

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. Биохимия полости рта» для студентов
специальности 31.05.03 Стоматология

Введение

«Биохимия. Биохимия полости рта» 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 «Биохимия. Биохимия полости рта» является изучение основных химических превращений, лежащих в основе жизнедеятельности, с участием биокатализаторов (ферментов), осуществляющих быстро, специфично и организованно во времени и пространстве эти химические превращения.

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

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

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

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1. АМИНОКИСЛОТЫ, СВОЙСТВА, КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

2.1. БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ (РЕАКЦИЯ ПИОТРОВСКОГО)

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

Белки дают сине-фиолетовое окрашивание; продукты их гидролиза – красную или розовую окраску. Биуретовая реакция обусловлена присутствием в молекуле или двух — $\text{CO}-\text{NH}$ -групп или одной — $\text{CO}-\text{NH}$ -группы или — CH_2-NH - групп, связанных непосредственно между собой или посредством атома углерода или азота. Биуретовую реакцию дают пептиды, содержащие минимум три остатка аминокислот.

2.1.1. ОБНАРУЖЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ

Ход работы

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

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

Результаты всех реакций вносят в табл.

Таблица Биуретовая реакция на белки и аминокислоты

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

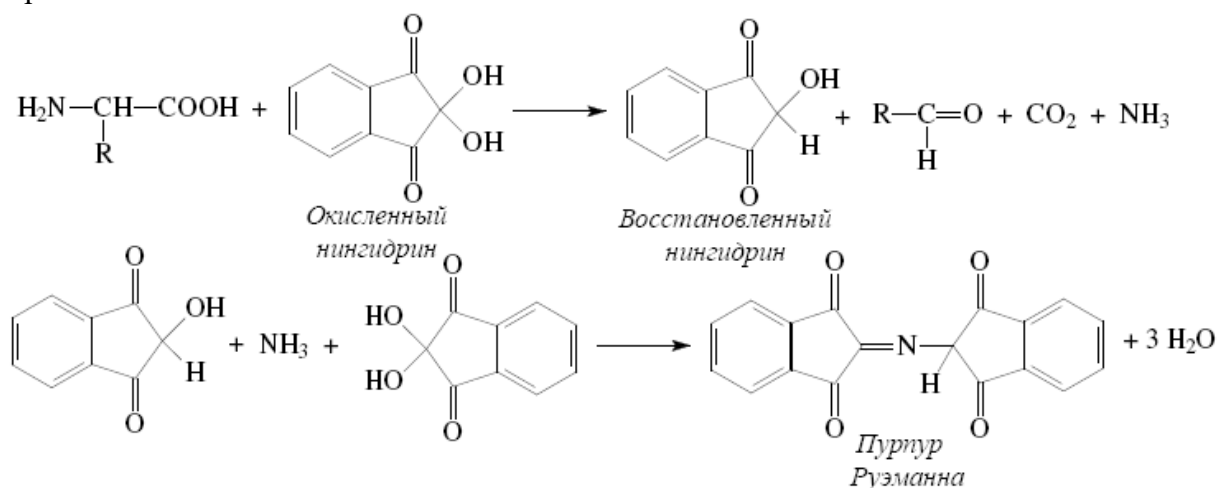
2.1.2. ОБНАРУЖЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПЕПТИДНЫХ СВЯЗЕЙ В МОЛЕКУЛЕ ГРАМИЦИДИНА

Ход работы

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

2.2. НИНГИДРИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (РЕАКЦИЯ РУЭМАННА)

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



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

2.3. КСАНТОПРОТЕИНОВАЯ РЕАКЦИЯ (МУЛЬДЕРА)

(на тирозин, триптофан, фенилаланин)

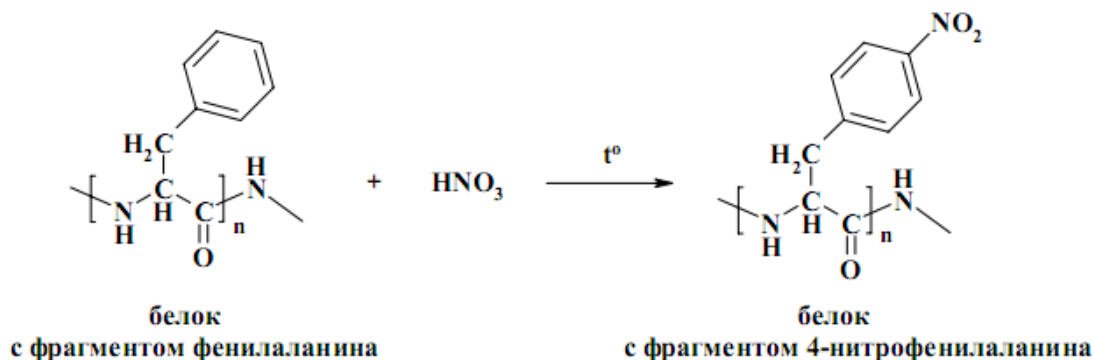
Если смешать раствор белка с концентрированной азотной кислотой, то выпадает осадок белка, который при нагревании смеси частью растворяется с образованием желто окрашенного раствора (греческое «Ксантос» – желтый). При этом происходит образование нитросоединений триптофана и тирозина. Если далее к полученному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



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

с сухими препаратами белка.

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

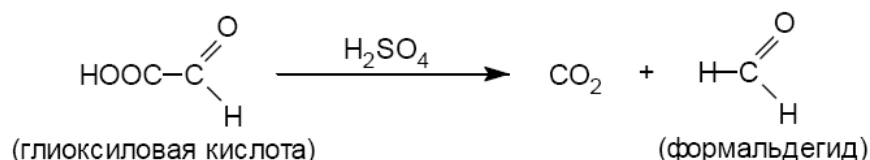


Ход работы

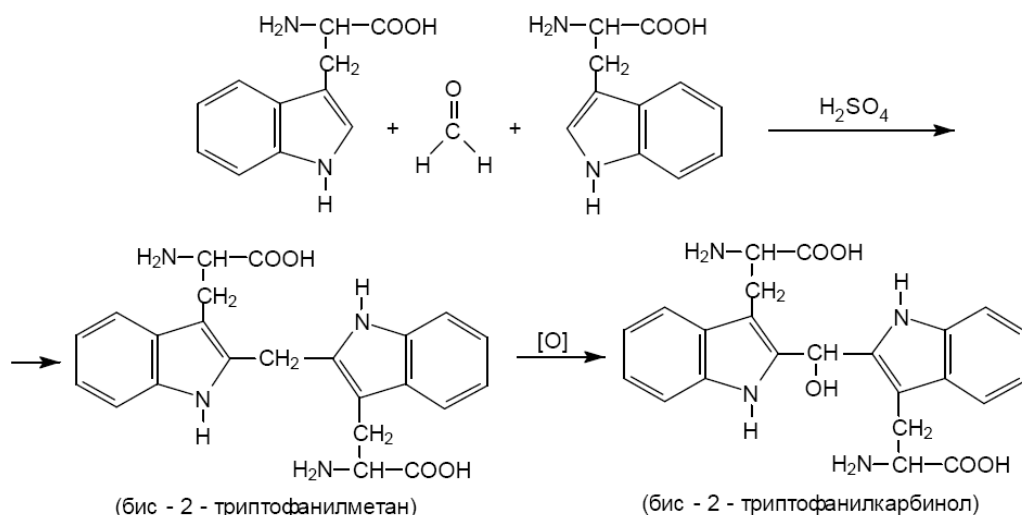
К 1 мл раствора белка добавляют 0,2-0,3 мл концентрированной азотной кислоты, появляется белый осадок или раствор мутнеет. Затем нагревают смесь на горелке до кипения и поддерживают его в течение 1-2 мин. При этом раствор и осадок окрашиваются в ярко-желтый цвет. При кипячении выделившийся осадок может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

2.4. РЕАКЦИЯ АДАМКЕВИЧА

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



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



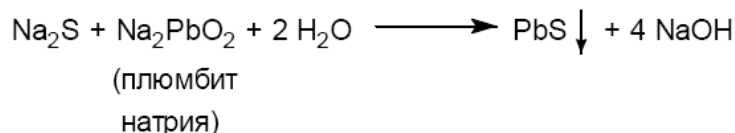
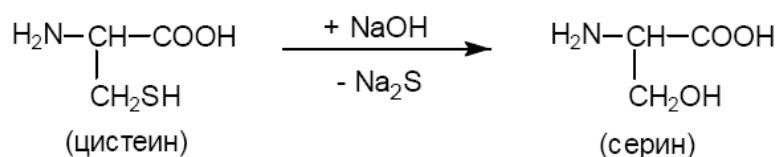
Ход работы

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

2.5. РЕАКЦИЯ НА ЦИСТЕИН (РЕАКЦИЯ ФОЛЯ)

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

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



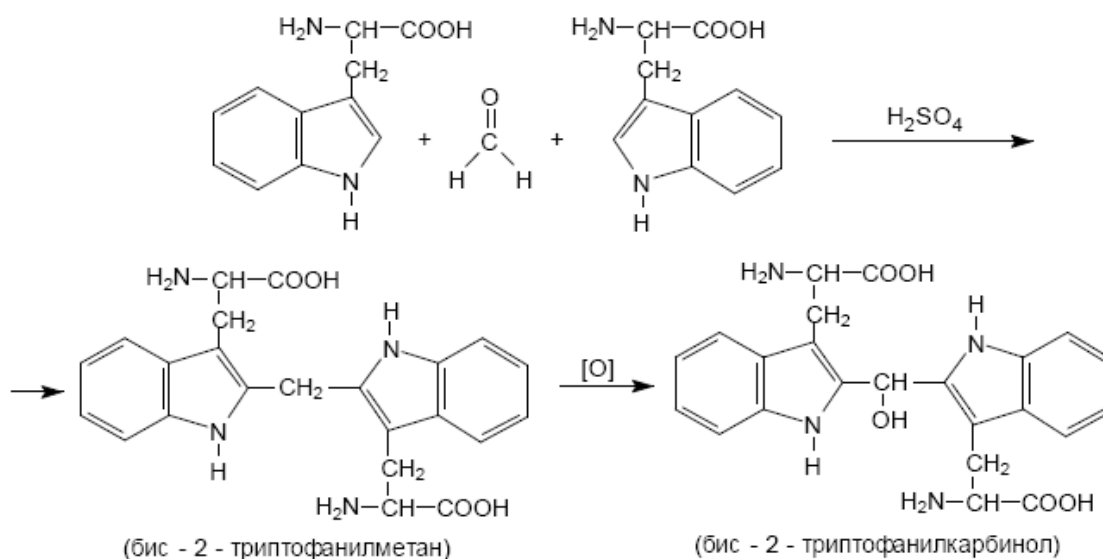
Ход работы

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

2.6. РЕАКЦИЯ ВАУЗЕНЕ (НА ТРИПТОФАН)

Белки, содержащие триптофан, дают в кислой среде в присутствии нитрита натрия и

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



Ход работы

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

2.7. РЕАКЦИЯ С ФОРМАЛЬДЕГИДОМ

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

2.8. РЕАКЦИЯ ШУЛЬЦЕ-РАСПАЙЛЯ

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

Ход работы

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

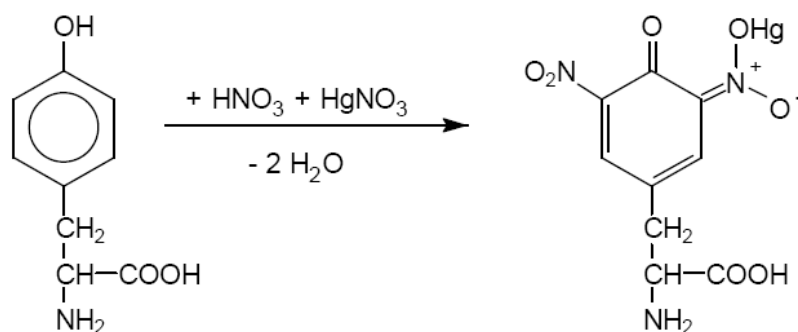
Легким встряхиванием пробирки смешивают обе жидкости. Вследствие выделения тепла при растворении H₂SO₄ в воде происходит саморазогревание жидкости на месте соприкосновения обоих слоев и появляется вишнево-красное окрашивание. Необходимо следить, чтобы жидкость не перегрелась выше 70 °С, так как иначе под влиянием H₂SO₄

происходит обугливание органического вещества и раствор буреет.

2.9. РЕАКЦИЯ МИЛЛОНА

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

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



Ход работы

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

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

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

2.10. РЕАКЦИЯ ПАУЛИ (НА ГИСТИДИН И ТИРОЗИН)

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

Ход работы

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

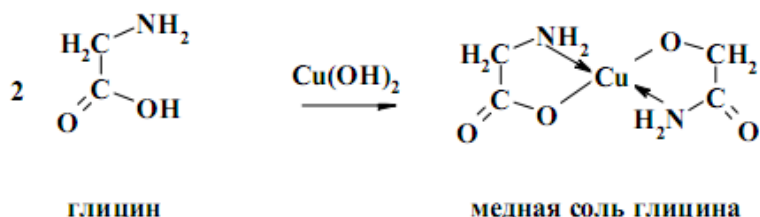
2.11. РЕАКЦИИ АМИНОКИСЛОТ С АЗОТИСТОЙ КИСЛОТОЙ (ПРОБА ГЕЛЛЕРА)

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

Ход работы

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

2.12. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АМИНОКИСЛОТ С СОЛЯМИ МЕДИ (II)



группы:

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

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

1. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА ПРИ НАГРЕВАНИИ

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

Ход работы

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

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

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

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

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

Таблица Осаждение белка при нагревании

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

2. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА КОНЦЕНТРИРОВАННЫМИ МИНЕРАЛЬНЫМИ КИСЛОТАМИ

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

других причин (денатурацией, образованием солей).

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

Ход работы

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

3. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА ОРГАНИЧЕСКИМИ КИСЛОТАМИ

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

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

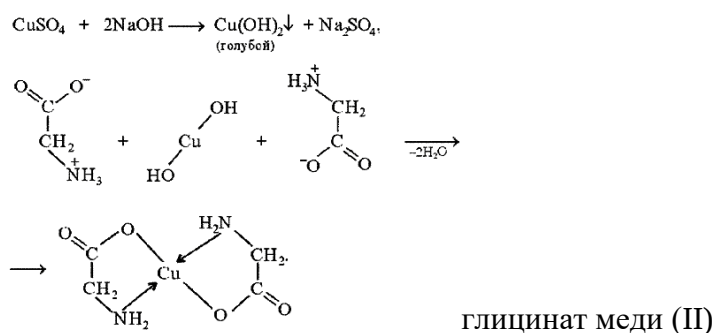
Ход работы

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

4. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

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

Со свежеприготовленным гидроксидом меди (II) все 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.

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

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

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

6. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКА РЕАКТИВАМИ НА АЛКАЛОИДЫ

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

Ход работы

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

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

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

7. ГОРЕНИЕ КАК СПОСОБ РАСПОЗНАВАНИЯ БЕЛКОВЫХ МАТЕРИАЛОВ

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

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

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

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

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

Практическая значимость

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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



6.1. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ

Дрожжи богаты нуклеопротейдами рибозного типа. Нуклеопротейд 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 нуклеопротейда. Осадок нуклеопротейда собирают путем повторного центрифугирования и используют для качественной реакции.

6.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВНЫХ ЧАСТЕЙ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ

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

Ход работы

6.2.1. ПОЛИПЕПТИДЫ ОТКРЫВАЮТ БИУРЕТОВОЙ РЕАКЦИЕЙ

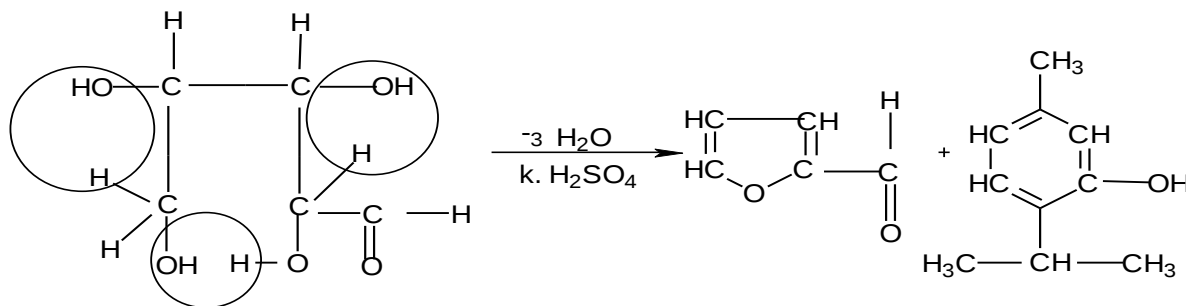
К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 10 капель гидроксид натрия и 2 капли раствора сульфата меди. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

6.2.2. УГЛЕВОДЫ (РИБОЗУ И ДЕЗОКСИРИБОЗУ) ОПРЕДЕЛЯЮТ ФЕЛИНГОВОЙ ПРОБОЙ

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

6.2.3. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ МОЛИША НА ПЕНТОЗУ

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



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

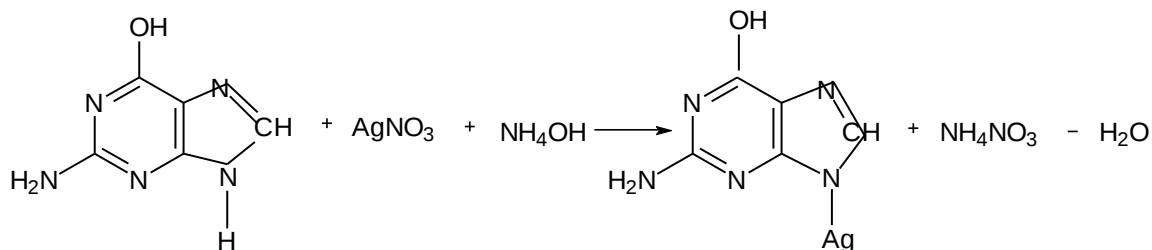
встряхивании на дне пробирки появляется красное окрашивание.

6.2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

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

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

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



6.3. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК ИЗ РАСТЕНИЙ

Для выделения растительного ДНК можно взять зелёный горошек или лук.

Ход работы

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

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

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

Деревянной палочкой выловите их и рассмотрите под микроскопом.

6.4. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

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

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

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

Ход работы

Навеску ткани (5–500 мг) заливают точно отмеренным количеством (5–10 мл) 0,5 н. хлорной кислоты (HClO₄) и нагревают в кипящей водяной бане 20 мин. После охлаждения и центрифугирования надосадочную жидкость используют для измерения поглощения в ультрафиолете на спектрофотометре СФ-4 непосредственно (в случае малых количеств определяемого вещества) или после соответствующего разведения в 0,5 н. хлорной кислоты.

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

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

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

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

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

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

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

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

Ход работы

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

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

Расчет содержания нуклеиновых кислот в крови производят по формуле:

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

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

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

Г – объем раствора крови с хлорной кислотой;

В – объем крови, взятой для исследования;

10,3 – коэффициент пересчета на количество нуклеиновых кислот;

100 – коэффициент пересчета в процентах.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4. ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

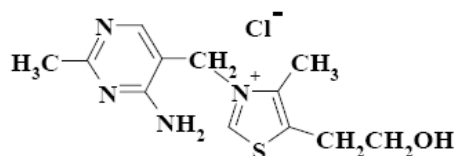
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить знания о строении и биологической роли водорастворимых витаминов. Научиться определять присутствие витаминов в биологических материалах при помощи качественных цветных реакций.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

7.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИАМИНА (ВИТАМИН В₁)

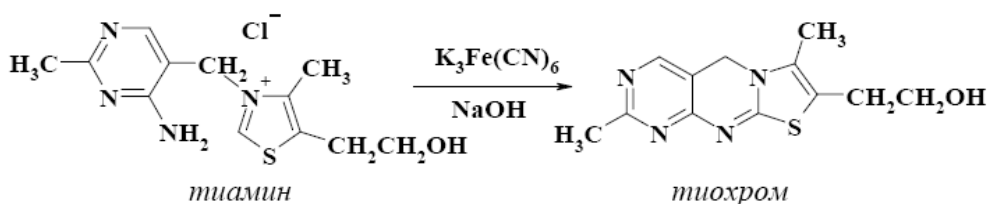
Тиамин (витамин В₁) - водорастворимый витамин. Наряду с аминогруппой витамин В₁ содержит атом серы, и поэтому он получил название тиамин. В химической структуре его содержится два кольца: пиримидиновое и тиазоловое, соединенные метиленовой (-CH₂) группой.



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

7.1.1. РЕАКЦИЯ ОКИСЛЕНИЯ

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



Ход работы

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

7.1.2. ДИАЗОРЕАКЦИЯ

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

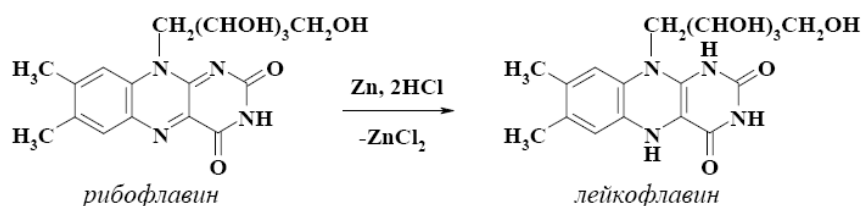
Ход работы

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

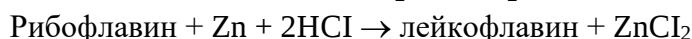
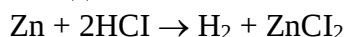
7.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РИБОФЛАВИНА (ВИТАМИН В₂)

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

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



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



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

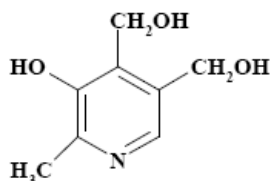
Ход работы

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

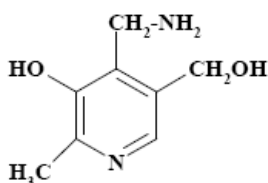
метиленовой сини - до синего или зеленоватого окрашивания раствора. Внести в пробирку кусочек цинка и 2-3 капли концентрированной соляной кислоты (начинается выделение пузырьков водорода). Отметить окраску через 10-15 минут.

7.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРИДОКСИНА (ВИТАМИН В₆)

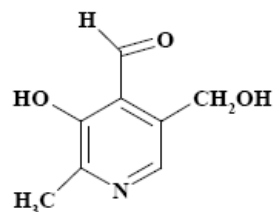
Пиридоксин - витамин В₆. Пиридоксаль (витамин В₆) - альдегидное производное пиридоксина. В виде фосфорного эфира - пиридоксальфосфата - входит в состав ряда ферментов, катализирующих реакции переаминирования и декарбоксилирования α-аминокислот. Термин "витамин В₆" применяется ко всем трем производным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



(пиридоксин)



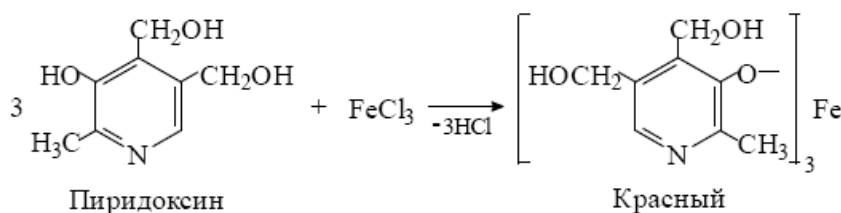
(пиридоксамин)



(пиридоксаль)

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

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



Ход работы

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

7.4. РЕАКЦИЯ НА ЦИАНОКОБАЛАМИН (ВИТАМИН В₁₂)

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

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

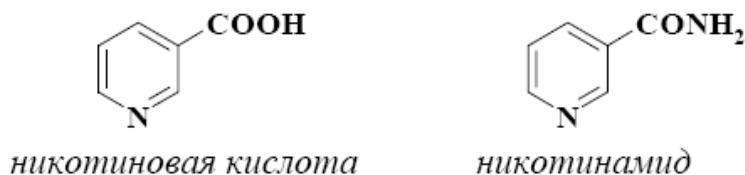
Ход работы

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

7.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ (ВИТАМИН РР)

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

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



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

7.5.1. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА НИКОТИНОВУЮ КИСЛОТУ С УКСУСНОКИСЛОЙ МЕДЬЮ

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

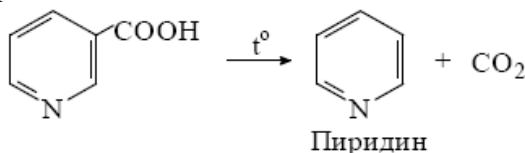
Ход работы

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

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

7.5.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ПИРИДИНОВОГО КОЛЬЦА В МОЛЕКУЛЕ ВИТАМИНА РР

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



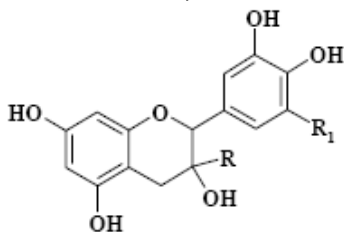
Ход работы

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

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

7.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА (ВИТАМИН Р)

Известно несколько соединений, обладающих Р-витаминной активностью.



R и R₁ – H или OH

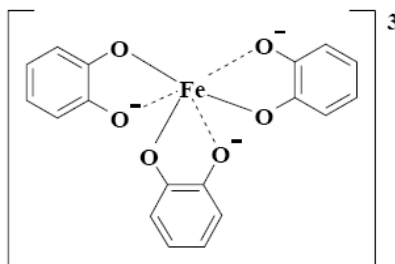
Витамин Р (цитрин)

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

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

7.6.1. РЕАКЦИЯ С ХЛОРИДОМ ЖЕЛЕЗА

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



Ход работы

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

2) Налейте в пробирку 1 мл чайной заварки (в ней содержится витамин Р) и добавьте к ней 5 капель водного раствора хлорного железа FeCl_3 . Осторожно встряхните пробирку и разбавьте полученный раствор, добавив 2 мл дистиллированной воды. Как изменяется окраска раствора?

7.6.2. РЕАКЦИЯ С СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

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

Ход работы

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

7.6.3. РЕАКЦИЯ С РЕАКТИВОМ ФЕЛИНГА

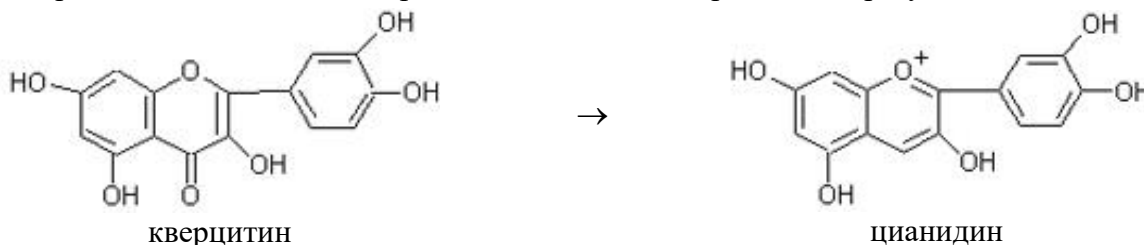
При кислотном гидролизе рутина отщепляется молекула рутинозы, которая распадается на глюкозу и рамнозу, обладающих восстанавливающими свойствами.

Ход работы

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

7.6.4. РЕАКЦИЯ С МАГНИЕМ И СОЛЯНОЙ КИСЛОТОЙ

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



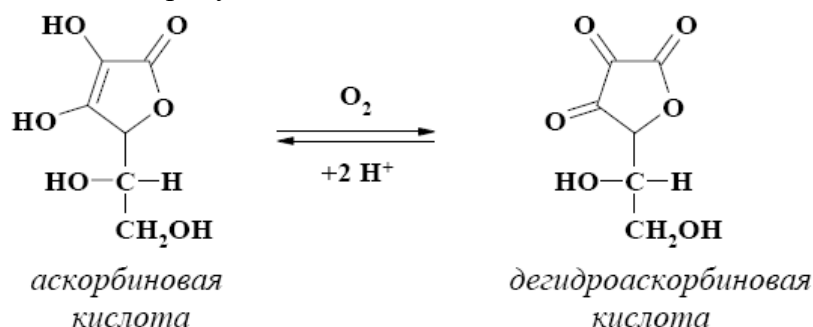
К 1 мл насыщенного спиртового раствора кверцетина на кончике скальпеля добавляют порошок металлического магния и 3-4 капли концентрированной соляной кислоты. Жидкость сначала окрашивается в розовый цвет, при стоянии интенсивность окраски усиливается.

7.7. КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

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

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

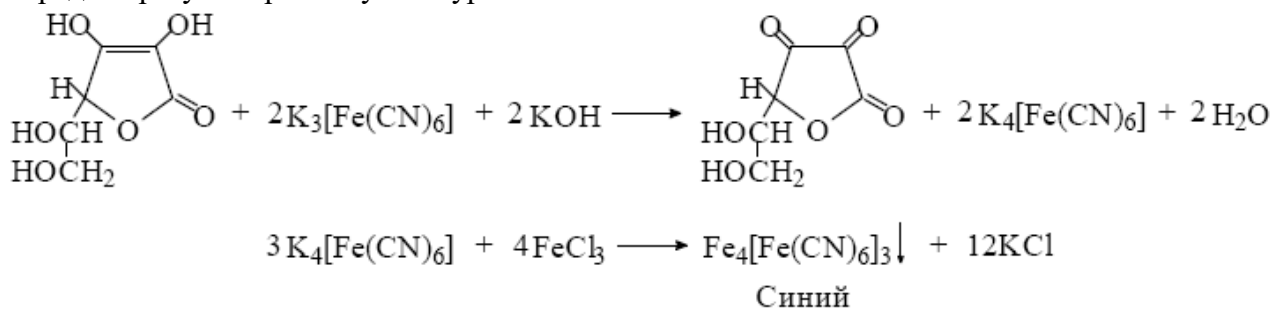
повышается хрупкость сосудов, возникают кровоизлияния, повреждаются кости особенно зубы. Суточная потребность в аскорбиновой кислоте взрослого человека при средних затратах физического труда — 50 мг. Богаты витамином С лимоны, черная смородина, шиповник, хвоя, из животных продуктов — печень.



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

7.7.1. РЕАКЦИЯ С ЖЕЛЕЗОСИНЕРОДИСТЫМ КАЛИЕМ

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



Ход работы

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

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

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

7.7.2. РЕАКЦИЯ С МЕТИЛЕНОВОЙ СИНЬЮ

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

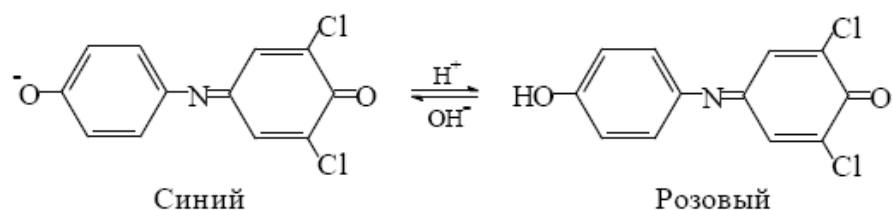
Ход работы

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

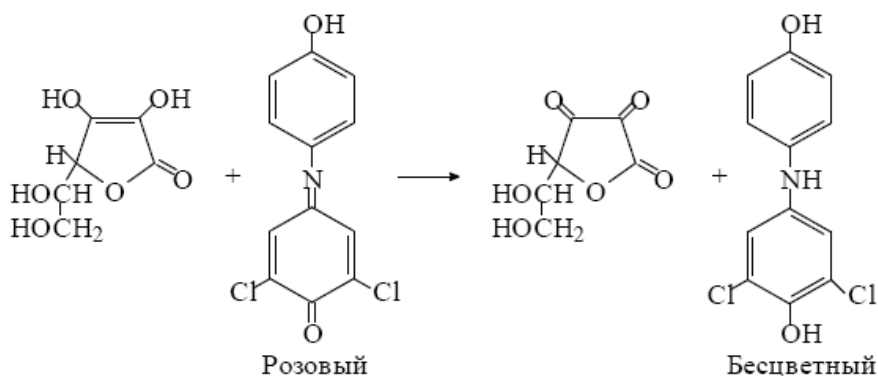
Для контроля проделывают ту же реакцию, беря вместо вытяжки из шиповника дистиллированную воду. Обесцвечивания жидкости не происходит.

7.7.3. РЕАКЦИЯ С 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛОМ

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



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

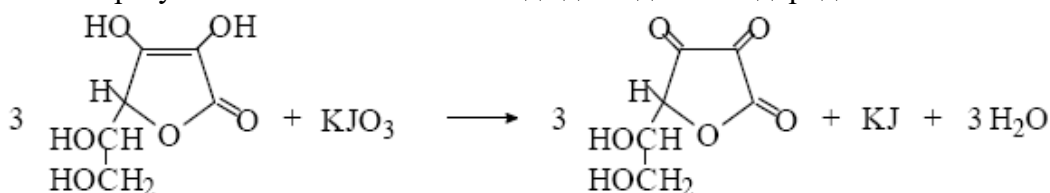


Ход работы

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

7.7.4. РЕАКЦИЯ С РАСТВОРОМ ЛЮГОЛЯ

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

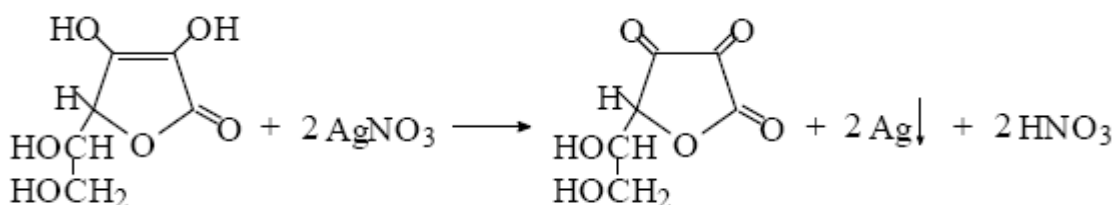


Ход работы

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

7.7.5. СЕРЕБРЯНАЯ ПРОБА НА ВИТАМИН С

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



Ход работы

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

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица Результаты лабораторной работы

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5.

ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ

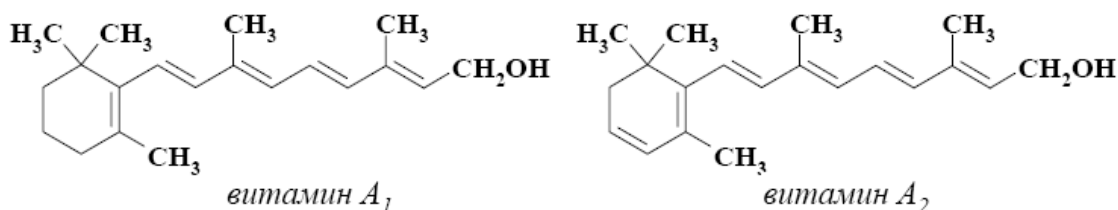
ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Закрепить знания о строении и биологической роли жирорастворимых витаминов. Научиться определять присутствие витаминов в биологических материалах при помощи качественных реакций.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

8.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕТИНОЛА (ВИТАМИН А)

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



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

Ход работы

8.1.1. РЕАКЦИЯ С ТРЕХХЛОРИСТОЙ СУРЬМОЙ

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

8.1.2. РЕАКЦИЯ ДРУММОНДА С КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

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

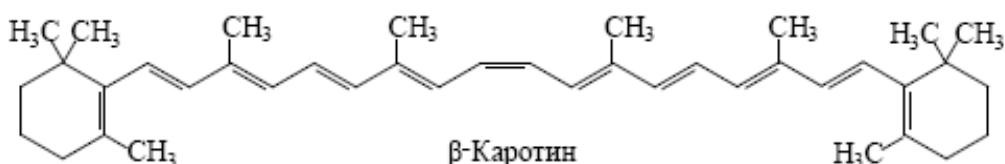
8.1.3. РЕАКЦИЯ С СУЛЬФАТОМ ЖЕЛЕЗА (II)

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

8.2. ОБНАРУЖЕНИЕ КАРОТИНА В ШИПОВНИКЕ

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

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



Ход работы

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

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

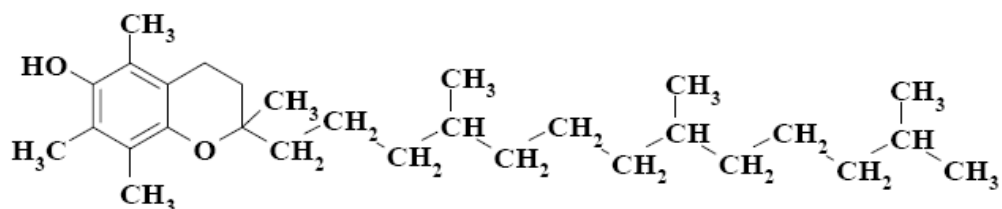
3. В сухой пробирке к нескольким каплям хлороформной вытяжки, содержащей каротин, добавляют около 20 капель раствора хлористой сурьмы в хлороформе. Появляется голубая окраска, которая даже при длительном стоянии не переходит в розово-фиолетовую.

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

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

8.3. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА α-ТОКОФЕРОЛ

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



α-токоферол

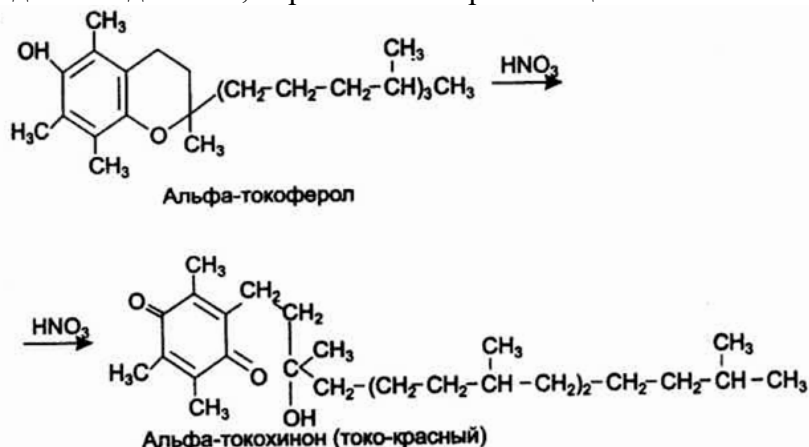
Наиболее богаты витамином Е масла из зародышей пшеницы, семян яблок, шиповника, из облепихи, кукурузы, сои. Он содержится в семенах злаков, в мясе, жире, печени, в яичном желтке, масле, молоке. Для усвоения организмом витамина Е необходимо наличие желчи в кишечном содержимом.

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

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

8.3.1. РЕАКЦИЯ С АЗОТНОЙ КИСЛОТОЙ

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



Ход работы

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

8.3.2. РЕАКЦИЯ С ХЛОРНЫМ ЖЕЛЕЗОМ

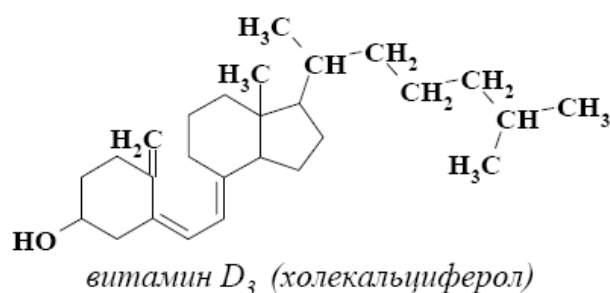
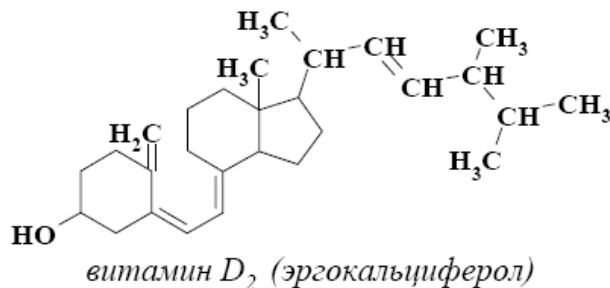
Ход работы

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

8.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИФЕРОЛА (ВИТАМИН D)

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

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



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

8.4.1. РЕАКЦИЯ С АНИЛИНОМ

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

8.4.2. РЕАКЦИЯ С БРОМОМ

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

8.4.3. РЕАКЦИЯ С УКСУСНЫМ АНГИДРИДОМ И СЕРНОЙ КИСЛОТОЙ

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

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

8.5. КАЧЕСТВЕННОЕ ОТКРЫТИЕ ФИЛЛОХИНОНА

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

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

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

8.5.1. РЕАКЦИЯ С ДИЭТИЛДИТИОКАРБАМАТОМ

Ход работы

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

Содержимое пробирки встряхивают. Постепенно появляется окраска.

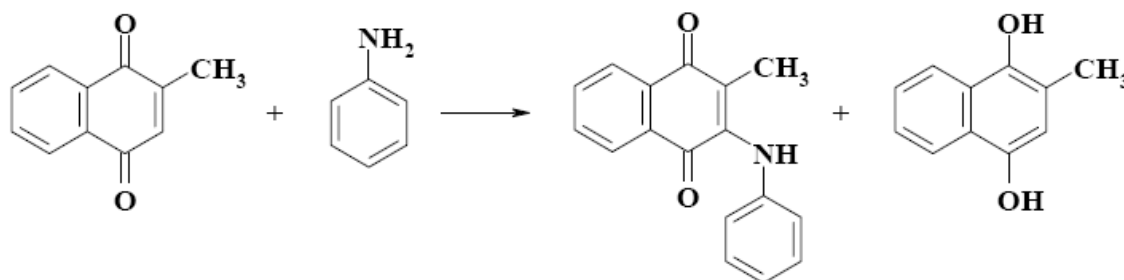
8.5.2. РЕАКЦИЯ СО ЩЕЛОЧНЫМ РАСТВОРОМ ЦИСТЕИНА

Ход работы

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

8.5.3. РЕАКЦИЯ С АНИЛИНОМ

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



Ход работы

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

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

Результаты лабораторной работы оформить в виде таблицы.

Таблица - Результаты лабораторной работы

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

ЗНАЕТЕ ЛИ ВЫ ЧТО

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

потребность.

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

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

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6. ФЕРМЕНТЫ

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

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

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

10.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ПО МЕТОДУ ВОЛЬГЕМУТА

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

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

Ход работы

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

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

Данные занести в таблицу.

Таблица Определение активности амилазы

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

9	1:2560		
10	1:5120		

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

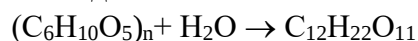
Активность α -амилазы выражают количеством миллилитров 0,1% раствора крахмала, которое может расщепить 1 мл неразведенной слюны при 37 °С в течение 30 минут до стадии эритродекстрина. Рассчитывают количество слюны в последней пробирке с желтоватой окраской.

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

10.2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ ПО ПРИРОСТУ МАЛЬТОЗЫ

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

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



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

Ход работы

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

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

Спустя 30 минут в опытную колбочку вносят 0,5 мл 5% HCl и нагревают до кипения. Затем в обе колбы, добавляют по 15 мл 0,1 н. раствора J_2 и по каплям, все время перемешивая, добавляют 0,5 мл 40% раствора NaOH.

Оставляют пробы стоять 15 минут, а затем в обе колбочки вносят по 10 мл 5% раствора HCl и выделившийся J_2 титруют 0,05 н. раствором $Na_2S_2O_3$ до исчезновения сине-фиолетового окрашивания.

Рассчитывают активность амилазы: 1 мл 0,05 н. раствора J_2 эквивалентный 1 мл 0,05 н. раствора $Na_2S_2O_3$, соответствует 8,57 мг мальтозы. Количество образовавшейся мальтозы

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

где B — количество 0,05 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование контрольной пробы; D — количество 0,05 н. раствора $Na_2S_2O_3$, пошедшее на титрование опытной пробы; 8,57 коэффициент поправки на 0,05 н. раствора $Na_2S_2O_3$.

Активность амилазы A будет равна:

$$A = C/n,$$

где n — разведение пробы.

10.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ УРЕАЗЫ

Предлагаемый метод основан на учете образующегося в процессе реакции аммиака при гидролизе мочевины $\text{NH}_2\text{--CO--NH}_2$. При этом уреазы не действуют на тиомочевину, структурно сходное вещество $\text{NH}_2\text{--CS--NH}_2$.

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

Ход работы

В две колбы на 50 мл вносят по 5 мл препарата уреазы и по 5 мл 2% раствора мочевины в фосфатном буфере (рН 7), перемешивают. В одной из колб фермент инактивируют путем нагревания до кипения; обе колбы ставят на 1 час в термостат при 37 °С, после чего в колбы добавляют по 1 мл 0,1%-ного раствора HgCl_2 , несколько капель 0,2%-ного метилового красного и выделившийся аммиак титруют 0,1 н. раствором HCl .

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

Расчет активности уреазы производят по формуле:

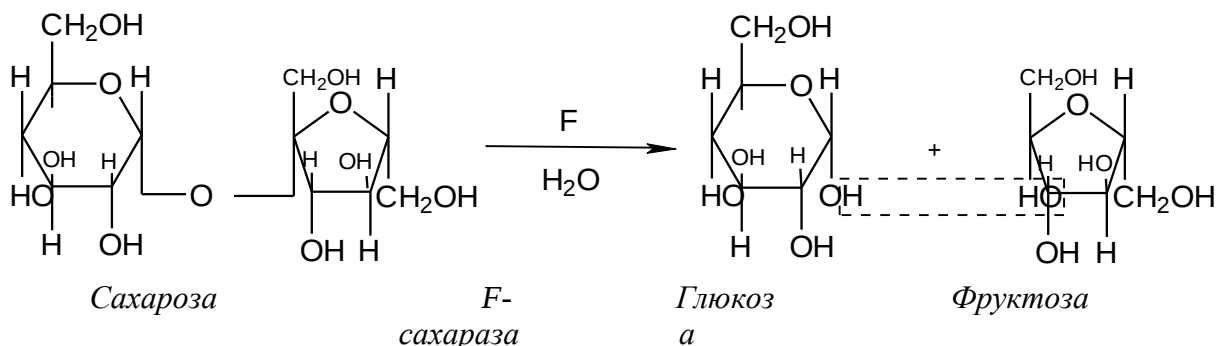
$$v = \frac{(A - B) \cdot T \cdot 1,4 \cdot 1,25 \cdot 5}{t}$$

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

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

10.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ САХАРАЗЫ

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



Ход работы

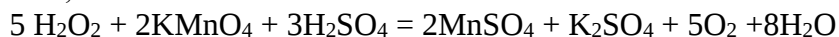
5 г высушенных на воздухе пивных или прессованных дрожжей растирают в течение 20 минут с кварцевым песком и 25 мл воды, подогревают до 60 °С, затем фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным, для чего первые порции мутного фильтрата снова выливают в воронку для фильтрования.

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

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

Метод определения активности каталазы основан на определении количества пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом. Количество H_2O_2

в реакционной смеси определяют титрованием в кислой среде раствором с концентрацией перманганата калия 0,02 моль/л:



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

10.6.ЗАВИСИМОСТЬ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ АМИЛАЗЫ СЛЮНЫ ОТ pH РЕАКЦИИ СРЕДЫ

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

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

Ход работы

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

Таблица Приготовление буферных растворов

№	pH	Количество 0,2 М раствора Na_2HPO_3 , мл	Количество 0,1 М раствора лимонной кислоты, мл
1	5,6	2,90	2,10
2	6,4	3,45	1,55
3	6,8	3,65	1,15
4	7,2	4,35	0,63
5	7,8	4,80	0,20

К 5 мл приготовленных смесей добавляют по 0,5 мл слюны, разбавленной водой в 10 раз и 0,5 мл крахмала. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и ставят в термостат при 37 °С на 10 минут. После чего из пробирки 3 отбирают несколько капель жидкости и на стекле смешивают с I_2 в KI. Если получается синее окрашивание, то реакцию с йодом повторяют каждые 5 минут до тех пор, пока не будет красного или оранжевого окрашивания, которое указывает на близкий конец гидролиза. Через 2-3 минуты после появления подобной окраски все пробирки вынимают из термостата и помещают в стакан со льдом. После этого быстро добавляют в каждую пробирку по 2-3 капли раствора йода, перемешивают и отмечают окраску. Оптимальная pH для амилазы слюны будет в той пробирке, в которой крахмал полностью расщепился (при реакции с йодом окраска будет желтой). Фиолетовое, красно-фиолетовое и бурое окрашивание показывает меньшую степень расщепления крахмала.

Результаты опыта занести в таблицу.

Таблица Зависимость активности амилазы слюны от pH среды

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

РЕКОМЕНДАЦИИ К СОСТАВЛЕНИЮ ПРОТОКОЛА

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7. УГЛЕВОДЫ

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: ознакомиться с методами выделения углеводов.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

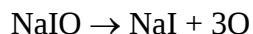
Углеводы - обширный класс соединений широко распространенных в природе. По химической природе это органические вещества, представляющие собой альдегиды или кетоны многоатомных спиртов. В зависимости от числа атомов углерода в цепи моносахариды делят на тетразы (C₄), пентозы (C₅), гексозы (C₆) и т.д.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

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

Углеводы образуются в растениях в процессе фотосинтеза (80% сухого вещества растений составляют углеводы) и служат источником энергии для животных, питающихся этими растениями. Кроме этого, углеводы являются основным структурным материалом растений, составной частью нуклеиновых кислот, играющих важную роль в процессе биосинтеза белка.

1. ЙОДОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТОЗЫ

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



Выделившийся атомарный кислород окисляет молочный сахар в лактобионовую кислоту:



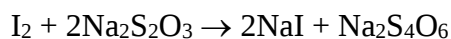
лактобионовая кислота

глюкозу, образовавшуюся при инверсии сахарозы, в глюконовую кислоту:



глюконовая кислота

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



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

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

Ход работы

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

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

Отстоявшуюся жидкость профильтровывают в сухую колбу через складчатый фильтр.

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

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

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

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

Содержание лактозы в % находят по формуле:

$$Л = 0,873 \cdot (a - б)$$

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Физико-химические свойства глюкозы и других углеводов, на которых основаны методы их качественного и количественного определения в биологических жидкостях.
2. Сущность йодометрического определения лактозы.
3. Метод ТСХ для определения углеводов.
4. Фотосинтез, его значение.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8 ЛИПИДЫ.

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Научиться выделять и идентифицировать липиды.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

1. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА

1.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛЕЦИТИНА В ЖЕЛТКЕ КУРИНОГО ЯЙЦА

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

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

1.2. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЛЕЦИТИН С ХЛОРИДОМ КАДМИЯ

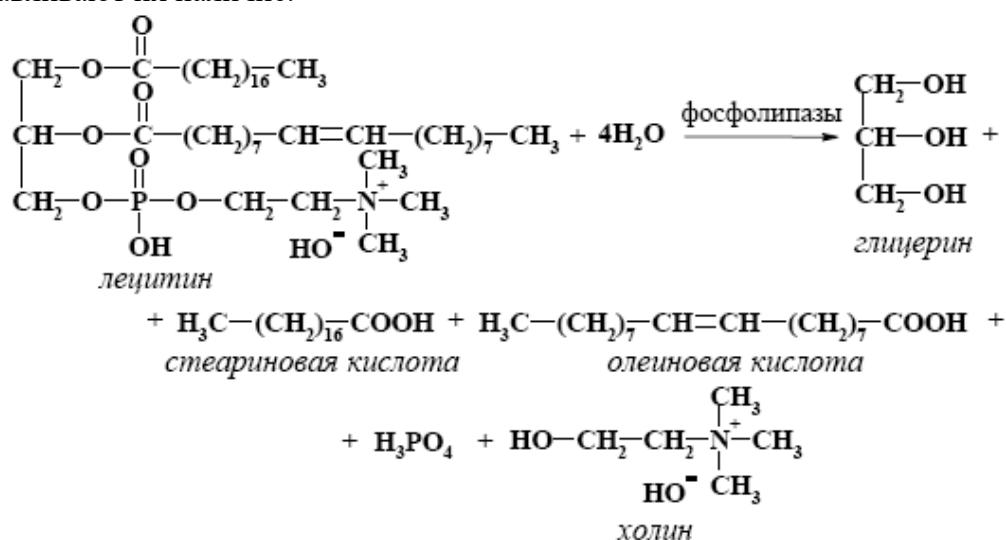
Эту реакцию не дают растворы холестерина и растительных масел.

Ход работы

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

2.ГИДРОЛИЗ ЛЕЦИТИНОВ И ОБНАРУЖЕНИЕ ПРОДУКТОВ ГИДРОЛИЗА

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



2.1. ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛИНА

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

2.2. ОБНАРУЖЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

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

2.3. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИЦЕРИНА

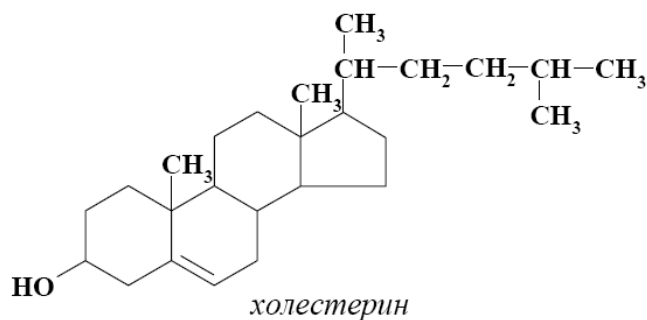
Часть сухого остатка смешивают с несколькими кристаллами KHSO₄ и нагревают. При этом ощущается резкий запах акролеина, образовавшегося из глицерина.

2.4. ОБНАРУЖЕНИЕ ФОСФОРНОЙ КИСЛОТЫ

Другую часть сухого остатка сплавляют в тигле с небольшим количеством 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.

3. ОБНАРУЖЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА В МОЗГУ

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



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

Ход работы

3.1. ВЫДЕЛЕНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА

Тщательно растирают в фарфоровой ступке 3-5 г мозга с двумя частями гипса до 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.

3.2. РЕАКЦИЯ САЛЬКОВСКОГО

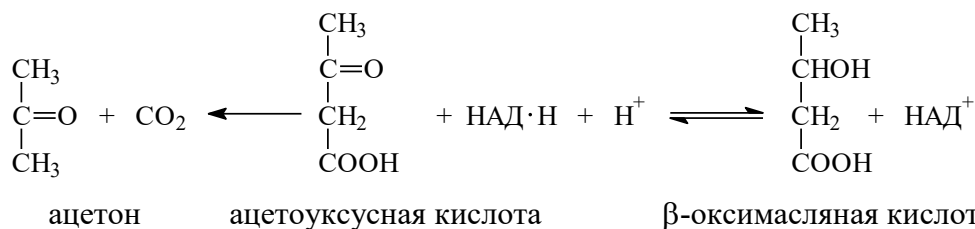
К 2-3 мл хлороформного раствора холестерина приливают 2-3 мл концентрированной серной кислоты и жидкость осторожно перемешивают. Когда жидкость отстаивается, верхний хлороформный слой оказывается окрашенным в красный цвет, нижний - в желто-красный цвет с зеленой флуоресценцией.

3.3. РЕАКЦИЯ ЛИБЕРМАННА—БУРХАРДА

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

4. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА КЕТОНОВЫЕ ТЕЛА

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



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

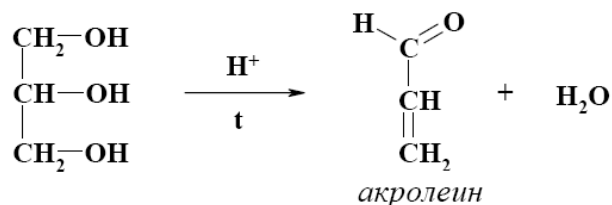
Ход работы

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

через 3 минуты свидетельствует о присутствии 10-30 мг% кетоновых тел.

5. ОБНАРУЖЕНИЕ ГЛИЦЕРИНСОДЕРЖАЩИХ ЛИПИДОВ. АКРОЛЕИНОВАЯ ПРОБА

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



Ход работы

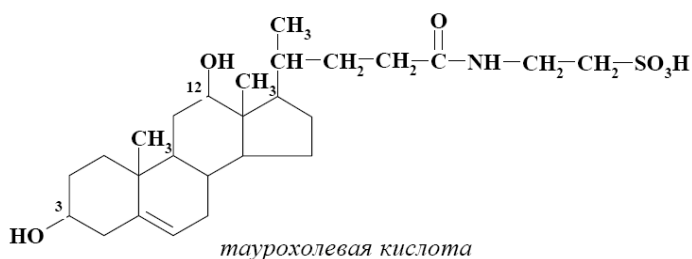
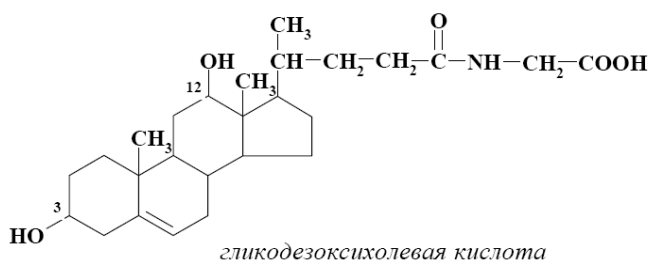
На дно двух пробирок поместить несколько кристалликов гидросульфата калия. В 1-ю пробирку добавить 5 капель растительного масла, во 2-ю 5 капель глицерина. Обе пробирки нагреть.

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

6. КАЧЕСТВЕННАЯ РЕАКЦИЯ НА ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ (РЕАКЦИЯ ПЕТЕНКОФФЕРА)

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

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



Ход работы

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

Окраска обусловлена взаимодействием холевой кислоты с оксиметилфурфуролом,

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

7. ОБНАРУЖЕНИЕ СТЕРОЛОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ МАСЛЕ

Ход работы

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

8. ДЕМОНСТРАЦИЯ КИСЛЫХ СВОЙСТВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

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

Ход работы

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

9. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХОЛИНСОДЕРЖАЩИХ ФОСФОЛИПИДОВ В СМЕСИ ЛИПИДОВ

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

Ход работы

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

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9 МИНЕРАЛЬНЫЙ ОБМЕН

ЦЕЛЬ ЗАНЯТИЯ: Изучить способы определения минеральных веществ в биоматериалах.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЗАНЯТИЯ

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

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

1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФАТОВ

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

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

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

Ход работы

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

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

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

Контроль готовят одновременно с опытной пробой. К 2,5 мл трихлоруксусной кислоты приливают 2,5 мл воды, 1 мл молибденовокислого аммония, 0,2 мл раствора эйконогена, 1,8 мл воды. Оставляют на 20 минут при комнатной температуре. Расчет производят по калибровочному графику.

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

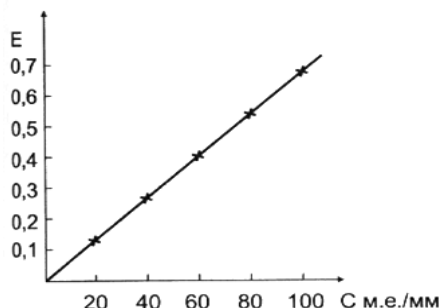
Таблица. Определение неорганического фосфора

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

5	4,0	2,5	1,0	0,2	0,3	0,08	16
---	-----	-----	-----	-----	-----	------	----

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

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



Калибровочный график

1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФАТОВ В СЛЮНЕ

Ход работы

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

К 2 мл фильтрата прибавляют 4 мл 5% раствора молибденово-кислого аммония в 5 н. H_2SO_4 с добавлением 0,5% раствора аскорбиновой кислоты. Перемешивают и инкубируют в термостате при 45°C в течение 20 минут.

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

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ

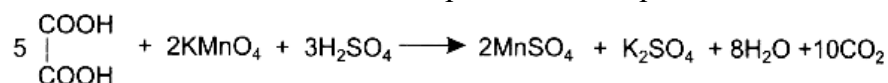
Кальций участвует в поддержании определенной проницаемости всех клеточных мембран, уменьшает уровень возбудимости нервных клеток (при недостатке его наступает перевозбуждение — тетания), принимает участие в свертывании крови, выполняет опорные функции, входя в состав костной ткани, активирует ряд ферментов. Всасывание кальция, поступающего с пищей, осуществляется путем связывания его со специальным белком, который находится в щеточной кайме клеток кишечного эпителия, после чего кальций транспортируется внутрь клеток. Синтез кальцийсвязывающего белка происходит в цитоплазме клеток кишечника при помощи активной формы витамина D_3 — $1,25 - (\text{OH})_2\text{D}_3$. Метод количественного определения кальция в сыворотке крови по де Ваарду основан на осаждении кальция непосредственно из сыворотки без предварительного осаждения белков в виде щавелево-кислого кальция:



Оксалат кальция разлагается при нагревании с серной кислотой:



Освободившаяся щавелевая кислота оттитровывается перманганатом калия:



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

Ход работы

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

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

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

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

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

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

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

Расчет производят по формуле:

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

где x — количество кальция в сыворотке крови, мг%; a — количество 0,01 н. раствора марганцовокислого калия, израсходованное на титрование опытной пробы, мл; b — количество 0,01 н. раствора марганцовокислого калия, потраченное на титрование контрольной пробы, мл; 0,2 — количество кальция, эквивалентное 1 мл 0,01 н. раствора перманганата, мг; 100 — коэффициент для пересчета на 100 мл сыворотки.

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

Результаты определения занести в таблицу. Сопоставить полученные данные с нормальными величинами содержания кальция в сыворотке крови.

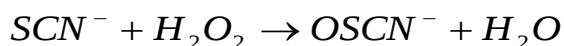
3. ОБНАРУЖЕНИЕ РОДАНИДОВ В СЛЮНЕ

Роданиды слюны обнаруживают по появлению красного окрашивания при добавлении к слюне хлорного железа. Это типичная и чувствительная реакция на роданиды обусловлена образованием роданистой соли трехвалентного железа в результате взаимодействия ионов Fe^{3+} и SCN^- и образования различных комплексов, имеющими состав от $Fe(H_2O)_5NCS^{2+}$ до $Fe(NCS)_6^{3-}$. Некоторые органические соединения, например, соли лимонной и уксусной кислот, препятствуют образованию окраски.

Ход работы

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

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



Гипотиоционат чрезвычайно бактерициден и совместно с H_2O_2 или ее радикалами действует антикариесогенно. Содержание роданидов велико в слюне курильщиков, что

связано с поступлением в их организм синильной кислоты табачного дыма.

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

4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ И ФОСФОРА В ТКАНИ ЗУБА

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

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

Ход работы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10. Содержание кальция в зубе вычисляют по формуле:

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

где x — содержание кальция в зубе, в %;

B — количество марганцовокислого калия, использованное на титрование опыта

после вычета контроля, мл;

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

10000 — коэффициент для пересчета на 100 г зуба;

1000 — коэффициент для пересчета мг в г.

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

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

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

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

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

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

где x — содержание фосфора, %; 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%.

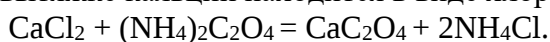
Вычислить содержание кальция и фосфора в зубной ткани и полученные данные занести в таблицу. В выводах сопоставить содержание кальция и фосфора в разных биологических объектах.

5. ИССЛЕДОВАНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА КОСТИ

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

5.1. РЕАКЦИЯ НА КАЛЬЦИЙ

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

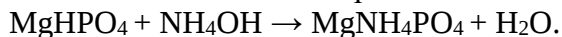


Ход работы

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

5.2. РЕАКЦИЯ НА МАГНИЙ

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



В фильтрате после удаления кальция в виде щавелевокислого кальция (CaC_2O_4) и магния в виде фосфорноаммонийномagneйской 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 ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$). Осадок растворяют в небольшом количестве 10%-ного раствора азотной кислоты и нагревают с 3 мл $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ на водяной бане. В присутствии фосфорной кислоты после охлаждения выпадает осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

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

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

Перечень основной литературы:

1. Данилова, Л. А. Биохимия : учебник / Л. А. Данилова. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2020. — 333 с. — ISBN 978-5-299-01020-6. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/159096>
2. Опарина, С. А. Биологическая химия и основы биорегуляции организмов / С. А. Опарина. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 140 с. — ISBN 978-5-507-49060-8. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/401084>
3. Чиркин, А. А. Биологическая химия : учебник / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко, В. В. Хрусталева. — Минск : Вышэйшая школа, 2023. — 478 с. — ISBN 978-985-06-3567-9. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/432257>

Перечень дополнительной литературы:

1. Биохимия питания / В. Г. Лобанов, Л. В. Капрельянц, В. В. Литвяк [и др.]. — Санкт-Петербург : Лань, 2025. — 456 с. — ISBN 978-5-507-50274-5. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/446195>
2. Таганович, А. Д. Биологическая химия в стоматологии : учебное пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина. — Минск : Новое знание, 2022. — 540 с. — ISBN 978-985-24-0354-2. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/220952>
3. Егорова, И. Э. Основные разделы биохимии. Краткий курс : учебное пособие / И. Э. Егорова, А. И. Сулова, В. И. Бахтаирова. — Иркутск : ИГМУ, 2020 — Часть 2 — 2020. — 102 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/276158>
4. Яценко, А. К. Витамины и витаминоподобные вещества в практике врача-стоматолога : учебное пособие / А. К. Яценко, О. А. Артюкова. — Владивосток : ТГМУ, 2020. — 100 с.

- ISBN 978-5-98301-217-2. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/309545>
5. Основы медицинской биохимии : учебное пособие. — Ставрополь : СтГМУ, 2022 — Часть 1 — 2022. — 108 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/359774>
6. Основы медицинской биохимии : учебное пособие / К. С. Эльбекьян, Ю. В. Первушин, Г. М. Кремнева [и др.]. — Ставрополь : СтГМУ, 2023 — Часть 2 — 2023. — 148 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/399806>
7. Брещенко, Е. Е. Биохимия: биологически активные вещества. Витамины, ферменты, гормоны : учебное пособие для вузов / Е. Е. Брещенко, К. И. Мелконян ; под редакцией И. М. Быков. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 136 с. — ISBN 978-5-507-47791-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/419102>
8. Шенцева, Е. А. Основы биохимии для студентов-стоматологов : учебное пособие / Е. А. Шенцева, Л. Р. Закирова, Т. С. Шевченко. — Белгород : НИУ БелГУ, 2023. — 108 с. — ISBN 978-5-9571-3512-8. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/399440>
9. Каминская, Л. А. Биохимические исследования слюны в клинической стоматологии : в 2 т : монография / Л. А. Каминская. — Екатеринбург : Уральский ГМУ, 2021. — 260 с. — ISBN 978-5-89895-889-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/295571>
10. Болдырева, Ю. В. Сборник ситуационных задач по биологической химии : учебное пособие / Ю. В. Болдырева. — Тюмень : ТюмГМУ, 2023. — 145 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/415025>

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. Биохимия полости рта» для студентов
специальности 31.05.03 Стоматология

Введение

Для современного специалиста важно формирование системных фундаментальных знаний, умений и навыков по биохимическим закономерностям, представляющих важность при подготовке студентов медиков к системному восприятию естественнонаучных и профессиональных дисциплин, формировании у них навыков биохимического анализа, необходимых для последующей практической деятельности.

Целью данного пособия является формирование общепрофессиональных компетенций будущего специалиста по специальности 31.05.03 Стоматология.

Знания, полученные в ходе освоения дисциплины, применяются при написании выпускной квалификационной работы, при прохождении преддипломной практики, а также в дальнейшей профессиональной деятельности.

Общая характеристика самостоятельной работы студента при изучении дисциплины «Биохимия. Биохимия полости рта»

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. Биохимия полости рта»

Самостоятельная работа проводится в виде самостоятельного изучения литературы и подготовки заданий. Основной целью этих видов самостоятельной работы является улучшение профессиональной подготовки специалистов высшей квалификации, направленное на формирование действенной системы фундаментальных и профессиональных знаний, умений и навыков, которые они могли бы свободно и самостоятельно применять в практической деятельности.

В ходе организации самостоятельной работы решаются следующие задачи:

- Показать связь между структурой и функцией белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов; биологическое значение витаминов.
- Сформировать у студентов представления о процессах переноса и реализации генетической информации, нарушение которых приводит к наследственным заболеваниям человека; основах биоэнергетики; метаболических путях и основных механизмах регуляции обмена углеводов, липидов, аминокислот, нуклеотидов.
- Ознакомить со способами обезвреживания токсических веществ в организме, применяя знания механизмов обезвреживания эндогенных веществ и чужеродных соединений.

- Обучить технике современного биохимического анализа, методам оценки и выбору методов анализа, адекватных поставленной задаче.

В ходе постановки целей и задач необходимо учитывать, что их выполнение направлено не только на формирование общеучебных умений и навыков, но и определяется рамками данной предметной области.

Методические рекомендации по изучению теоретического материала

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала курса «Биохимия» студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины в библиотеке СКФУ. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных. Все это поможет в решении задач, тестировании и подготовке к зачету.

Методические указания по подготовке к лабораторным занятиям

При подготовке к практическим занятиям рекомендуется изучить контрольные вопросы по данному занятию, теоретический материал, изложенный в пособии, обратить внимание на технику безопасности и изучить методику проведения опытов. В протоколе должны быть отражены следующие разделы:

1. Номер занятия.
2. Название работы.
3. Цель работы.
4. Принцип метода и химический механизм реакций.
5. Расчеты.
6. Результаты.
7. Выводы.

Методические рекомендации по подготовке к индивидуальным заданиям

При выполнении самостоятельного изучения теоретического материала курса студент должен руководствоваться следующими правилами. За основу рекомендуется брать рабочую программу учебной дисциплины в библиотеке СКФУ. Согласно плану-графику аудиторных занятий и самостоятельной работы, на изучение отдельных тем отводится разное количество часов. Значительная часть самостоятельной работы студента должна отводиться на усвоение полученного на лекции материала по пройденной теме, написании конспекта по заданным теоретическим блокам, поиску дополнительной литературы на базе библиотеки СКФУ и в системе интернет.

Весь охваченный теоретический материал должен быть осмыслен и переработан для более глубокого осмысления полученных данных. Все это поможет в решении задач, тестировании и подготовке к контрольным точкам.

Методические рекомендации при подготовке к докладам

Изучение основных разделов заканчивается разработкой творческих заданий, на которых обобщается весь материал по данной части учебной программы.

Творческие задания представляет собой не только одну из форм текущего контроля, но и одну из активных форм учебных занятий, проводимых как в виде беседы преподавателя со студентами, так и в виде занятия, посвященного обсуждению определенной темы.

Целями творческих заданий являются: выяснение у студентов знаний, их углубление (повышение) и закрепление по той или иной теме курса; формирование у студентов навыков анализа теоретических проблем на основе самостоятельного изучения учебной и научной литературы.

Основная задача творческих заданий – пробудить у студента стремление к чтению и использованию дополнительной литературы. На занятия могут выноситься как проблемные (нередко спорные теоретические вопросы), так и вопросы, требующие самостоятельного изучения, а также более глубокой проработки.

На самостоятельную подготовку к творческому заданию студенту отводится 1-2 недели. Подготовка включает в себя изучение рекомендованной литературы и составление конспекта.

Методические указания к тестам

Самостоятельные ответы на вопросы, как и решение задач существенно дополняют лекции и самостоятельно пройденный материал по дисциплине. В процессе анализа и решения задач студенты расширяют и углубляют знания, полученные из лекционного курса и учебников, учатся глубже понимать биохимические законы и формулы, разбираться в их особенностях, границах применения, приобретают умение применять общие закономерности к конкретным случаям. В процессе решения задач вырабатываются навыки вычислений, работы со справочной литературой, таблицами. Решение задач не только способствует закреплению знаний и тренировке в применении изучаемых законов, но и формирует особый стиль умственной деятельности, особый метод подхода к биохимическим явлениям.

На занятиях используются:

- 1) задачи-упражнения, помогающие студентам приобрести твёрдые навыки расчёта и вычислений;
- 2) задачи для демонстрации практического применения тех или иных законов;
- 3) задачи для закрепления и контроля знаний;
- 4) познавательные задачи.

Несмотря на различие в видах задач, их решение можно проводить по следующему общему плану, который надо продиктовать студентам:

1. прочесть условие задачи; посмотреть, все ли термины в условиях задачи известны и понятны (если что-то неясно, следует обратиться к учебнику, просмотреть решения предыдущих задач, посоветоваться с преподавателем);
2. написать схему реакции, если это необходимо;
3. установить, какие законы и соотношения могут быть использованы при решении данной задачи;
4. составить уравнения, которые характеризуют рассматриваемые явления с количественной стороны;
5. решить эти уравнения относительно неизвестных величин, получить ответ.

Перечень основной и дополнительной литературы, необходимой для освоения дисциплины

Перечень основной литературы:

1. Данилова, Л. А. Биохимия : учебник / Л. А. Данилова. — Санкт-Петербург : СпецЛит, 2020. — 333 с. — ISBN 978-5-299-01020-6. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/159096>
2. Опарина, С. А. Биологическая химия и основы биорегуляции организмов / С. А. Опарина. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 140 с. — ISBN 978-5-507-49060-8. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/401084>
3. Чиркин, А. А. Биологическая химия : учебник / А. А. Чиркин, Е. О. Данченко, В. В. Хрусталеv. — Минск : Вышэйшая школа, 2023. — 478 с. — ISBN 978-985-06-3567-9. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/432257>

Перечень дополнительной литературы:

1. Биохимия питания / В. Г. Лобанов, Л. В. Капрельянц, В. В. Литвяк [и др.]. — Санкт-Петербург : Лань, 2025. — 456 с. — ISBN 978-5-507-50274-5. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/446195>
2. Таганович, А. Д. Биологическая химия в стоматологии : учебное пособие / А. Д. Таганович, Е. А. Девина. — Минск : Новое знание, 2022. — 540 с. — ISBN 978-985-24-0354-2. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/220952>
3. Егорова, И. Э. Основные разделы биохимии. Краткий курс : учебное пособие / И. Э. Егорова, А. И. Сулова, В. И. Бахтаирова. — Иркутск : ИГМУ, 2020 — Часть 2 — 2020. — 102 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/276158>
4. Яценко, А. К. Витамины и витаминоподобные вещества в практике врача-стоматолога : учебное пособие / А. К. Яценко, О. А. Артюкова. — Владивосток : ТГМУ, 2020. — 100 с. — ISBN 978-5-98301-217-2. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/309545>
5. Основы медицинской биохимии : учебное пособие. — Ставрополь : СтГМУ, 2022 — Часть 1 — 2022. — 108 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/359774>
6. Основы медицинской биохимии : учебное пособие / К. С. Эльбекьян, Ю. В. Первушин, Г. М. Кремнева [и др.]. — Ставрополь : СтГМУ, 2023 — Часть 2 — 2023. — 148 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/399806>
7. Брещенко, Е. Е. Биохимия: биологически активные вещества. Витамины, ферменты, гормоны : учебное пособие для вузов / Е. Е. Брещенко, К. И. Мелконян ; под редакцией И. М. Быков. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2024. — 136 с. — ISBN 978-5-507-47791-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/419102>
8. Шенцева, Е. А. Основы биохимии для студентов-стоматологов : учебное пособие / Е. А. Шенцева, Л. Р. Закирова, Т. С. Шевченко. — Белгород : НИУ БелГУ, 2023. — 108 с. — ISBN 978-5-9571-3512-8. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/399440>
9. Каминская, Л. А. Биохимические исследования слюны в клинической стоматологии : в 2 т : монография / Л. А. Каминская. — Екатеринбург : Уральский ГМУ, 2021. — 260 с. — ISBN 978-5-89895-889-3. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/295571>
10. Болдырева, Ю. В. Сборник ситуационных задач по биологической химии : учебное пособие / Ю. В. Болдырева. — Тюмень : ТюмГМУ, 2023. — 145 с. — Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. — URL: <https://e.lanbook.com/book/415025>