесцвечивание брома, но и обесцвечивание самого каротина. Избыток бромной воды добавлять не следует, так как он вызывает окрашивание хлороформного слоя.

4.10. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА α-ТОКОФЕРОЛ

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

токоферол.



α-токоферол

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

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

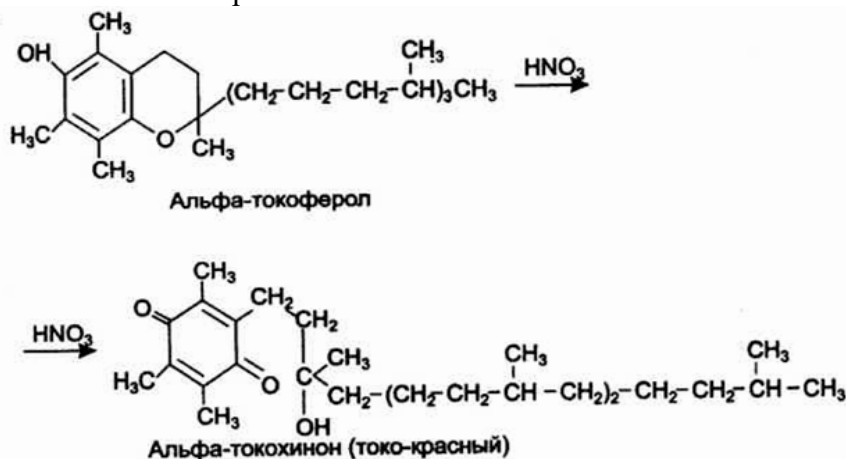
Взаимодействие α-токоферола с концентрированной азотной кислотой приводит к окрашиванию реакционной смеси в красный цвет. Это обусловлено тем, что продукт окисления α-токоферол имеет хиноидную структуру. При взаимодействии с хлорным железом (III) α-токоферол окисляется до α-токоферилхинона - соединения,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

4.10.1. РЕАКЦИЯ С АЗОТНОЙ КИСЛОТОЙ

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

Ход работы

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



4.10.2. РЕАКЦИЯ С ХЛОРНЫМ ЖЕЛЕЗОМ

Ход работы

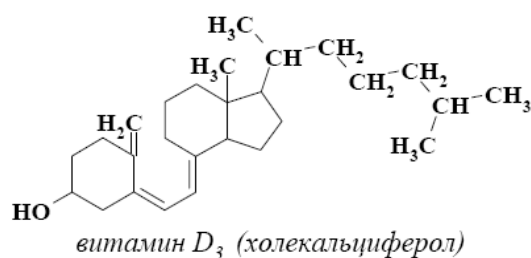
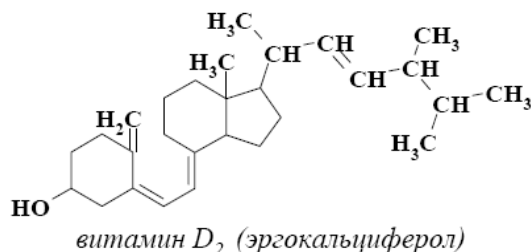
В сухую пробирку вносят 0,5 мл спиртового раствора α-токоферола, затем 0,5 мл 1% раствора хлорного железа (III) и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдают появление красного окрашивания.

4.11. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИФЕРОЛА (ВИТАМИН D)

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

ультрафиолетовых солнечных лучей.

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



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

4.11.1. 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.

4.11.2. РЕАКЦИЯ С БРОМОМ

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

4.11.3. РЕАКЦИЯ С УКСУСНЫМ АНГИДРИДОМ И СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

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

Немного сухих дрожжей помещают в пробирку, затем добавляют 15 капель хлороформа, встряхивают.

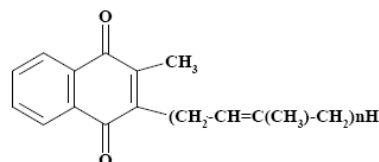
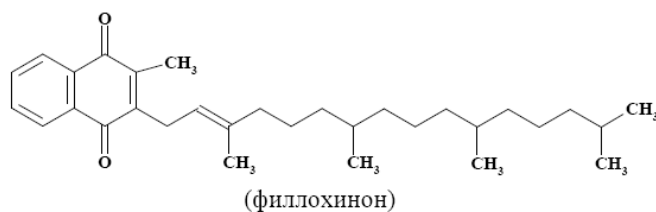
Полученный экстракт отфильтровывают. К нему добавляют по 5 капель уксусного ангидрида и серной кислоты. Отмечают результат реакции.

4.12. КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ ФИЛЛОХИНОНА

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

Витамин К необходим для синтеза клетками печени ряда факторов свертывания крови. В остатки глутаминовых кислот белковых молекул этих факторов вводится еще одна карбоксильная группа.

Образуются остатки γ-карбоксиглутаминовой кислоты, через которые происходит присоединение ионов кальция. Поэтому после введения в организм антагонистов витамина К время свертывания крови увеличивается.



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

4.12.1. РЕАКЦИЯ С ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТОМ

Ход работы

В пробирку вносят 4 капли спиртового раствора витамина К, добавляют 8 капель 5% диэтилдителиокарбамата натрия и 4 капли 4 % спиртового раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирки встряхивают. Что наблюдаете?

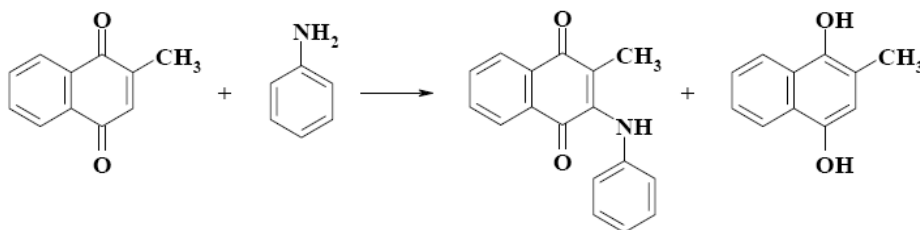
4.12.2. РЕАКЦИЯ СО ЩЕЛОЧНЫМ РАСТВОРОМ ЦИСТЕИНА

Ход работы

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

4.12.3. РЕАКЦИЯ С АНИЛИНОМ

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



Ход работы

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

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица - Результаты лабораторной работы

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Витамины. История их открытия. Витамеры.
2. Номенклатура и классификация витаминов.
3. Витамин В₁. Химическая природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.
4. Витамин В₂. Строение и участие его в окислительно-восстановительных реакциях.

Содержание в продуктах, суточная потребность.

5. Витамин В₆. Формы и значения. Содержание, суточная потребность.

6. Витамин В₁₂. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.

7. Витамин С. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.

8. Витамин Р. Взаимообусловленность действия вит. С и Р. Содержание в продуктах, суточная потребность.

9. Витамин Н. Его строение и роль. Содержание в продуктах, потребность.

10. Витамин РР. Содержание в продуктах, суточная потребность.

11. Витамин F. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.

12. Витамин Q (убихинон). Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.

13. Витамин Е. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.

14. Каротин. Природа и механизм действия. Содержание в продуктах, суточная потребность.

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

16. Витамин Д. Химическая структура витаминов Д₂ и Д₃, роль в фосфорнокальциевом обмене. Механизм действия. Содержание в продуктах.

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

18. Что такое явление синергизма? Поясните на примере витаминов С и Р.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5.

ОТКРЫТИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Выделить ферменты разных классов из различных биологических объектов и установить специфичность действия ферментов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

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

5.1. ОТКРЫТИЕ АЛЬДЕГИДОКСИДАЗЫ В СЫРОМ МОЛОКЕ

Альдегидоксидаза относится к классу оксидоредуктаз. Окисляемыми субстратами, на которые действуют оксидоредуктазы, могут быть спиртовая группа (–ОН), альдегидная (–СНО), кетонная (–СО), этильная (–СН₂–СН₂–) и др., а также восстановленные формы пиридиновых коферментов — никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) и др.

Ход работы

В три пробирки наливают по 5мл свежего молока. Одну пробирку кипятят в течение 2-3 минут и остужают (1 пробирка). В 1 и 2 пробирки наливают по 1мл 0,4% раствора формалина, а в 3 пробирку - 1мл воды. Во все три пробирки приливают по 1мл 0,01% раствора метиленового синего.

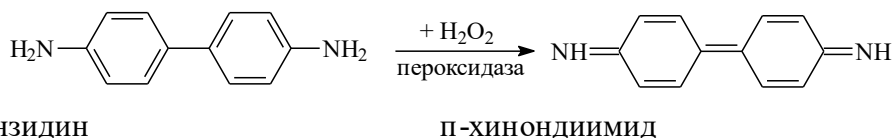
Содержимое пробирок хорошо перемешивают и заливают в каждую по 3-4 капли вазелинового масла для предохранения жидкости от соприкосновения с кислородом воздуха.

Все три пробирки помещают в водяную баню при температуре до 40 °С. Через 15-30 минут в одной из пробирок происходит обесцвечивание жидкости.

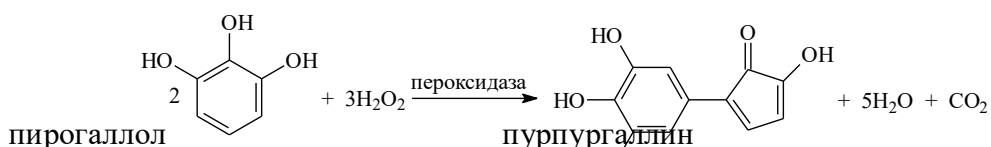
В какой и почему? Почему не происходит обесцвечивание в двух других? Сделайте вывод.

5.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ

Пероксидаза активирует перекиси, в том числе и перекись водорода. Под действием перекиси происходит окисление различных фенолов и ароматических аминов. Этот фермент очень широко распространен в тканях растительного и животного происхождения. По химической природе пероксидаза - геминный фермент. Она содержит одну гематиновую группу. Пероксидаза способна катализировать окисление бензидина с образованием окрашенного соединения парахинондиимид.



Пирогаллол окисляется при участии пероксидазы с образованием пурпургаллина красного цвета.



5.2.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ РЕДЬКИ

Ход работы

А) В пробирку наливают 2 мл вытяжки из редьки, кипятят и охлаждают (навеску в 1 г корня редьки измельчают, растирают в ступке и переносят в химический стакан, смывая водой, общий объем вытяжки не должен превышать 10 мл, вытяжку фильтруют через складчатый фильтр). В 4 пронумерованные пробирки наливают по 1 мл 2% раствора пирогаллола и добавляют: в 1 и 4 пробирки - 1 мл свежей вытяжки из редьки, во 2 пробирку - 1 мл прокипяченной и охлажденной вытяжки, в 3 пробирку - 1 мл дистиллированной воды. Затем в пробирки 1,2,3 добавляют 2-3 капли 1% раствора перекиси водорода, взбалтывают и наблюдают образование осадка (пурпургаллина).

Б) В пробирку налить 1 мл вытяжки редьки, прокипятить и охладить. В 3 пробирки налить по 1 мл раствора пирогаллола. В 1-ю пробирку налить 1 мл неинaktivированного препарата пероксидазы (вытяжки редьки), во 2-ю 1 мл инаktivированного препарата фермента, в 3-ю 1 мл воды. Затем во все пробирки добавить по 1 мл перекиси водорода и перемешать содержимое. Образуется осадок только в первой пробирке. Сделайте выводы.

5.2.2. ВЫДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДАЗЫ КАПУСТЫ

Ход работы

А) Капусту измельчают и из полученной кашицы отжимают сок (2 мл) в стакан, разбавляя его в 10 раз. В 4 сухие пробирки наливают по 1 мл разбавленного сока. Пробирки 1 и 2 ставят на кипящую водяную баню на 5 мин., охлаждая затем до комнатной температуры, а пробирки 3 и 4 оставляют при комнатной температуре. В пробирки 5 и 6 ставят контрольные пробы, наливают по 1 мл воды. Во все пробирки на кончике скальпеля добавляют гидрохинон. Затем в пробирки 1,3 и 5 добавляют по 5 капель воды, а в пробирки 2,4,6 – по 5 капель пероксида водорода. Содержимое пробирок перемешать.

Через 10-15 мин записать результаты опыта в таблицу. Везде ли произошло окисление?

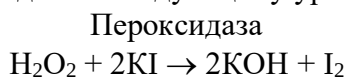
Б) Капусту измельчают и из полученной кашицы отжимают сок (2 мл) в стакан, разбавляя его в 20 раз. В 4 сухие пробирки наливают по 1 мл разбавленного сока, а в 5 и 6

налить воду по 1 мл. Во все пробирки на кончике скальпеля добавить гидрохинон. Пробирку 1 ставим в лед. Вторую пробирку в термостат при 37 °С, третью в горячую воду 60 °С, четвертую и шестую оставляет при комнатной температуре, пятую помещаем в кипящую воду.

Через 5 мин после начала опыта во все пробирки, начиная с более холодных, вливаем по 5 мл пероксида водорода при осторожном перемешивании. Еще через 5 мин отметить результаты опыта.

5.2.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕРОКСИДАЗЫ В МОЛОКЕ

Пероксидаза расщепляет пероксид водорода с выделением кислорода, который окисляет йодистый калий. Реакция идет по следующему уравнению:

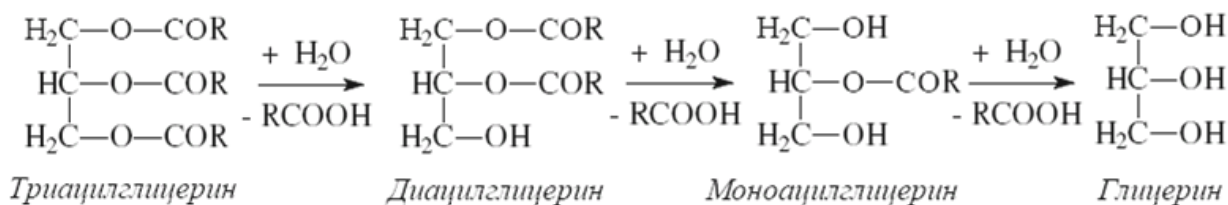


Ход работы

В две пробирки наливают по 5 мл молока. Молоко во второй пробирке, служит контролем, ее нагревают до кипения. Затем в обе пробирки добавляют по 1 мл 1% раствора крахмала, по 2 капли 10% раствора йодистого калия и по 5 капель 0,5% раствора перекиси водорода. В одной из пробирок появляется синее окрашивание, в какой и почему?

5.3. ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛИПАЗЫ

Липаза содержится в небольшом количестве в желудке, главным образом она входит в состав сока поджелудочной железы. Желудочная липаза может действовать только на предварительно эмульгированные жиры. Она гидролизует триацилглицерины, которые распадаются на глицерин и три молекулы жирных кислот:



Ход работы

В 2 пробирки вносят по 1 мл подсолнечного масла и добавляют по 4 мл воды и 5 мл 1 % гидрокарбоната натрия. Пробирки энергично встряхивают и добавляют 5 капель 1% спиртового раствора фенолфталеина. Затем в 1-ю пробирку вносят 1 мл препарата липазы и перемешивают. Вторую пробирку оставляют без изменений. Обе пробирки ставят в термостат при 37 °С на 5-10 минут.

В пробирке с липазой раствор постепенно становится бесцветным, а в пробирке без липазы окраска не исчезает. Объясните почему.

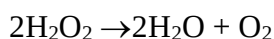
5.4. ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ ДЕГИДРАЗЫ

Ход работы

В 1 пробирку помещают суспензию из свежих дрожжей, а во 2 суспензию прокипяченных дрожжей (на 5% растворе сахарозы) по 3 мл. Добавить в каждую пробирку по 2-3 капли метиленовой сини и поставить в термостат при 37 °С на 10 минут. Объясните почему изменяется окраска и в какой пробирке. Поясните механизм действия фермента.

5.5. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КАТАЛАЗУ

Каталаза чрезвычайно широко распространена и найдена у животных, растений и всех аэробных бактерий. Кроме реакции разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород, каталаза слабо катализирует также окисление перекисями различных спиртов и других соединений.



5.5.1. ОТКРЫТИЕ КАТАЛАЗЫ В СЛЮНЕ

Ход работы

В пробирку наливают 1 мл слюны и 1 мл 1% раствора пероксида водорода. Тотчас же начинается выделение пузырьков кислорода.

5.5.2. ОТКРЫТИЕ КАТАЛАЗЫ В МОЛОКЕ

Ход работы

В две пробирки наливают по 2 мл молока. Одну кипятят, вторую оставляют без изменений. Приливают в каждую пробирку по 1 мл 3 % раствора перекиси водорода. В какой пробирке происходит выделение кислорода?

5.6. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ.

Специфичность действия ферментов – это способность катализировать одну или несколько близких реакций, преобразовывать одно вещество или один вид связей. Специфичность ферментов бывает нескольких видов: абсолютная, относительная (групповая), стереохимическая.

5.6.1. СРАВНЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ КАТАЛИЗАТОРОВ И ФЕРМЕНТОВ

Главное отличие ферментов от катализаторов неорганической природы состоит в исключительно высокой каталитической активности и ярко выраженной специфичности действия в условиях нормальной температуры, pH и давления.

Ход работы

В пять пробирок наливают по 3 мл раствора с массовой долей крахмала 1 %. В первую и пятую добавляют по 1 мл воды, во вторую – 1 мл вытяжки из солода, в третью и четвертую – по 1 мл раствора с массовой долей серной или соляной кислоты 10 %.

Содержимое перемешивают встряхиванием и первые три пробирки ставят в термостат при 37-38 °С, а четвертую и пятую – в кипящую водяную баню. Через 20 мин пробирки из термостата и водяной бани убирают, горячие охлаждают до комнатной температуры и в каждой проводят пробы с йодом и пробу Троммера. Расщепление крахмала шло в тех пробирках, где содержимое окрашено в желтые, красные и фиолетовые тона.

Записывают окраску содержимого каждой пробирки и на основании полученных результатов делают вывод о том, какие из исследованных веществ являются катализаторами и при какой температуре происходит их каталитическое действие. Результаты опыта заносят в таблицу 8.

Таблица 8. Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов

№ пробы	Субстрат, 2 мл	Катализатор, 1 мл	Температура инкубации, °С	После инкубации	
				Проба с йодом	Проба Троммера
1	Крахмал	Вода	37-38		
2	Крахмал	Амилаза	37-38		
3	Крахмал	Кислота	37-38		
4	Крахмал	Кислота	100		
5	Крахмал	Вода	100		

5.6.2. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ АМИЛАЗЫ

Фермент амилаза катализирует гидролитическое расщепление крахмала с образованием мальтозы или глюкозы. Промежуточными продуктами могут быть различные декстрины. Степень гидролиза крахмала можно контролировать по цветной реакции с йодом. Крахмал дает с йодом синее окрашивание, декстрины в зависимости от размеров молекул окрашиваются йодом в разные цвета (фиолетовый, красно-бурый), а конечные продукты (мальтоза или глюкоза) с йодом окраски не дают.

Второй контрольной пробой может быть реакция Троммера, указывающая на наличие свободных альдегидных групп (в мальтозе или глюкозе). В крахмале свободных альдегидных групп нет (проба Троммера отрицательна).

Ход работы

В одну пробирку наливают 10 капель 0,5% раствора крахмала, в другую - 10 капель 0,5% раствора сахарозы. В обе пробирки вносят по 5 капель слюны, разведенной в 5 раз. Содержимое пробирок перемешивают и ставят на 10 мин в термостат при 40° С. Затем содержимое пробирок с крахмалом делят на две части.

После этого в пробирке с сахарозой и в одной из пробирок с крахмалом проводят качественную реакцию Троммера и убеждаются в том, что произошло расщепление только крахмала, но не сахарозы.

К 5 каплям содержимого пробирок добавляют 5 капель 30% NaOH и несколько капель 7% раствора CuSO₄ до появления исчезающей мути гидроокиси меди Cu(OH)₂. При нагревании до кипения выпадает желтый осадок CuOH или красный осадок закиси меди Cu₂O.

В другой пробирке с крахмалом, чтобы подтвердить его расщепление, ставят реакцию с йодом. В этом случае раствор не приобретет синей окраски.

К 2-3 мл раствора крахмала приливают 1 каплю раствора Люголя; жидкость окрашивается в синий цвет, исчезающий при нагревании и появляющийся при охлаждении.

5.6.3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ САХАРАЗЫ

Сахаразу - фермент, расщепляющий дисахарид сахарозу на глюкозу и фруктозу, можно легко получить из дрожжей. Действие сахаразы можно обнаружить по появлению в инкубационной среде свободной глюкозы, дающей положительную качественную реакцию Троммера вследствие наличия в молекуле глюкозы свободного полуацетального гидроксила. Сахароза этой реакции не дает, так как полуацетальный гидроксил в ее глюкозном остатке участвует в соединении с глюкозой.

Для исследования специфичности действия ферментов удобно пользоваться сахарозой, содержащейся в вытяжке из дрожжей.

Ход работы

Приблизительно 0,5 г дрожжей растирают в фарфоровой ступке для разрушения дрожжевых клеток. Затем добавляют 3 мл воды и растирают дрожжи с водой; при этом сахараза переходит в раствор.

Смесь фильтруют через небольшой складчатый фильтр, полученный фильтрат служит источником сахаразы.

В одну пробирку наливают 10 капель 0,5% раствора сахарозы; в другую - 10 капель раствора 0,5% раствора крахмала и в обе пробирки вносят по 5 капель дрожжевого фильтрата, содержащего сахаразу. Обе пробирки ставят на 10 мин в термостат при 40° С, после чего в обеих пробирках проводят реакцию Троммера и убеждаются в том, что расщепляется только сахароза, но не крахмал. В пробирке с крахмалом проводят цветную реакцию с раствором Люголя.

Результаты работы записывают в таблицу 9.

Таблица 9. Определение специфичности действия амилазы слюны и сахаразы дрожжей

Фермент	Субстрат	Контрольные реакции (+ или -)	
		Реакция на крахмал	Реакция Троммера
Амилаза слюны	Крахмал		
Сахараза дрожжей	-"-		
Амилаза слюны	Сахароза		
Сахараза дрожжей	-"-		

5.6.4. ГРУППОВАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ САХАРАЗЫ

Сахараза специфична по отношению к фруктозной части дисахарида сахарозы и трисахарида рафинозы. Расщеплению подвергается бетта-гликозидная связь, расположенная ближе к фруктозной части данных молекул. Продукты ферментативного гидролиза сахарозы и рафинозы дают положительную реакцию с реактивом Фелинга.

Ход работы

В две пробирки наливают по 1 мл препарата сахаразы, в одну добавляют 2 мл 1% раствора сахарозы, в другую 2 мл 1% раствора рафинозы. Обе пробирки ставят на 10 мин в термостат при 38° С, после чего в обеих пробирках проводят реакцию с реактивом Фелинга (добавить по 3 мл), перемешивают и нагревают до кипения. В обеих пробирках образуется красный осадок оксида меди.

5.6.5. СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ УРЕАЗЫ

Метод основан на том, что уреаза катализирует расщепление мочевины на CO₂ и аммиак. Появление аммиака обнаруживается фенолфталеином.

Ход работы

В одну пробирку отмеривают 1 мл раствора мочевины, а в другую — 1 мл раствора тиомочевины. В обе пробирки добавляют либо соевую муку на кончике скальпеля (приблизительно 10 мг), либо 1 мл 2%-ного экстракта из соевой муки. В каждую пробирку добавляют по 2—3 капли раствора фенолфталеина и содержимое обеих пробирок встряхивают. Пробирки оставляют стоять на столе при комнатной температуре и через несколько минут наблюдают появление розовой окраски в пробирке с мочевиной и отсутствие окраски в пробирке с тиомочевиной. Результаты работы записывают в таблицу.

Таблица -Определение специфичности действия уреазы

№ пробы	Препарат уреазы, мл	Раствор мочевины, мл	Раствор тиомочевины, мл	Раствор фенолфталеина	Результат реакции с фенолфталеином
1	10	1	-	2-3 капли	
2	10	-	1	2-3 капли	

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. На чем основана классификация ферментов?
2. Номенклатура ферментов.
3. Какие ферменты относятся к классу оксидоредуктаз, как они подразделяются? Примеры реакций, катализируемые оксидоредуктазами.
4. Какие ферменты относятся к классу гидролаз и на какие группы они подразделяются? Примеры реакций катализируемые гидролазами.
5. Какие ферменты относятся к классу трансфераз, как они подразделяются? Примеры реакций катализируемые трансферазами.
6. Какие ферменты относятся к классу лиаз, как они подразделяются? Примеры реакций катализируемые лиазами.
7. Какие ферменты относятся к классу изомераз, как они подразделяются? Примеры реакций катализируемые изомеразами.
8. Какие ферменты относятся к классу лигаз, как они подразделяются? Примеры реакций катализируемые лигазами.
9. Локализация ферментов в клетке.
10. Характеристика специфичности действия фермента.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ УГЛЕВОДОВ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с качественными реакциями наиболее распространенных представителей класса углеводов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

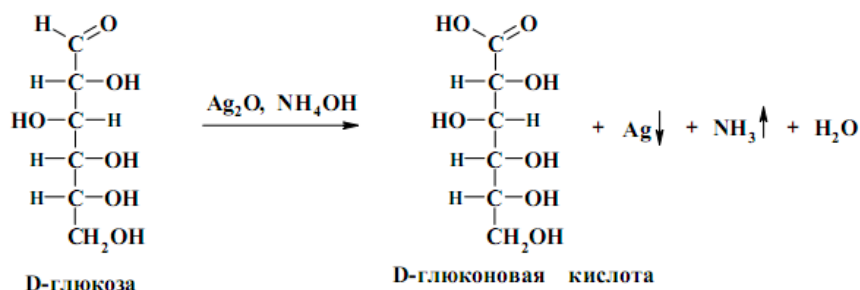
Углеводы - обширный класс соединений широко распространенных в природе. По химической природе это органические вещества, представляющие собой альдегиды или кетоны многоатомных спиртов. В зависимости от числа атомов углерода в цепи моносахариды делят на тетразы (C₄), пентозы (C₅), гексозы (C₆) и т.д.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

6.1. ОТКРЫТИЕ МОНОСАХАРИДОВ

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.

6.1.1. РЕАКЦИЯ «СЕРЕБРЯНОГО ЗЕРКАЛА»

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

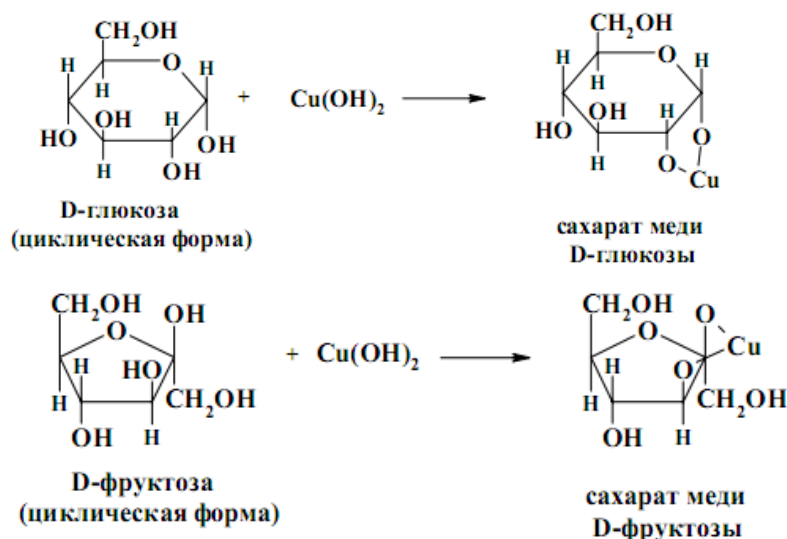


Ход работы

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

6.1.2. РЕАКЦИЯ ТРОММЕРА

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



Ход работы

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

6.1.3. ОТКРЫТИЕ ФРУКТОЗЫ (РЕАКЦИЯ СЕЛИВАНОВА)

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

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

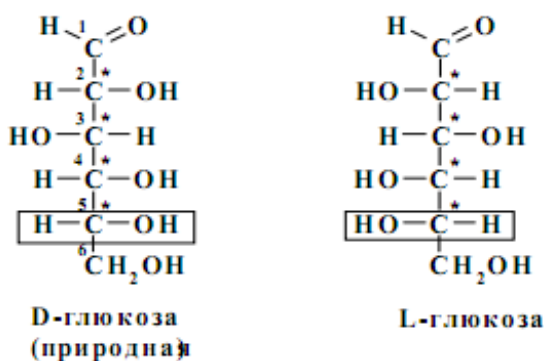
Ход работы

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

6.1.4. ПРОБА БЕНЕДИКТА НА ГЛЮКОЗУ

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

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

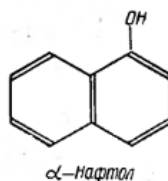


Ход работы

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

6.1.5. РЕАКЦИЯ МОЛИША

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

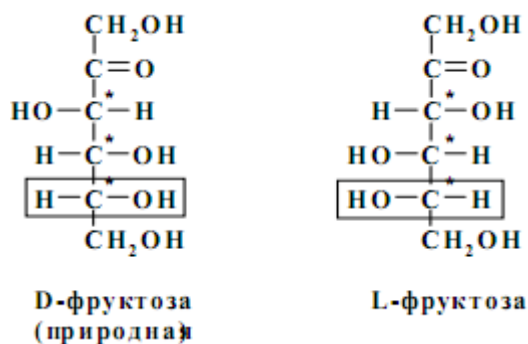


Ход работы

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

6.1.6. ЦВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ С ВАНИЛИНОМ НА ФРУКТОЗУ

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



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

Ход работы

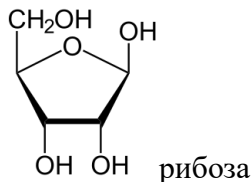
1 мл исследуемого раствора (1% фруктозы)- смешать с 5 мл ванилинового реагента и нагреть две минуты на водяной бане, после чего быстро охладить в ледяной воде.

6.1.7. РЕАКЦИЯ НА КАРБОНИЛЬНЫЕ ГРУППЫ

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

6.1.8. РЕАКЦИЯ ПОДОБЕДОВА-МИЛЫША

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

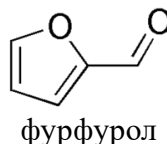


Ход работы

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

6.1.9. РЕАКЦИЯ ПЕНТОЗ С УКСУСНОКИСЛЫМ АНИЛИНОМ

В ходе реакции образуется фурфурол.



Ход работы

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

6.1.10. ПРОБА ГАЙНЕСА

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

Реактив Гайнеса: 1) 13,3 г кристаллического сульфата меди растворяют в 400 мл

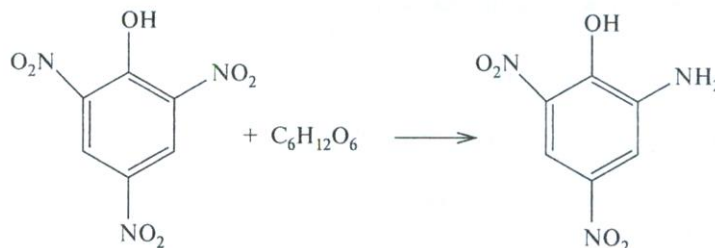
воды; 2) 15 г глицерина разводят в 200 мл воды; 3) 50 г NaOH растворяют в 400 мл воды. Смешивают первый и третий растворы и тотчас приливают второй. Реактив стойкий.

Ход работы

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

6.1.11. РЕАКЦИЯ С ПИКРИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

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



Ход работы

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

6.1.12. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УГЛЕВОДОВ С КОНЦЕНТРИРОВАННЫМИ КИСЛОТАМИ

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

Ход работы

6.1.12.1. РЕАКЦИЯ С СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

Несколько крупинок глюкозы или фруктозы растворяют в 1-2 мл воды. К холодному раствору осторожно, по стенкам пробирки, добавляют равный объем концентрированной серной кислоты, стараясь не взболтать смесь. Серная кислота образует нижний, тяжелый, слой под раствором сахара. На границе этих слоев постепенно появляется темно-бурое кольцо. Если на холоду кольца не образуется, слегка подогревают содержимое пробирки, не взбалтывая.

6.1.12.2. РЕАКЦИЯ С СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

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

6.1.13. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ САХАРОВ СО ЩЕЛОЧАМИ

Все сахара, имеющие свободную карбонильную группу, т.е. все моносахариды и некоторые дисахариды при нагревании в щелочном растворе легко осмоляются, образуя коричневый или черный раствор.

Опыт одновременно проводят с несколькими различными сахарами, применяя готовые 5-10%-ные их растворы или растворяя 0,1-0,2 г сахара в 1-2 мл воды.

Ход работы

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

6.1.14. ОКИСЛЕНИЕ АЛЬДОЗЫ И КЕТОЗЫ ЙОДОМ

Ход работы

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

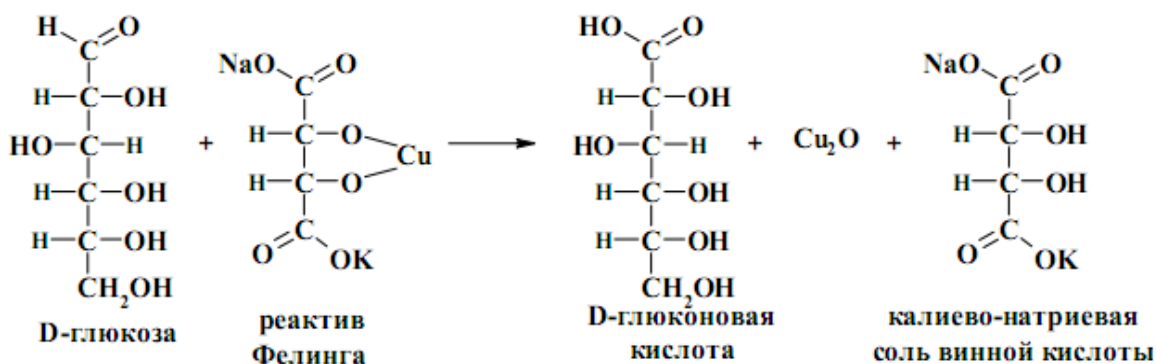
Через 7-8 минут приливают в обе пробирки по 0,5 мл разбавленной серной кислоты и сравнивают появляющуюся окраску.

6.1.15. ДЕЙСТВИЕ НА УГЛЕВОДЫ РЕАКТИВА ФЕЛИНГА

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

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

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



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

Ход работы

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

6.1.16. РЕАКЦИЯ БИАЛЯ (ОТКРЫТИЕ ПЕНТОЗ)

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

Ход работы

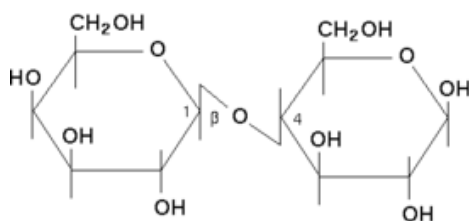
В 125 мл 25%-ной соляной кислоты растворяют 0,25 г орцина и добавляют 5 капель хлорида железа (III). Около 5 мл 0,1%-ного раствора пентозы смешивают с двойным объемом реактива, приготовленного описанным способом, и кипятят 1—2 мин. Появляется сине-зеленая окраска, которая извлекается амиловым спиртом.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

6.2. РЕАКЦИИ НА ОТКРЫТИЕ ОЛИГОСАХАРИДОВ

Олигосахариды – углеводы, молекулы которых содержат от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных гликозидными связями. Из олигосахаридов в природе наиболее широко распространены дисахариды.

6.2.1. ОТКРЫТИЕ ЛАКТОЗЫ В МОЛОКЕ

Молочный сахар - лактоза, состоит из остатков β -галактозы и α -глюкозы, соединенных между собой 1,4-глюкозидной связью.



Ход работы

В пробирку наливают 0,5 мл молока, добавляют 5 капель 10 % раствора NaOH и по каплям 2 % раствор CuSO_4 до образования легкой не исчезающей мути. Пробирку нагревают, появляется желтое окрашивание, а затем образуется красно-коричневый осадок.

6.2.2. ВОССТАНАВЛИВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ЛАКТОЗЫ

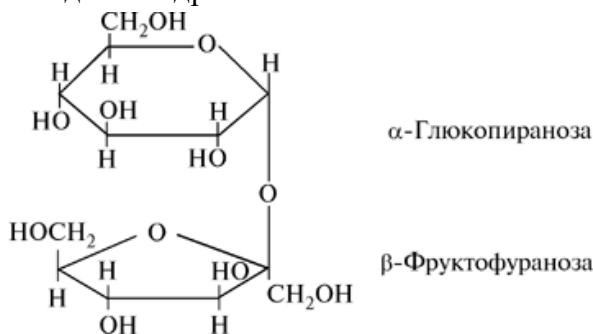
У восстанавливающих дисахаридов связь между мономерами осуществляется за счет спиртового и полуацетального гидроксильных. Таким образом, одно из моносахаридных звеньев сохраняет свободный полуацетальный гидроксил, который определяет восстанавливающие свойства и все реакции, свойственные моносахаридам.

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 CuSO_4 до полного растворения. Осторожно нагревают, голубой осадок гидрата окиси меди переходит в желто-оранжевый.

6.2.3. ОТСУТСТВИЕ ВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ САХАРОЗЫ

Сахароза состоит из α -D-глюкопиранозы и β -D-фруктофуранозы, соединенных α 1 - β 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 CuSO_4 , пока не прекратится его растворение. Осторожно нагревают пробирку. Что происходит?

6.2.4. 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 окисляясь в серной кислоте, дает окрашенное хиноидное соединение.

Ход работы

Несколько кристалликов сахара нагревают с 10 мл концентрированной соляной кислоты и добавляют 5% спиртовой раствор тимола. Появляется красная окраска.

6.2.5. РЕАКЦИЯ БАРФЕДА

Реакция Барфедда позволяет отличить моносахариды от дисахаридов мальтозного типа, обладающих восстанавливающими свойствами (лактозы, мальтозы, целлобиозы).

Ход работы

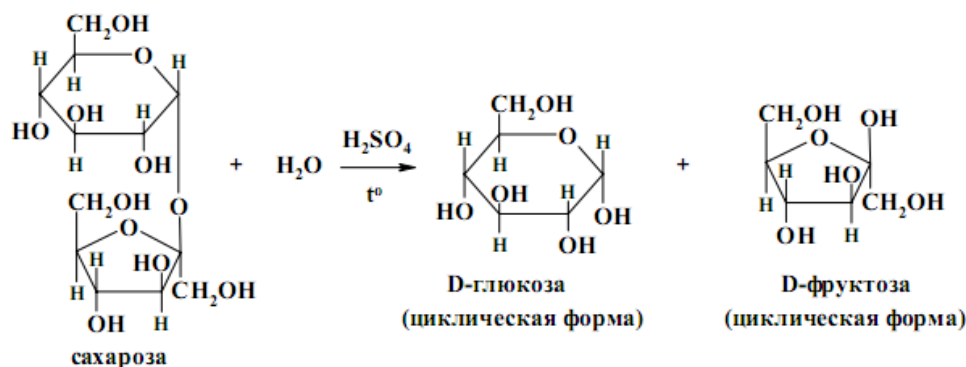
Реактив Барфедда готовят из 6 % раствора ацетата меди (II) в 1 % уксусной кислоте. Десять объемов раствора исследуемого сахара нагревают с одним объемом реактива. Моносахариды восстанавливают реактив до окиси меди (I); дисахариды нет.

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

В 2 пробирки наливают по 2 мл 10% раствора сахарозы и по 1 мл 5% раствора гидроксида натрия. Затем в 1-ю пробирку добавляют несколько капель 5% раствора сульфата кобальта, а во вторую 5% сульфата никеля. С солью кобальта образуется фиолетовое окрашивание, с солью никеля зеленое.

В три пробирки внесите по 5 капель реактива Фелинга. В первую пробирку добавьте 4 капли раствора лактозы, во вторую – 4 капли раствора мальтозы, в третью – 4 капли раствора сахарозы. Содержимое пробирок тщательно перемешайте и поместите их в кипящую водяную баню на 5 минут. После завершения реакции выдержите пробирки в штативе при комнатной температуре в течение 5-10 минут, не встряхивая.

В три пробирки поместите по 5 капель аммиачного раствора оксида серебра. Затем в первую пробирку добавьте 3 капли раствора лактозы, во вторую – 3 капли раствора сахарозы, а в третью - 3 капли раствора крахмала. Содержимое пробирок тщательно перемешайте и нагрейте на водяной бане в течение 5 минут.



Ход работы

Поместите в пробирку 9 капель раствора сахарозы и 5 капель 2н раствора серной кислоты, тщательно перемешайте и выдержите на водяной бане в течение 5-7 минут. Охладите раствор и разделите его на две пробирки.

В первую пробирку прибавьте при постоянном перемешивании по каплям 2н раствор гидроксида натрия до щелочной реакции по универсальному индикатору, а затем 5 капель реактива Фелинга. Если раствор сразу обесцветился, то прибавьте еще несколько капель 2н раствора гидроксида натрия (среда должна быть щелочной), и снова 5 капель реактива Фелинга. Реакционную смесь выдержите на кипящей водяной бане до изменения окраски.

Во вторую пробирку внесите 5 капель реактива Селиванова и выдержите на водяной бане до изменения окраски.

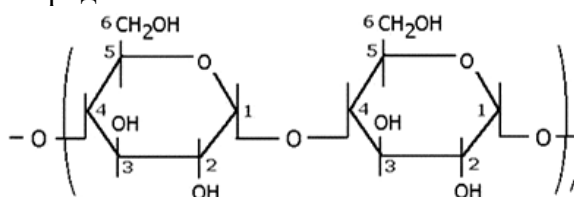
Как изменилась окраска реактивов Фелинга и Селиванова в каждой из пробирок?

6.3. РЕАКЦИИ НА ОТКРЫТИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ

В продуктах питания человека, в кормах животных углеводы представлены полисахаридами – крахмалом, гликогеном, клетчаткой, пектиновыми веществами и др. Полисахариды подразделяются на гомополисахариды (гомогликаны) и гетерополисахариды (гетерогликаны).

6.3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА

Крахмал – резервный полисахарид растений, молекула которого построена из остатков D-глюкозы, соединенных друг с другом α-глюкозидными связями, нерастворимый в воде, дающий синее окрашивание с йодом. Обычный растительный крахмал содержит два полисахарида – амилозу и амилопектин, молекулы которых построены из остатков дисахарида мальтозы.



Структурное звено амилозы - мальтоза

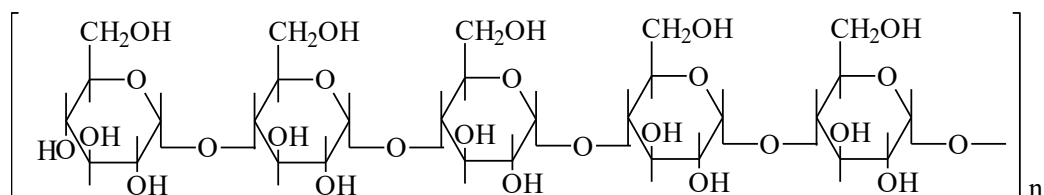
Ход работы

Очищенные клубни картофеля растереть на терке или в гомогенизаторе, полученную массу хорошо размешать в воде, затем положить в чистый полотняный мешочек (узелок) и отжать. Остаток массы в полотне вновь перемешать с водой и отжать. Повторить этот процесс несколько раз. Дать жидкости отстояться. Зерна крахмала осядут на дно стакана. Слить жидкость, а осевший крахмал вновь размешать в дистиллированной воде. Повторить операцию несколько раз до тех пор, пока крахмал не станет чистым, высушить и использовать его в последующих опытах.

6.3.2. РЕАКЦИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ С ЙОДОМ

Амилопектин - полисахарид, одна из фракций крахмала, с раствором йода в йодиде калия амилоза дает темно-синюю окраску. Йод заходит внутрь спирали амилозы и образует при этом комплексное соединение темно-синего цвета.

Раствор гликогена с йодом окрашивается от фиолетово-коричневого до фиолетово-красного цвета.



Ход работы

В одну пробирку наливают 1 мл 1% раствора крахмала, а в другую 1 мл гликогена и затем добавляют 2-3 капли разбавленного раствора йода в иодиде калия.

В пробирке с раствором крахмала появляется синее окрашивание, исчезающее при нагревании и появляющееся вновь при охлаждении.

Гликоген с раствором йода дает красно-бурое окрашивание.

6.3.3. ДЕЙСТВИЕ НА ПОЛИСАХАРИДЫ РЕАКТИВА ФЕЛИНГА

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

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

Ход работы

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

6.3.4. РЕАКЦИИ С КРАХМАЛЬНЫМ КЛЕЙСТЕРОМ

Ход работы

Около 1г сухого крахмала взбалтывают с 5-6 мл воды, выливают суспензию крахмала в 50 мл воды, нагретой до кипения в стакане или колбе. Образуется почти прозрачный, слегка опалесцирующий крахмальный клейстер.

Охладив раствор, проводят с ним следующие реакции.

1. К 1-2 мл раствора крахмала добавляют каплю раствора йода. Полученную темно-синюю жидкость нагревают. Окраска исчезает, но при охлаждении снова появляется.

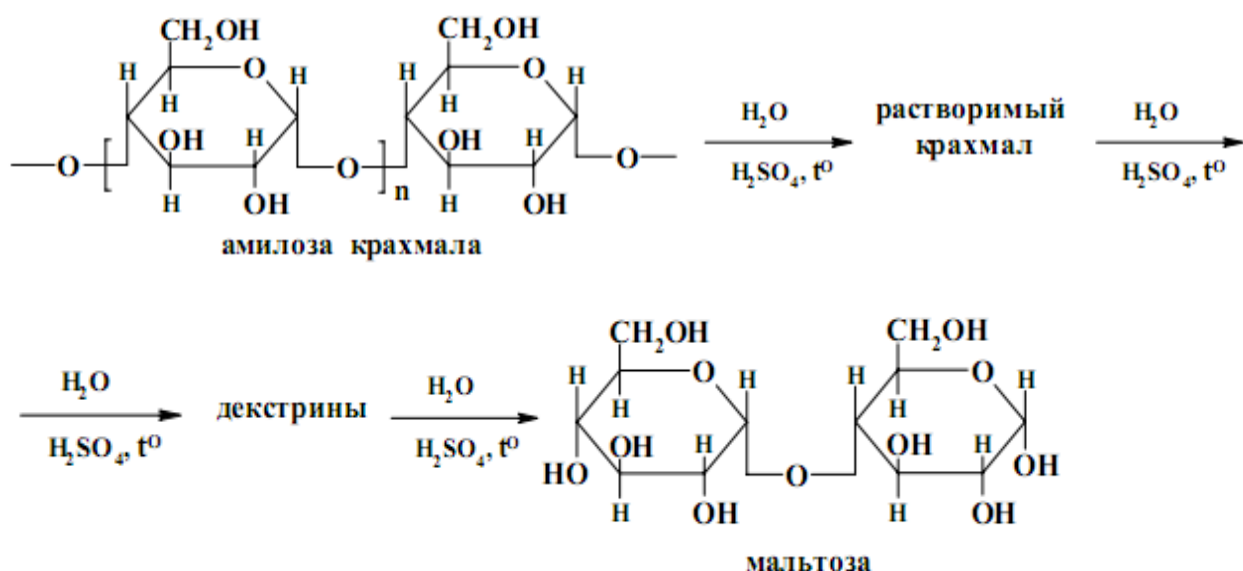
2. Другую пробу раствора крахмала (1-2 мл) смешивают с 1 мл спирта. Последующее добавление йода дает лишь слабое буроватое окрашивание.

3. К 1-2 мл крахмального клейстера добавляют несколько капель щелочи и нагревают смесь до кипения. Жидкость не обнаруживает изменений или лишь слегка желтеет.

4. К 1-2 мл клейстера добавляют несколько капель щелочи и 1-2 капли раствора сернокислой меди и нагревают смесь в кипящей воде 2-3 мин. Раствор остается почти не окрашенным, голубые хлопья нерастворившегося гидроксида меди при нагревании чернеют, красного или желтого осадка не образуется.

6.3.5. ОБРАЗОВАНИЕ ДЕКСТРИНА И ЕГО РЕАКЦИИ

Распад крахмала происходит до стадии образования декстринов. Нерасщепленный крахмал с йодом дает синее окрашивание. Декстрины, в зависимости от размера, дают с йодом различное окрашивание: амилодекстрины — фиолетовое, эритродекстрины — красно-бурое, мальтоза — желтое.



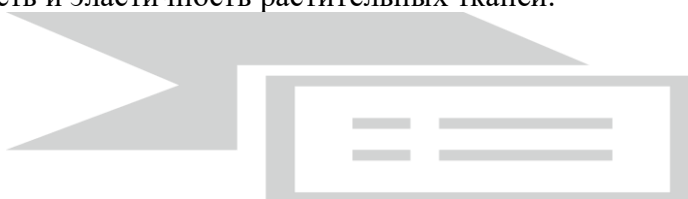
Ход работы

Около 0,5 г сухого крахмала очень осторожно, при постоянном встряхивании, нагревают в сухой пробирке на пламени горелки до начала пожелтения порошка. Дают пробирке остыть. К образовавшемуся декстрину добавляют 5-6 мл холодной воды. Смесь сильно встряхивают 1-2 мин и фильтруют. Прозрачный фильтрат делят на 4 части и проводят с ним реакции: с йодом, со спиртом, со щелочью при нагревании и с солью меди (II) в щелочном растворе при нагревании. Во всех случаях наблюдается различие между отношением крахмала и декстрина к этим реактивам.

1. Йод окрашивает раствор декстрина в бурый или красноватый цвет.
2. Спирт осаждает из водного раствора хлопья декстрина.
3. При кипячении со щелочью раствор декстрина окрашивается в ярко-желтый или коричневый цвет.
4. Окисная медь восстанавливается декстрином до закисной, и смесь при нагревании краснеет.

6.3.6. РАСТВОРЕНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В МЕДНОАММИАЧНОМ РАСТВОРЕ

Целлюлоза - клетчатка, один из самых распространённых природных полимеров (полисахарид); главная составная часть клеточных стенок растений, обуславливающая механическую прочность и эластичность растительных тканей.



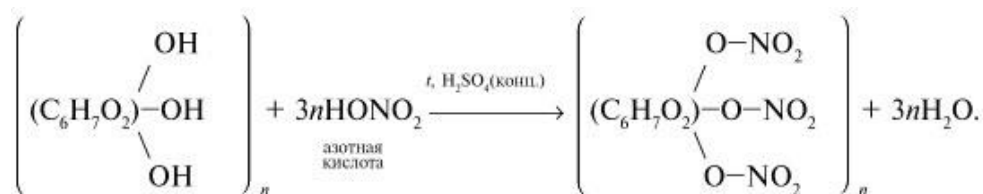
Структурной единицей целлюлозы является D- глюкопираноза, звенья которой соединены 1,4-β-гликозидными связями в линейные цепи.

Ход работы

В пробирку наливают 5 мл медно-аммиачного раствора (реактив Швейцера), опускают в него маленький кусочек целлюлозы (ваты) и тщательно перемешивают содержимое пробирки стеклянной палочкой до полного растворения целлюлозы. Получается вязкая жидкость синего цвета. Жидкость выливают тонкой струйкой в стакан (100 мл), наполненный теплой водой, подкисленной 2-3 мл концентрированной серной кислоты. Целлюлоза выделяется из раствора в виде хлопьев.

6.3.7. ПОЛУЧЕНИЕ КОЛЛОДИЯ

Для целлюлозы характерны реакции этерификации (образование сложных эфиров). Наибольшее практическое значение имеют реакции с азотной кислотой и серной.



целлюлоза

тринитроцеллюлоза

В зависимости от условий нитрования можно получить динитрат целлюлозы, который в технике называется коллоксилином. На основе коллоксилина изготавливают целлулоид.

Ход работы

В сухой цилиндр на 10 мл влить 4 мл концентрированной серной и 2 мл концентрированной азотной кислоты. Слегка разогревшуюся смесь перелить в маленький фарфоровый тигель, поместить сюда пучок ваты и с помощью палочки добиться, чтобы он весь был смочен нитрующей смесью.

Выдержать так около 10 – 20 мин, слить избыток нитрующей смеси, промыть коллоидную вату 2 -3 раза водой, каждый раз отжимая ее палочкой. Затем досуха отжать вату между двумя листами фильтровальной бумаги, вытереть тигелек, бросить туда вату и налить немного смеси спирта и концентрированной серной кислоты (2 : 1) до образования густого раствора.

Если этот раствор вылить на стекло, то после испарения растворителя образуется тонкая коллодийная пленка. Написать уравнение реакции.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Назовите углеводы продуктов питания. Роль углеводов для организма.
2. Углеводы растений, их роль.
3. Какие моносахариды вам известны. Напишите их формулы.
4. Перечислите виды изомерии моносахаридов.
5. Укажите качественные реакции на открытие альдоз и кетоз.
6. Напишите в структурном виде реакции на примере глюкозы.
7. В реакцию какого типа вступают моносахариды с аммиачным раствором оксида серебра? Является ли данная реакция качественной?
8. Наличие какой группы в молекуле моносахарида обеспечивает протекание данной реакции? Что окисляется, что восстанавливается?
9. В какой таутомерной форме моносахариды вступают в данную реакцию?
10. К какому типу окислителей относится реактив Фелинга? Ион какого металла является действующим началом реактива Фелинга?
11. В реакцию какого типа вступают моносахариды с реактивом Фелинга? Наличие какой группы в молекуле моносахарида способствует протеканию данной реакции? Что окисляется, что восстанавливается?
12. Является ли взаимодействие с реактивом Фелинга качественной реакцией? На какую функциональную группу?
13. Что является действующим началом реактива Селиванова? Расщепление каких моносахаридов идет быстрее под действием реактива Селиванова? Напишите уравнение реакции получения гидроксида меди (II).
14. Какие продукты получают при гидролизе сахарозы? Напишите уравнение реакции. Укажите значение этой реакции.
15. Приведите примеры восстанавливающих и невосстанавливающих дисахаридов.
16. В какой среде идет гидролиз дисахаридов, в частности, мальтозы? Напишите уравнение реакции.
17. Какие соединения образуются при гидролизе лактозы? Напишите уравнение реакции.
18. Что является продуктами гидролиза дисахаридов в общем случае?
19. Из каких двух фракций состоит крахмал? Биологическая роль крахмала?

20. Какие полисахариды вы знаете? Приведите формулы.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПИДОВ

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

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 (но 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.

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.

7.1. РАСТВОРЕНИЕ И ЭМУЛЬГИРОВАНИЕ ЖИРОВ

Жиры растворяются в органических растворителях и не растворяются в воде. Эмульгирование жиров (равномерное распределение в растворе) используется в технике и быту для удаления жира. В организме человека только эмульгированные жиры подвергаются действию ферментов и распадаются на более простые продукты.

Ход работы

В 5 пробирок вносят по 3 капли растительного масла и затем добавляют по 10 капель: в 1-ю пробирку — бензина, во 2-ю — бензола, в 3-ю — хлороформа, в 4-ю — диэтилового эфира, в 5-ю — этилового спирта. Пробирки встряхивают и наблюдают растворение жира во всех пробирках, кроме последней.

Результаты опыта внести в таблицу 12.

Таблица 12. Исследование растворимости липидов

№	Растворитель				
	Бензин	Бензол	Хлороформ	Диэтиловый эфир	Этиловый спирт

7.2. 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 поверхностно-активные вещества — 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 1-ю пробирку - раствора белка, во 2-ю - гидроокиси калия 10% раствор, в 3-ю - бикарбоната натрия 10% раствор, в 4-ю - мыльного раствора, в

5-ю - желчи, 6-я пробирка служит для контроля. Пробирки встряхивают. Что наблюдается? Укажите, в присутствии каких эмульгаторов получалась наиболее стойкая эмульсия.

Результаты опыта внести в таблицу 13.

Таблица 13. Исследование действия эмульгатора

№	Эмульгатор					
	Белок	Гидроокись калия	Бикарбонат натрия	Мыльный раствор	Желчь	Дистиллированная вода

7.3. 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.

Определение температуры плавления и затвердевания жира может быть выполнено в приборе, изображенном на рисунке.

Ход работы

В пробирку помешают 2—5 г жира и закрывают пробкой с двумя отверстиями. Через одно отверстие проходит термометр, шарик которого находится в жире. 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.

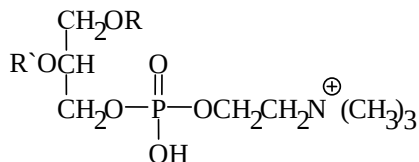
Когда масло начнет затвердевать, понижение столбика ртути вначале прекращается, затем уровень ртути немного повышается, после чего снова начинает падать. Максимальную температуру отмечают как температуру застывания масла.

Сравните температуры плавления и затвердевания нескольких видов масел или твердых жиров.

10.4. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА

10.4.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА В ЖЕЛТКЕ КУРИНОГО ЯЙЦА

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



Фосфатидилхолин

(Лецитин)

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.

7.4.2. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЛЕЦИТИН С ХЛОРИДОМ КАДМИЯ

Эту реакцию не дают растворы холестерина и растительных масел.

Ход работы

К 2—3 мл спиртового раствора лецитина, полученного в предыдущем опыте,

добавляют 1 мл насыщенного спиртового раствора хлорида кадмия. Выпадает белый хлопьевидный осадок комплексного соединения лецитина с хлоридом кадмия.

7.5. 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.

7.5.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛИНА

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

7.5.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

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

7.5.3. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИЦЕРИНА

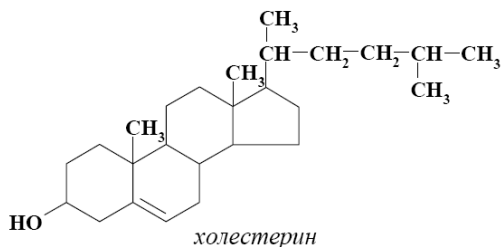
Часть сухого остатка смешивают с несколькими кристаллами KHSO₄ и нагревают. При этом ощущается резкий запах акролеина, образовавшегося из глицерина.

7.5.4. 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 кристаллический осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

7.6. ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В МОЗГУ

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



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

Ход работы

7.6.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА

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

С полученным фильтратом ставят качественные реакции.

7.6.2. РЕАКЦИЯ САЛЬКОВСКОГО

К 2–3 мл хлороформного раствора холестерина приливают 2–3 мл концентрированной серной кислоты и жидкость осторожно перемешивают. Когда

жидкость отстаивается, верхний хлороформный слой оказывается окрашенным в красный цвет, нижний - в желто-красный цвет с зеленой флуоресценцией.

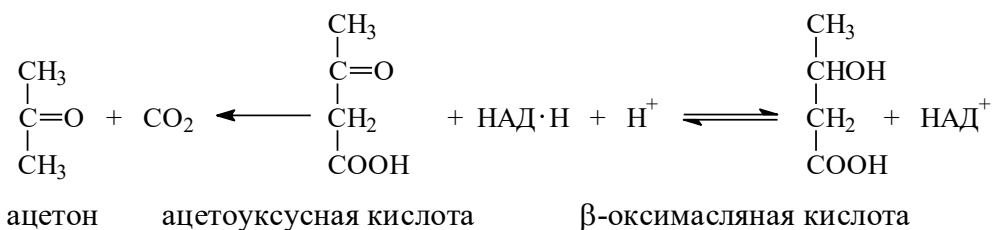
7.6.3. РЕАКЦИЯ ЛИБЕРМАННА—БУРХАРДТА

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

7.7. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА

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

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



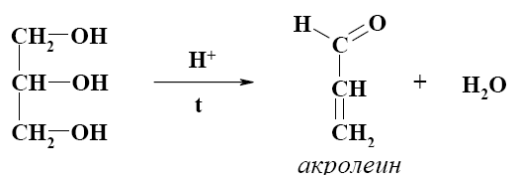
Ход работы

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

7.8. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИЦЕРИНСОДЕРЖАЩИХ ЛИПИДОВ.

АКРОЛЕИНОВАЯ ПРОБА

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



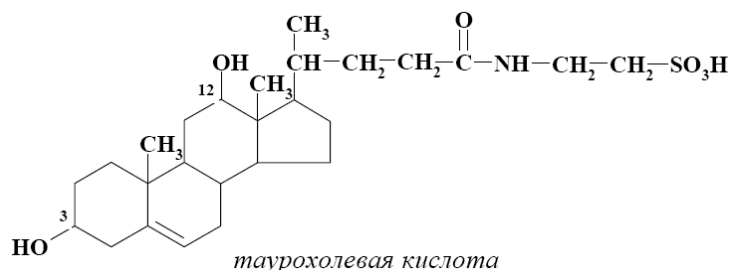
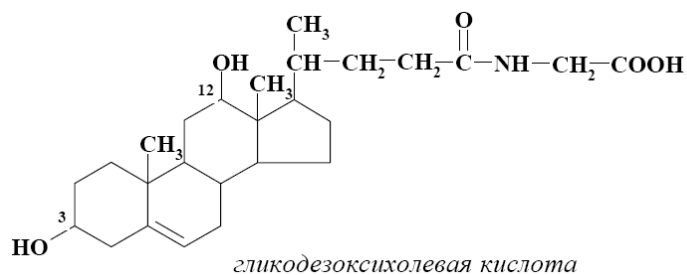
Ход работы

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

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

7.9. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ (РЕАКЦИЯ ПЕТЕНКОФФЕРА)

Желчные кислоты образуются в печени и выделяются с желчью в свободном виде или в виде парных соединений с гликоколом или таурином.



Желчные кислоты являются поверхностно-активными веществами и принимают участие в эмульгировании жиров, снижая поверхностное натяжение жировых капель, а также в активировании липазы и всасывании жирных кислот.

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

Ход работы

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

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

7.10. ОБНАРУЖЕНИЕ СТЕРОЛОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАСЛЕ

Ход работы

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

7.11. ДЕМОНСТРАЦИЯ КИСЛЫХ СВОЙСТВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

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

Ход работы

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

7.12. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ В СМЕСИ ЛИПИДОВ

Холинсодержащие фосфолипиды, имеющие четвертичный атом азота, проявляют

свойства сильных органических оснований, поэтому они способны связывать красители (бромтимоловый синий, бромфеноловый синий), имеющие отрицательный заряд за счет сульфогруппы. Образовавшийся гидрофобный комплекс экстрагируется органическими растворителями. Остальные фосфолипиды (фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, кардиолипиды), у которых нет четвертичного атома азота, с этими красителями не соединяются.

Ход работы

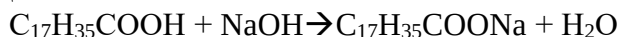
К 1 мл 0,2% раствора смеси липидов приливают 1 мл 0,1% раствора бромтимолового синего с $\text{pH}=8$, 2 мл хлороформа и перемешивают переворачиванием пробирки, не допуская образования пены, на протяжении 30 секунд. Оставляют пробирку на несколько минут для расслаивания. В присутствии холинсодержащих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

7.13. СВОЙСТВА СТЕАРИНОВОЙ КИСЛОТЫ

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

Ход работы

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



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

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

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

7.14. СТЕАРИНОВАЯ КИСЛОТА — КИСЛОТА СЛАБАЯ

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

Ход работы

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

2) В цилиндр до половины наливают воду, а затем по стенке осторожно прибавляют небольшое количество спиртового раствора мыла с фенолфталеином. В спиртовом растворе гидролиз соли не происходит и розовая окраска не наблюдается. На границе же соприкосновения спиртового раствора соли с водой появляется розовое кольцо.

7.15. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОТ В ЖИРАХ

В жирах обычно всегда содержится некоторое количество свободных жирных кислот. Количество кислот возрастает при длительном хранении жиров вследствие частичного их разложения. С разложением жиров связано их прогоркание. О количестве кислот в жире можно судить по количеству щелочи, идущей на нейтрализацию их в определенной навеске жира: по так называемому числу кислотности. Можно поставить два параллельных опыта: определение числа кислотности в свежем и прогорклom масле.

Ход работы

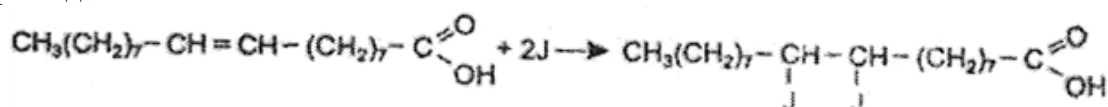
В конической колбочке растворяют 2 г животного масла в смеси 5 мл спирта и 5 мл

эфира. К раствору добавляют 2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 М раствором щелочи (добавляя его из бюретки по каплям) до появления розовой окраски, остающейся после встряхивания.

Вычисляют, сколько миллилитров раствора щелочи расходуется в том и другом случае на нейтрализацию 100 г жира. Убеждаются, что кислотное число прогорклого масла выше, чем свежего.

7.16. ОТКРЫТИЕ НЕПРЕДЕЛЬНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЙОДОМ

Непредельные жирные кислоты легко присоединяют галогены по месту двойных связей, образуя галогенпроизводные жирных кислот, что доказывается обесцвечиванием раствора йода:



Ход работы

К 15—20 каплям раствора жира в хлороформе прибавляют при взбалтывании по одной капле хлороформного раствора йода.

Вначале наблюдают обесцвечивание растворов йода вследствие присоединения галоидов по месту двойных связей молекулах жирных кислот. После насыщения всех непредельных связей дальнейшее добавление растворов йода обесцвечивания их не вызывает.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Перечислите основные свойства лецитина.
2. С помощью каких реакций можно обнаружить холестерин?
3. Объясните эмульгирующее действие липидов.
4. Определение понятия "липиды". Биологическая роль липидов.
5. На чем основана классификация липидов?
6. От чего зависит жирнокислотный состав ацилглицеринов?
7. Простые липиды - жиры, воски и стероиды, общая характеристика.
8. Сложные липиды - фосфолипиды и гликолипиды, характеристика.
9. Триглицериды и их структура и разнообразие в природе.
10. Химические свойства липидов.
11. Какое строение имеют продукты кислотного и щелочного гидролиза жира? Назовите их. В чем отличие?
12. Что такое мыло? Какие мыла Вы знаете? Напишите и подпишите на структурной формуле гидрофильную и гидрофобную части молекулы мыла.
13. Физические свойства липидов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8. ГОРМОНЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить классификацию и общие механизмы действия гормонов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

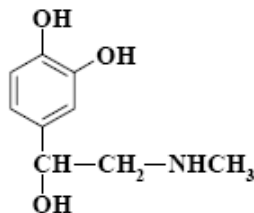
Гормоны представляют собой биологически активные, жизненно необходимые органические вещества, вырабатываемые органами (железами) внутренней секреции в незначительных количествах. По химической природе гормоны являются:

- белками (гормоны гипофиза, поджелудочной и паращитовидных желез).
- производными аминокислот (адреналин, тироксин).
- стероидами (гормоны коркового вещества, надпочечников и половые).

Биологическое значение гормонов заключается в их регулирующем действии на самые различные процессы в организме. Они поддерживают постоянство внутренней среды (гомеостаз), влияют на скорость химических реакций, физиологические функции, механизмы иммунитета, психическую деятельность, половое развитие и др.

8.1. ОБНАРУЖЕНИЕ АДРЕНАЛИНА

Адреналин, L-1-(3',4'-диоксифенил)-2-метиламиноэтанол (5) - гормон коры надпочечников. Играет большую роль в процессе передачи нервного возбуждения, влияет на сердечно-сосудистую систему (вызывает значительное повышение кровяного давления, увеличение частоты сердечных сокращений и минутного объема сердца). Усиливает гликогенолиз в мышцах и печени, что приводит к повышению уровня глюкозы в крови и увеличению образования молочной кислоты в мышцах.



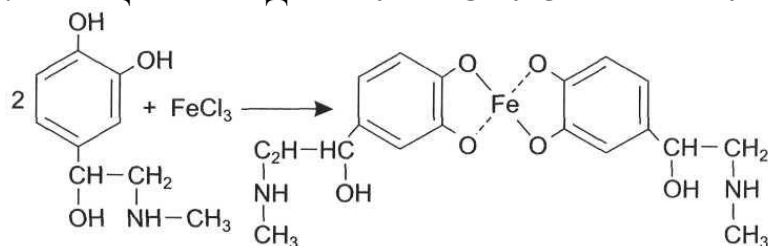
адреналин

Ход работы

8.1.1. РЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН С ЙОДАТОМ КАЛИЯ

В пробирку вносят 2-3 капли раствора адреналина (1:100), 2 капли 10% раствора KIO_3 и 2 капли 10% раствора уксусной кислоты, жидкость слегка нагревают. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

8.1.2. РЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН С ХЛОРНЫМ ЖЕЛЕЗОМ



В пробирку вносят 2-3 капли адреналина (1:100) и каплю 1% хлорного железа. Жидкость в пробирке принимает яркое изумрудно-зеленое окрашивание, постепенно переходя в желтоватое. Если к изумрудно-зеленому раствору прибавить 1 каплю концентрированного раствора аммиака, то окраска быстро переходит в зеленую и затем в коричневую.

8.1.3. ДИАЗОРЕАКЦИЯ НА АДРЕНАЛИН

При взаимодействии диазореактива с адреналином, жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

В пробирку вносят 3 капли 1% раствора сульфаниловой кислоты, 3 капли 5% раствора азотистокислого натрия, 5 капель раствора адреналина (1:100) и 3 капли 10% раствора углекислого натрия. Жидкость краснеет.

8.1.4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НИТРИТНО-МОЛИБДЕНОВОГО РЕАКТИВА

Используют нитритно-молибденовый реактив (5 г нитрита натрия и 5 г молибдата натрия растворить в 50 мл дистиллированной воды).

В пробирку наливают 1 мл водного раствора адреналина, 1 мл 5% раствора соляной кислоты, 1 мл нитритно-молибденового реактива. Смесь перемешивают. Возникает желто-оранжевое окрашивание. При добавлении нескольких капель 10% раствора едкого натра появляется малиново-красная окраска, переходящая при внесении нескольких капель концентрированной соляной кислоты в лимонно-желтую.

8.1.5. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО НАЛИЧИЯ ЯДРА ПИРОКАТЕХИНА В АДРЕНАЛИНЕ

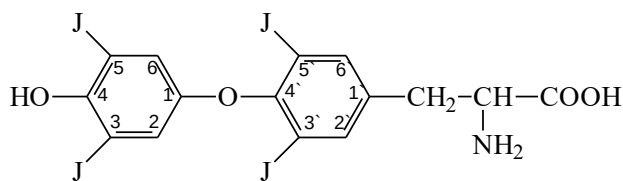
Ход работы

В одну пробирку наливают 2 мл раствора адреналина, в другую - 2 мл пирокатехина. В обе пробирки добавляют несколько капель раствора хлорида железа - в обеих появляется изумрудно-зеленое окрашивание.

8.2. РЕАКЦИЯ НА ГОРМОНЫ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

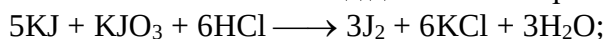
(ТИРОКСИН)

Гормон щитовидной железы.



Гипофункция щитовидной железы в раннем детском возрасте приводит к болезни, которая в литературе известна как кретинизм. При этом заболевании происходит остановка роста, резко снижается скорость обменных процессов, отмечаются глубокие нарушения психики. Недостаточная функция щитовидной железы в зрелом возрасте приводит к развитию микседемы. Заболевание характеризуется нарушением водно-солевого, основного и жирового обменов. Повышенная функция щитовидной железы вызывает развитие базедовой болезни. При этом заболевании происходит резкое повышение обмена веществ, сопровождающегося усиленным распадом тканевых белков. Наблюдается отрицательный азотистый баланс. У больных развивается общее истощение организма, а также психические расстройства.

При щелочном гидролизе тироксина образуется йодистый калий, из которого йод можно вытеснить йодноватистокислым калием. Йод дает синее окрашивание с крахмалом:



$\text{I}_2 + \text{крахмал} \longrightarrow \text{синее окрашивание}$

Ход работы

В фарфоровой ступке измельчают 5 таблеток тиреоидина. Образованную массу переносят в колбу с помощью 5 мл воды, добавляют 5 мл 10% раствора едкого калия и кипятят 15 мин на электрической печи с асбестовой сеткой. К 3 мл охлажденного гидролизата добавляют 10% раствор серной кислоты до кислой реакции по лакмусу. Затем приливают 5 капель 1 % раствора крахмала и 1 мл раствора йодата калия для окисления йодида калия. Молекулярный йод, который выделяется, дает синее окрашивание с крахмалом. Напишите уравнение реакции.

8.3. ОБНАРУЖЕНИЕ ИНСУЛИНА

Инсулин - гормон, вырабатываемой поджелудочной железой животных и человека. Он регулирует содержание сахара (глюкозы) в крови. При его недостатке развивается весьма распространенное заболевание – сахарный диабет (гипергликемия). Инсулин является главным лекарственным препаратом для лечения этого заболевания и основное его количество производится экстракцией из поджелудочной железы сельскохозяйственных животных (свиней, крупного рогатого скота). Инсулин образуется в (i-клетках островков Лангерганса из своего предшественника — проинсулина.

8.3.1.ОБНАРУЖЕНИЕ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИЕЙ

По химической природе он является белком. Полипептидные цепи соединены в двух точках дисульфидными мостиками. Инсулин дает почти все характерные цветные реакции на белок.

Ход работы

В пробирку к 5 каплям раствора инсулина прибавляют 5 капель 10% раствора едкого натра и 1 кашпо 1% раствора сернокислой меди. Перемешивают, встряхивают. Наблюдают появление фиолетового окрашивания. Объяснить механизм реакции, сделать выводы.

8.3.2.ОБНАРУЖЕНИЕ РЕАКЦИЕЙ С СУЛЬФОСАЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ

В пробирку вносят 1 мл раствора инсулина, добавляют 5 капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Наблюдают выпадение осадка белого цвета. Объяснить механизм реакции, сделать вывод.

8.3.3.ОБНАРУЖЕНИЕ РЕАКЦИЕЙ ФОЛЯ

В термостойкую пробирку вносят 5 капель раствора инсулина, 5 капель 30%

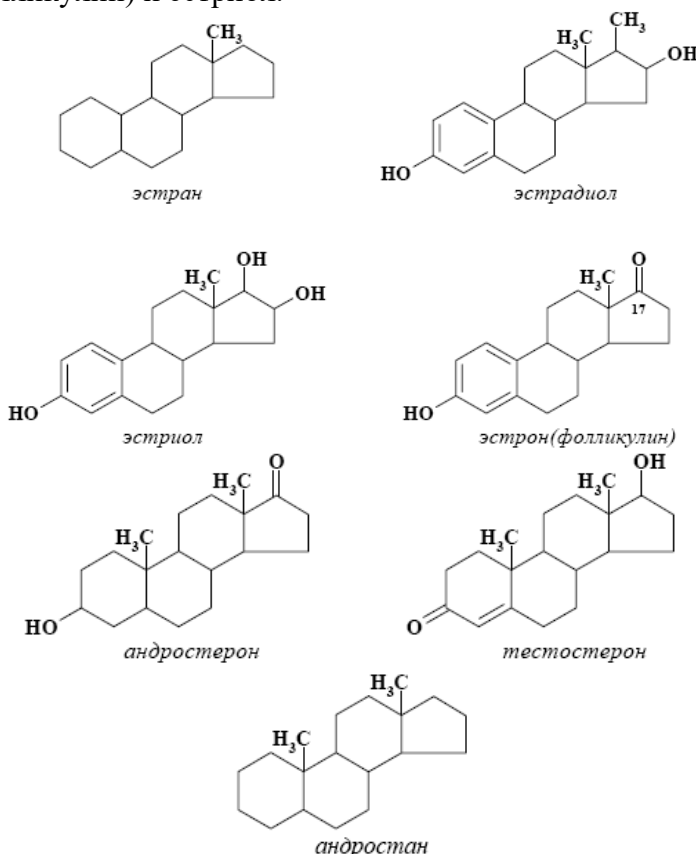
раствора едкого натра и 1-2 капли 5% раствора уксуснокислого свинца. При длительном нагревании жидкость в пробирке бурлит и выпадает черный осадок сернистого свинца. Объяснить механизм реакции, сделать вывод.

8.3.4. ОБНАРУЖЕНИЕ РЕАКЦИЕЙ ГЕЛЛЕРА

К 10 каплям концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки приливают равный объем (10 капель) раствора инсулина. Пробирку наклоняют под углом 45° так, чтобы жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей образуется белый аморфный осадок в виде небольшого кольца.

8.4. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Половые гормоны играют важную роль в обмене веществ и способствуют возникновению вторичных половых признаков. Они вырабатываются половыми железами – семенниками и яичниками. К важнейшим женским половым гормонам относятся эстрадиол, эстрон (фолликулин) и эстриол.



РЕАКЦИЯ НА ФОЛЛИКУЛИН (ЭСТРОН)

Фолликулин влияет на обмен белков, углеводов, нуклеиновых кислот, ускоряет окисление жиров в тканях и образование высокомолекулярных жирных кислот.

Ход работы

8.4.1. РЕАКЦИЯ С КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

В пробирку наливают 20-30 капель спиртового раствора фолликулина и помещают ее в кипящую баню на 5-10 минут для удаления спирта. К оставшемуся в пробирке фолликулину добавляют 20 капель концентрированной серной кислоты и пробирку вновь помещают в кипящую баню на 4-10 минут. Жидкость окрашивается в соломенно-желтый цвет, а при нагревании в оранжевый.

8.4.2. ОБРАЗОВАНИЕ ФЕНОЛЯТА ФОЛЛИКУЛИНА

В две сухие пробирки приливают по 0,5 мл раствора фолликулина. В первую добавляют 1 мл воды и отмечают образование эмульсии фолликулина. Во вторую, добавляют такое же количество 30%-ного раствора гидроксида натрия — помутнения не возникает, так как в щелочной среде происходит образование фенолята фолликулина.

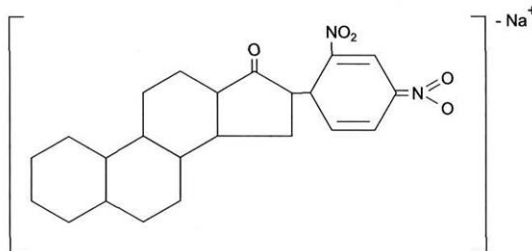
8.4.3. РЕАКЦИЯ НА ФЕНОЛЬНУЮ ГРУППУ

К 2 мл раствора фолликулина добавляют 1 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и 1 мл реактива Фолина. Возникает синее окрашивание, характерное для фенольной группы.

8.5. ГОРМОНЫ КОРКОВОГО СЛОЯ НАДПОЧЕЧНИКОВ

Кортикостероиды имеют в основе своего строения кольцо цикlopentanпергидро-фенантрена. Они синтезируются в корковом слое надпочечников из ацетилкоэнзима А (активная форма уксусной кислоты, источником которой являются как углеводы, так и липиды) или из холестерина. Важнейшим промежуточным продуктом является прогестерон. Из прогестерона образуются также женские (эстрогены) и мужские (андрогены) половые гормоны.

Основными нейтральными 17-кетостероидами, встречающимися в моче человека, являются андростерон, этиохоланолон, дегидроэпиандростерон, эпиандростерон и др.



Реакция открытия 17-кетостероидов в моче основана на способности 17-кетостероидов давать в щелочной среде с мета-динитробензолом продукт конденсации красного или красно-фиолетового цвета за счет метиленовой группы (CH_2), соседней с кетогруппой. Интенсивность окраски пропорциональна количеству находящихся в моче 17-кетостероидов.

Ход работы

1. В пробирку вносят 5 капель мочи, добавляют 5 капель 30% раствора гидроксида натрия и 5 капель 2% раствора мета-динитробензола.

2. Содержимое пробирки смешивают и оставляют стоять на несколько минут. При стоянии появляется красное окрашивание, обусловленное наличием 17-кетостероидов в моче. Сделать вывод.

8.6. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА КОРТИЗОЛ

8.6.1. С СОЛЯНОКИСЛЫМ ФЕНИЛГИДРАЗИНОМ

Благодаря наличию карбонильных групп кортизон, преднизолон, реагируя с фенилгидразином, образуют гидразон и озон.

Ход работы

К 1 мл раствора преднизолонa прибавляют 5 мл раствора фенилгидразина и нагревают на водяной бане. Через несколько минут появляется желтое окрашивание.

8.6.2. С РЕАКТИВОМ ФЕЛИНГА

Кортизон и преднизолон способны восстанавливать закись меди из солей окиси.

Ход работы

К 1 мл раствора преднизолонa прибавляют 1 мл реактива Фелинга, нагревают на спиртовке. Выпадает красный осадок закиси меди.

Результаты работы оформить в виде таблицы.

Таблица - Исследование гормонов

Название желез внутренней секреции	Гормон, выделяемый железой	Химическое строение гормона	Исследуемый материал	Реактивы	Что наблюдается	Чем обусловлена реакция

Отметить роль исследуемых гормонов в обмене веществ, проявление гипер- и гипofункции соответствующих желез внутренней секреции. В выводах сопоставить химизм проделанных качественных реакций с химической природой изучаемых гормонов

или с наличием в их молекуле характерных группировок.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Химическая природа гормонов.
2. Кто из ученых занимался изучением гормонов.
3. Применение гормонов.
4. Принцип действия гормонов. Характеристика гормонов по классам.
5. Стероидные гормоны. Примеры, значение.
6. Пептидные гормоны. Примеры, значение.
7. Прочие гормоны. Примеры, значение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9. МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА, ОПРЕДЕЛЕНИЕ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить классификацию и общие механизмы определения минеральных веществ в организме.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

Минеральные вещества поступают в организм с пищей и водой. Основную часть этих соединений составляют хлористые, сернокислые, фосфорнокислые и углекислые соли калия, натрия, магния и кальция. В небольших количествах (мг, мкг) поступают йод, бром, фтор, железо, медь, марганец, цинк, кобальт, молибден и другие микроэлементы.

Минеральные вещества в организме содержатся в двух состояниях: в виде свободных ионов и в связанной с органическими веществами форме (белками, ферментами, витаминами). Что касается микроэлементов, то все они находятся в связанном состоянии (кобальт – в витамине В₁₂, медь – в тирозиназе и церулоплазмине, цинк – в карбоангидразе, в инсулине). Минеральные вещества связываются с органическими молекулами ковалентными (йод – в тиреоглобулине, в тироксине), электростатическими (магний и кальций – с различными ферментами) и координационными связями (железо – в гемопротеидах).

9.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФАТОВ

Фосфор в организме находится в виде неорганических солей и органических соединений (фосфорные эфиры углеводов, фосфопротеины, нуклеиновые кислоты, АМФ, АДФ, АТФ, фосфолипиды и др.). Он широко участвует в обменных процессах организма – белковом, углеводном, липидном.

9.1.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКОГО ФОСФОРА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПО ВОССТАНОВЛЕНИЮ ФОСФОРНО-МОЛИБДЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Принцип метода заключается в том, что после осаждения белков сыворотки в центрифугате остается неорганический фосфор, который с молибденовой кислотой образует фосфорно-молибденовую кислоту. Последняя восстанавливается эйконогеном до синего фосфорно-молибденового комплекса. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации неорганического фосфора в сыворотке крови.

Ход работы

К 1 мл сыворотки прибавляют 4 мл дистиллированной воды, 5 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты и смешивают. Выпадает осадок белков. Через 10 минут центрифугируют при 3000 об/мин. 10 минут.

К 5 мл центрифугата добавляют 1 мл 5% раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл дистиллированной воды.

Смесь оставляют на 20 минут при комнатной температуре, затем измеряют оптическую плотность на ФЭКе против контроля при длине волны 630-690 нм (красный светофильтр) в кювете толщиной слоя 1,0 см.

Контроль готовят одновременно с опытной пробой. К 2,5 мл трихлоруксусной

кислоты приливают 2,5 мл воды, 1 мл молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена, 1,8 мл воды. Оставляют на 20 минут при комнатной температуре. Расчет производят по калибровочному графику.

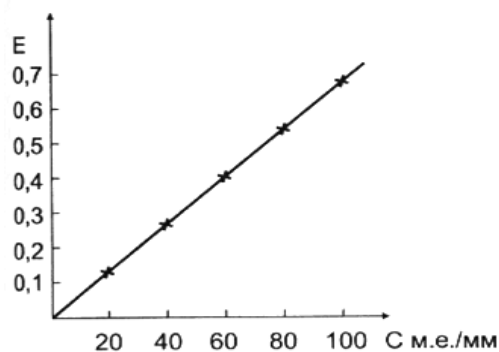
Построение калибровочного графика. Из рабочего стандартного раствора готовят разведения, как указано в таблице.

Таблица - Определение неорганического фосфора

№ пробы	Рабочий стандартный раствор, мл	Раствор трихлоруксусной кислоты, мл	Раствор молибденовокислого аммония, мл	Раствор эйконогена, мл	Дистиллированная вода, мл	Содержание фосфора в пробе	
						мг	мг%
1	0,5	2,5	1,0	0,2	3,8	0,01	2
2	1,0	2,5	1,0	0,2	3,3	0,02	4
3	2,0	2,5	1,0	0,2	2,3	0,04	8
4	3,0	2,5	1,0	0,2	1,3	0,06	12
5	4,0	2,5	1,0	0,2	0,3	0,08	16

Через 20 мин пробы измеряют как опытные против контроля. На основании полученных при фотометрировании данных строят калибровочный график на миллиметровой бумаге, откладывая на оси ординат найденные величины оптической плотности, а на оси абсцисс – соответствующие им количества фосфора.

Полученные данные содержания неорганического фосфора в сыворотке записать в таблице и сопоставить с нормальными показателями.



Калибровочный график

9.1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФАТОВ В СЛЮНЕ

2 мл слюны осаждают 2 мл 10% раствора ТХУ. Фильтруют.

К 2 мл фильтрата прибавляют 4 мл 5% раствора молибденовокислого аммония в 5 н. H_2SO_4 с добавлением 0,5% раствора аскорбиновой кислоты. Перемешивают и инкубируют в термостате при $45^\circ C$ в течение 20 мин.

Наблюдают появление синего преходящего окрашивания, и выпадение осадка желтого цвета комплексного соединения фосфорномолибденовокислого аммония. Связать обнаружение фосфатов кальция в слюне с состоянием эмали зуба.

9.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ

Кальций участвует в поддержании определенной проницаемости всех клеточных мембран, уменьшает уровень возбудимости нервных клеток (при недостатке его наступает перевозбуждение – тетания), принимает участие в свертывании крови, выполняет опорные функции, входя в состав костной ткани, активирует ряд ферментов. Всасывание кальция, поступающего с пищей, осуществляется путем связывания его со специальным белком, который находится в щеточной кайме клеток кишечного эпителия, после чего кальций транспортируется внутрь клеток. Синтез кальцийсвязывающего белка происходит в цитоплазме клеток кишечника при помощи активной формы витамина D_3 – $1,25 - (OH)_2D_3$. Метод количественного определения кальция в сыворотке крови по де Ваарду основан на осаждении кальция непосредственно из сыворотки без предварительного

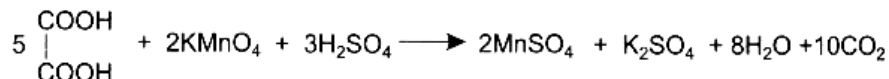
осаждения белков в виде щавелевокислого кальция:



Оксалат кальция разлагается при нагревании с серной кислотой:



Освободившаяся щавелевая кислота оттитровывается перманганатом калия:



По количеству щавелевой кислоты, определенной титрованием перманганатом калия, выясняют количество кальция, которое было с ней связано.

Ход работы

В одну центрифужную пробирку наливают 1 мл сыворотки крови и 1 мл дистиллированной воды (опытная проба), а в другую – 2 мл дистиллированной воды (контрольная проба). Эта проба служит контролем на содержание в реактивах кальция и на полноту отмывания от избытка щавелевокислого аммония.

В обе пробирки добавляют по 0,5 мл 4% раствора щавелевокислого аммония, слегка встряхивают и оставляют на 30 мин, после чего 10 мин центрифугируют. Перед центрифугированием пробирки попарно уравнивают.

Осторожно, чтобы не взмутить осадок, опрокидывают обе пробирки и сливают всю жидкость, после чего края пробирок протирают фильтровальной бумагой для полного удаления жидкости. Щавелевокислый кальций в опытной пробирке остается на дне в виде белого осадка.

Осадок щавелевокислого кальция отмывают от избытка щавелевокислого аммония и других веществ сыворотки слабым раствором аммиака (в слабощелочной среде щавелевокислый кальций нерастворим).

Для этого в обе центрифужные пробирки наливают по 2 мл 2% раствора аммиака, встряхивают и вновь центрифугируют в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, и промывание осадка производят еще 2 раза, повторяя манипуляции, описанные выше.

Сливают жидкость после последнего центрифугирования, и в обе пробирки вносят по 1 мл 1 н. раствора серной кислоты для растворения осадка щавелевокислого кальция. Осадки размешивают стеклянными палочками и, не вынимая их, помещают пробирки в нагретую водяную баню на 2 мин.

Горячий раствор титруют при помешивании из микробюретки 0,01 н. раствором перманганата до появления слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение одной минуты.

Расчет производят по формуле:

$$x = (a - b) \cdot 0,2 \cdot 100,$$

где x – количество кальция в сыворотке крови, мг%;

a – объем 0,01 н. раствора KMnO_4 , израсходованный на титрование опытной пробы, мл;

b – объем 0,01 н. раствора KMnO_4 , потраченное на титрование контрольной пробы, мл;

0,2 – количество кальция, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора перманганата, мг;

100 – коэффициент для пересчета на 100 мл сыворотки.

Если содержание кальция желательно выразить в ммоль/л, то полученное значение (x) умножают на 0,25.

Результаты определения занести в таблицу. Сопоставить полученные данные с

нормальными величинами содержания кальция в сыворотке крови.

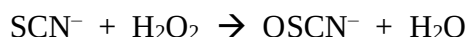
9.3. ОБНАРУЖЕНИЕ РОДАНИДОВ В СЛЮНЕ

Роданиды слюны обнаруживают по появлению красного окрашивания при добавлении к слюне хлорного железа. Это типичная и чувствительная реакция на роданиды обусловлена образованием роданистой соли трехвалентного железа в результате взаимодействия ионов Fe^{3+} и SCN^- и образования различных комплексов, имеющими состав от $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{NCS}^{2+}$ до $\text{Fe}(\text{NCS})_6^{3-}$. Некоторые органические соединения, например, соли лимонной и уксусной кислот, препятствуют образованию окраски.

Ход работы

К 5 каплям слюны добавляют 2 капли 2% раствора HCl и 2 капли 0,01% раствора FeCl_3 . Развивается красное окрашивание.

В гранулоцитах локализован фермент лактопероксидаза, которая окисляет имеющийся в слюне роданид с помощью перекиси водорода бактериального происхождения в гипотиоционат:



Гипотиоционат чрезвычайно бактерициден и совместно с H_2O_2 или ее радикалами действует антикариесогенно. Содержание роданидов велико в слюне курильщиков, что связано с поступлением в их организм синильной кислоты табачного дыма.

При составлении протокола сравните интенсивность окраски роданида железа в слюне курильщика и у некурящих табак.

9.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ И ФОСФОРА В ТКАНИ ЗУБА

В построении зуба принимают участие три вида плотных тканей: эмаль, дентин, цемент.

Неорганические вещества зубной ткани представлены главным образом гидроксиапатитом $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2$. Это малорастворимые кристаллы с высокой механической прочностью обеспечивают опорную функцию костной и зубной тканей. Находящиеся в кристаллической решетке гидроксильные ионы могут обмениваться на ионы фтора и хлора с образованием фторапатита $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{CaF}_2$ и хлорапатита $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3 \cdot \text{CaCl}_2$.

Ход работы

1. Для исследования минерального состава зуба необходимо растворить минеральные вещества (преимущественно апатиты) в соляной кислоте. Для этого навеску в 0,5 г зуба помещают в колбу и добавляют 30 мл 10% раствора соляной кислоты. Содержимое колбы кипятят на сетке под тягой.

2. Когда зуб полностью растворится, содержимое колбы охлаждают и переносят количественно в мерную колбу или цилиндр на 50 мл. Объем жидкости доводят до 50 мл, добавляя дистиллированную воду. Полученный гидролизат используют для качественного обнаружения кальция и фосфора и их количественного определения.

3. Качественная реакция на кальций. К 2 мл гидролизата приливают избыток насыщенного раствора щавелевокислого аммония до выпадения белого кристаллического осадка оксалата кальция.

4. Качественная реакция на фосфор. К 2 мл гидролизата прибавляют избыток раствора молибденовокислого аммония и нагревают. Образуется фосфорномолибденовокислый аммоний, окрашивающий жидкость в желтый цвет. При дальнейшем нагревании появляется желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

5. Количественное определение кальция. 1 мл гидролизата (содержит 0,01 г зуба) вносят в центрифужную пробирку, добавляют 3 капли индикатора метилового красного и нейтрализуют жидкость разбавленным аммиаком до появления оранжевого окрашивания.

6. Для осаждения кальция наливают 3 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония и оставляют пробирку на 30 минут, после чего осадок отделяют центрифугированием (предварительно уравновесив пробирки) и сливают надосадочную

жидкость, не взмучивая осадка.

7. Осадок промывают разбавленным аммиаком. Для этого в пробирку после удаления надосадочной жидкости приливают 5 мл разбавленного аммиака, перемешивая осадок стеклянной палочкой, и центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают описанным выше способом, осадок еще один или два раза промывают разбавленным аммиаком.

8. После последнего промывания осадок растворяют в 3 мл разбавленной серной кислоты и на водяной бане подогревают пробирку до 70°C. Горячую жидкость титруют 0,05 н. раствором марганцовокислого калия до слабо-розового цвета.

9. Параллельно ставят и обрабатывают как опыт контрольную пробу, взяв вместо 1 мл гидролизата 1 мл дистиллированной воды.

10. Содержание кальция в зубе вычисляют по формуле:

$$x = \frac{B \cdot 1 \cdot 10000}{1000},$$

где x – содержание кальция в зубе, в %;

B – объем раствора KMnO_4 , использованный на титрование опыта после вычета контроля, мл;

1 – количество мг кальция, эквивалентное 1 мл 0,05 н. раствора перманганата;

10000 – коэффициент для пересчета на 100 г зуба;

1000 – коэффициент для пересчета мг в г.

11. Количественное определение фосфора. 0,5 мл гидролизата вносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют дистиллированной воды до метки и перемешивают содержимое.

12. 5 мл разбавленного гидролизата (содержит 0,25 мг зуба) переносят в пробирку (или колбочку), прибавляют 1 мл 5% раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл дистиллированной воды.

13. Пробирку оставляют на 20 мин при комнатной температуре, затем измеряют оптическую плотность на ФЭКе против контроля при длине волны 630-690 нм (красный светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см.

14. Одновременно с опытной пробой готовят контроль. Для этого 0,3 мл 10% раствора соляной кислоты (соответствует концентрации 10% HCl в 0,5 мл гидролизата) вносят в мерную колбу на 100 мл, добавляют воды до метки и перемешивают содержимое. 5 мл жидкости отмеривают в пробирку (или колбу), добавляют 1 мл 5% раствора молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена и 1,8 мл дистиллированной воды. Оставляют стоять при комнатной температуре на 20 мин.

15. Расчет производят по калибровочному графику с учетом разведения и по формуле:

$$x = \frac{A \cdot 100}{0,25} = A \cdot 400$$

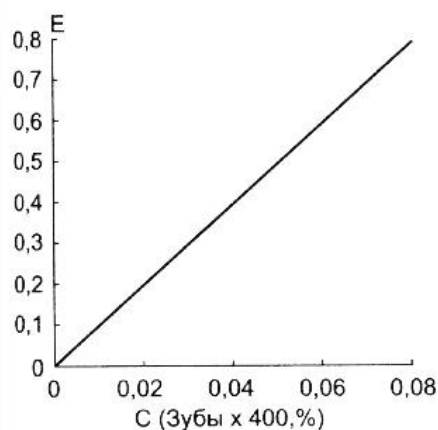
где x – содержание фосфора, %;

A – количество фосфора, найденное по калибровочному графику, мг;

0,25 – количество ткани зуба, отвечающее 5 мл разбавленного гидролизата, взятым для колориметрирования, мг;

100 – коэффициент для пересчета на 100 мг зубной ткани.

Содержание фосфора в зубе составляет около 15%.



Калибровочный график

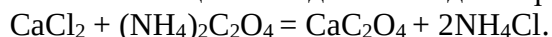
Вычислить содержание кальция и фосфора в зубной ткани и полученные данные занести в таблицу. В выводах сопоставить содержание кальция и фосфора в разных биологических объектах.

9.5. ИССЛЕДОВАНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА КОСТИ

При действии на кость соляной кислоты минеральная часть кости растворяется, остаток состоит в основном из белков. Кости заливают 5% раствором соляной кислоты и оставляют на сутки или более. Затем солянокислую вытяжку, содержащую минеральные соли, сливают, органическую часть кости (оссеин) заливают водой. Органическую часть кости, представляющую собой в основном костный коллаген, вынимают из воды, измельчают ножом и промывают длительное время водой. Затем кипятят с водой и получают, поскольку был исключен процесс золки, техническую желатину. В солянокислой вытяжке, полученной при мацерации кости, содержатся кальций, магний, железо, фосфорная кислота, калий, натрий, фтор.

9.5.1. РЕАКЦИЯ НА КАЛЬЦИЙ

Открытие кальция основано на нерастворимости щавелевокислого кальция, образующегося при воздействии на растворимые соли кальция щавелевокислым аммонием. В солянокислой вытяжке кальций находится в виде хлористого кальция

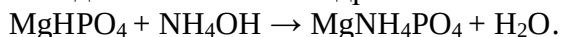


Ход работы

В пробирку с 5 мл солянокислой вытяжки приливают 2-3 мл 5% раствора щавелевокислого аммония, встряхивают и наблюдают за образованием белого осадка щавелевокислого кальция.

9.5.2. РЕАКЦИЯ НА МАГНИЙ

Открытие магния основано на образовании двойной фосфорноаммонийной магниевой соли в фильтрате после удаления кальция в виде щавелевокислой соли (CaC_2O_4 отфильтровывают). Так как магний бывает связан главным образом с фосфорной кислотой, то обычно достаточно добавить только гидрат аммония



В фильтрате после удаления кальция в виде щавелевокислого кальция (CaC_2O_4) и магния в виде фосфорноаммонийномагниевой соли (MgNH_4PO_4) открывают оставшуюся фосфорную кислоту. Для этого к фильтрату добавляют магниальную смесь, выпадает осадок (MgNH_4PO_4).

Ход работы

Наличие фосфорной кислоты в полученном осадке проверяют молибденовокислым аммонием $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$. Осадок растворяют в небольшом количестве 10% раствора азотной кислоты и нагревают с 3 мл $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$ на водяной бане. В присутствии фосфорной кислоты после охлаждения выпадает осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

9.6. ФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА В РАСТИТЕЛЬНЫХ И ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ

Для определения железа используют реакцию ионов трехвалентного железа и роданид-иона, в результате которой образуется комплексное соединение железа, окрашенное в красный цвет. Интенсивность окраски зависит от концентрации железа. Минимально определяемая концентрация железа (по А.К. Бабко) составляет 0,05 мг/л.

Ход работы

В муфельной печи озоляют 1 г сухой пробы ткани при 450-500°C. Зола в тигле обрабатывают при нагревании на песчаной бане 2 мл 20% HCl с добавлением 3-4 капель 30% H₂O₂ (пергидроля) и выпаривают почти досуха.

Остаток растворяют в 20 мл 0,2 н HCl, тщательно перемешивая раствор, переносят в пробирку и закрывают резиновой пробкой, обернутой полиэтиленом (или пластиковой).

Пипетки берут 1 мл полученного раствора в кювету фотоколориметра (объемом 2 мл), прибавляют 1 мл 5% раствора NH₄SCN, 1 каплю пергидроля и перемешивают стеклянной палочкой.

На ФЭКе измеряют оптическую плотность раствора с синим светофильтром ($\lambda = 450-500$ нм). Содержание железа рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{C_x \cdot V \cdot 1000}{100 \cdot m} = \frac{10 \cdot C_x \cdot V}{m},$$

где C_x – содержание железа, найденное по калибровочному графику, мг/100 мл;

V – объем солянокислого раствора золы, мл;

m – навеска сухой пробы, г.

При подстановке числовых значений V и m получается рабочая формула:

$$C = 200 \cdot C_x \text{ мг/кг.}$$

Для построения калибровочного графика готовят стандартный раствор, содержащий 0,1 мг железа в 1 мл раствора.

Берут 7 мерных колб на 100 мл, в каждую вносят растворы, согласно таблице 17.

Все колбы доливают до метки 0,2 н раствором HCl и хорошо перемешивают.

В кювету ФЭКа толщиной 5 мм берут 1 мл из колбы с калибровочным раствором, 1 мл 5% раствора NH₄SCN, 1 каплю пергидроля, перемешивают стеклянной палочкой и измеряют оптическую плотность с синим светофильтром ($\lambda = 450-500$ нм).

Таблица - Шкала стандартных растворов

	Номер колбы						
	1	2	3	4	5	6	7
Объем стандартного раствора, мл	1	5	10	15	20	25	30
Содержание железа в 100 мл, C_x	0,1	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Роль минеральных веществ для организма человека.
2. Какие элементы относят к макроэлементам.
3. Какие элементы относят к микроэлементам.
4. Какие элементы относят к ультрамикроэлементам.
5. Способы определения минеральных веществ.
6. Регуляция водно-солевого обмена.

**Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения
дисциплины (модуля)**

Перечень основной литературы

1. Любимова Н.В., Бабкина И.В.; Тимофеев Ю.С. Проведение биохимических исследований –учебник. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2024. – 256 с.
2. Базовый курс биохимии // Под ред. А.И. Глухова, А.Е. Губаревой. - Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. – 584 с.
3. Лелевич, С. В. Клиническая биохимия: — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2020. — 304 с. — ISBN 978-5-8114-5146-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/133476>

Перечень дополнительной литературы

1. Клиническая лабораторная диагностика: сборник ситуационных задач: учебное пособие / Е. Г. Бутолин, В. Г. Иванов, М. В. Терещенко, В. В. Максимова. — 2-е изд. стер. — Санкт-Петербург: Лань, 2024. — 108 с. — ISBN 978-5-507-47622-0. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/398480>
2. Биохимия: учебное пособие / А. В. Стрыгин, Б. Е. Толкачев, А. М. Доценко, Е. И. Морковин. — Волгоград : ВолгГМУ, 2022. — 132 с. — ISBN 978-5-9652-0820-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/338252>
3. Клиническая биохимия: учебное пособие / Т. П. Бондарь, К. С. Светлицкий, Н. И. Ковалевич [и др.]. — Ставрополь: СтГМУ, 2020. — 204 с. — ISBN 978-5-89822-635-0. — Текст: электронный // Лань: электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/216803>
4. Биохимические исследования в клинической практике: Руководство для врачей / А.А. Кишкун. — М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2014. — 528 с.: ил.
5. Основы биохимического анализа: лабораторный практикум : учебное пособие / составители О. С. Котлярова, С. М. Чыдым. — Новосибирск : НГАУ, 2020. — 77 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/257708>
6. Лелевич, С. В. Теория и практика лабораторных биохимических исследований : учебное пособие для спо / С. В. Лелевич. — 4-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 304 с. — ISBN 978-5-507-50169-4. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/414779>
7. Сборник ситуационных задач по клинической лабораторной диагностике : учебное пособие / О. С. Абрамовских, И. В. Батигова, И. А. Лаптева [и др.]. — Челябинск : ЮУГМУ, 2023. — 101 с. — ISBN 978-5-94507-261-9. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/442340>
8. Карпенко, Л. Ю. Биологическая химия : учебное пособие / Л. Ю. Карпенко, А. А. Бахта, А. И. Козицына. — Санкт-Петербург : СПбГУВМ, 2022. — 228 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/366575>
9. Кузнецов, О. Е. Лабораторные исследования в клинике : учебное пособие для спо / О. Е. Кузнецов, С. А. Ляликов. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 500 с. — ISBN 978-5-507-51527-1. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/422633>

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 и молекулярная биология»
для студентов направления подготовки
44.03.05 Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки)

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.

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 выносятся 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 : ВолГМУ, 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>