

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ
ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ПОЛИТИКИ И ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБОУ ВПО КОСТРОМСКАЯ ГСХА

Кафедра
неорганической и биологической химии

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Лабораторный практикум для студентов специальности 36.05.01 «Ветеринария»
и направления подготовки 36.03.02 «Зоотехния» очной и заочной форм обучени

Разработано сотрудниками кафедры неорганической и биологической химии ФГБОУ ВПО Костромская ГСХА к.м.н., доцент *П. Г. Геращенко*, д.б.н., профессор *Н.П. Здюмаева*, к.ф.н., доцент *Т.М. Балцан*, к.х.н., доцент *О.К.Морогина*, к.м.н..преподаватель ВА РХБЗ им.маршала Советского Союза С.К.Тимошенко *В.М.Геращенко*.

Рецензент: кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры эпизоотологии, паразитологии и микробиологии Костромской ГСХА
С.Н. Королева

*Рекомендовано к изданию
методической комиссией факультета ветеринарной медицины и зоотехнии,
протокол № 5 от 13мая 2015 г.*

Б63 Биологическая химия: лабораторный практикум /сост. к.м.н., доцент *П. Г. Геращенко*, к.ф.н., доцент *Т.М.Балцан*, д.б.н., профессор *Н.П. Здюмаева*, к.х.н., доцент *О.К.Морогина* к.м.н..преподаватель ВА РХБЗ им. маршала Советского Союза С.К.Тимошенко *В.М.Геращенко* — Кострома: КГСХА, 2015. — 64 с.

В издании приведены основные теоретические сведения по отдельным темам курса, методика проведения лабораторных опытов, вопросы к темам, правила оформления лабораторных работ, контрольные вопросы и список рекомендуемых источников.

УДК 54
ББК 28.072© ФГБОУ
ВПО Костромская
ГСХА, 2015

Содержание

Введение	4
Техника безопасности в лаборатории биологической химии	5
Лабораторная работа № 1 Простые белки. Цветные реакции на белки и аминокислоты	7
Лабораторная работа № 2 Реакции осаждения белков.....	14
Лабораторная работа № 3 Сложные белки	18
Лабораторная работа № 4 Ферментативный гидролиз крахмала.....	23
Лабораторная работа № 5 Свойства ферментов.....	25
Лабораторная работа № 6 Нуклеиновые кислоты	32
Лабораторная работа №7 Открытие витаминов.....	34
Лабораторная работа №8 Открытие углеводов.....	40
Лабораторная работа № 9 Открытие липидов (жиров)	44
Лабораторная работа № 10 Обмен простых белков	47
Лабораторная работа № 11 Обмен сложных белков	50
Лабораторная работа №12 Обмен углеводов	53
Лабораторная работа №13 Обмен липидов	55
Лабораторная работа № 14 Переваривание жиров	59
Лабораторная работа № 15 Водный и минеральный обмен	61
Список литературы.....	64

Введение

Биохимия – наука о молекулярных основах жизни. Она изучает химический состав организма, превращение веществ и энергии, которое осуществляется в процессе их жизнедеятельности. Вопросы и задачи, поставленные в данном методическом пособии, призваны акцентировать внимание студента на основных вопросах учебной программы, вызвать интерес к познанию этой увлекательной науки.

Лабораторные работы имеют целью практическое освоение студентами научно-теоретических положений биохимии, овладение ими техникой экспериментальных исследований и анализа полученных результатов, привитие навыков работы с лабораторным оборудованием, контрольно-измерительными приборами и вычислительной техникой.

При выполнении лабораторных работ студенты должны научиться безопасным приемам обращения с химическими реактивами, приборами и посудой, приобрести навыки исследования свойств аминокислот, белков, ферментов, жиров и углеводов, и приобрести навыки использования справочной и научной литературы.

Настоящий практикум составлен в соответствии со стандартом и учебной программой по биологической химии для направления подготовки 020400.65 - Биология и может быть успешно использован студентами других направлений, изучающими биологическую химию.

В лабораторном практикуме приведены правила техники безопасности при работе в лаборатории биологической химии, приведены условия и аналитические эффекты качественных реакций на важнейшие классы соединений, а также перечислен необходимый минимум лабораторного оборудования и химической посуды. Практикум знакомит студентов с основными методами обнаружения и анализа аминокислот, белков, углеводов, исследования активности ферментов и ингибирующего действия фосфорорганических соединений, исследования свойств жиров.

Для более углубленного изучения курса биологической химии в практикум включены таблицы, схемы, рисунки, углубляющие знания основ биохимии. Закреплению учебного материала способствуют приводимые после каждой темы контрольные вопросы и тесты.

При составлении отчета по лабораторным работам необходимо придерживаться следующей схемы:

- 1 Тема
- 2 Цель и значение работы
- 3 Принцип и химизм реакции
- 4 Техника её выполнения
- 5 Расчеты (если необходимо) и выводы по работе.

Техника безопасности в лаборатории биологической химии

1 Приступая к работе в лаборатории, студенты должны ознакомиться с расположением средств пожаротушения и первой медицинской помощи.

2 При подготовке к лабораторной работе студенты должны внимательно изучить задание по выполнению опытов, обратив особое внимание на правила, обеспечивающие безопасное выполнение работы, а также познакомиться со свойствами используемых в лаборатории веществ (огнеопасность, токсичность и т.д.).

3 При работе в лаборатории необходимо соблюдать чистоту, аккуратность, быть внимательным, исключить попадание веществ на кожу и одежду, не трогать руками лицо и глаза, тщательно мыть руки с мылом.

4 В лаборатории не разрешается принимать пищу, пить воду из лабораторной посуды, пробовать вещества на вкус. Нюхать вещества можно лишь осторожно, направляя к себе пары или газ движением руки.

5 Категорически запрещается одному работать в лаборатории.

6 Нельзя проводить опыты в загрязненной посуде.

7 Органические соединения в паро- и газообразном состоянии в смеси с воздухом способны взрываться. Не допускайте образования таких смесей -

8 При проведении работ по сплавлению со щелочью, металлическим натрием, концентрированными кислотами всегда следует пользоваться защитными очками, резиновыми перчатками.

9 Работу с большинством органических веществ следует проводить только в вытяжных шкафах или в хорошо проветриваемом помещении.

10 Остатки реактивов следует обезвреживать и сливать в специальные емкости для отходов.

11 При проведении работы по сплавлению органического вещества с металлическим натрием следите, чтобы вблизи не было воды. Резать натрий можно только на сухой фильтровальной бумаге, защитив себя очками или маской. По окончании работы необходимо тщательно собрать все остатки не прореагировавшего натрия в банку с керосином, мелкие остатки уничтожают, растворяя их в спирте.

12 При работе с бромом следует помнить, что это очень ядовитое вещество, сильно действующее на слизистые оболочки и образующее на коже трудно заживающие ожоги. Все работы с бромом проводят в вытяжном шкафу. В случае ожога бромом обожженное место продолжительное время обрабатывают спиртом, затем направляют пострадавшего в медицинский пункт.

13 При попадании кислот на кожу нужно быстро промыть пораженное место струей воды, а затем – 2-3 %-ным раствором соды. При ожоге едкими щелочами надо также хорошо промыть пораженное место водой, а затем – 2-3%-ным раствором уксусной кислоты. При случайном попадании кислоты или щелочи в глаза тотчас промыть их большим количеством воды, а затем

обработать тампоном, смоченным в растворе соды или борной кислоты, и вновь промыть водой.

14 Концентрированные кислоты, щелочи, ядовитые и сильно пахнущие вещества обязательно хранить в хорошо вентилируемом вытяжном шкафу.

15 Легковоспламеняющиеся и взрывоопасные жидкости должны храниться в металлических шкафах в количестве, не превышающем ежедневной потребности.

16 В случае воспламенения одежды необходимо немедленно набросить на пострадавшего халат, одеяло, пиджак и т.д. Ни в коем случае не давать ему бежать, так как это усиливает пламя. При возникновении пожара нужно сразу отключить вентиляцию и электроэнергию и принять меры к ликвидации загорания. При необходимости вызвать пожарную команду. При воспламенении эфира, бензола, бензина нельзя применять для тушения воду. В этих случаях пламя тушат песком или асбестовым одеялом.

17 При работе со стеклом и химической посудой необходимо соблюдать правила предосторожности.

18 Запрещается беспорядочно смешивать органические вещества и проводить какие-либо опыты, не связанные с программой обучения.

19 После выполнения опытов сдать реактивы, посуду и оборудование лаборанту или преподавателю (дежурному).

Лабораторная работа № 1 Простые белки. Цветные реакции на белки и аминокислоты

Цель работы:

- 1 изучить состав и свойства простых белков;
- 2 реакции открытия простых белков, цветные реакции на белки, реакции осаждения белков (обратимые и необратимые);
- 3 ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций белки;
- 4 закрепить представления о структурах белковых молекул;
- 5 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
- 6 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
- 7 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

Белки – важнейшая и необходимая составная часть всех живых организмов. Они составляют главную массу сухого вещества тканей человека и почти всех животных.

Это очень сложные, высокомолекулярные соединения, находящиеся в организме в коллоидном состоянии. Молекула белка состоит из остатков аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Под действием специфических: ферментов, а также при нагревании с кислотами или щелочами белки подвергаются гидролизу (распаду с присоединением элементов воды), давая ряд промежуточных продуктов (пептоны, пептиды), а при полном гидролизе – аминокислоты.

Обладая одновременно кислыми карбоксильными и основными аминными группами, белки являются амфотерными веществами и могут вести себя, и как кислоты, и как основания. При определенном рН, характерном для каждого белка, диссоциация кислых и щелочных групп белковой частицы уравнивается, и заряд амфотерного нона белка становится минимальным. Такое рН раствора носит название изоэлектрической точки белка. В изоэлектрической точке белок наименее устойчив в растворе.

Структура белковой молекулы очень лабильна и даже мягкая обработка может привести к денатурации белка, в результате которой изменяются его биологические и физико-химические свойства.

Реакции на присутствие белка основаны на открытии в нём тех или иных химических групп и на его физико-химических свойствах.

Некоторые реакция присущи не только белкам, но и другим веществам, содержащим те же группы. Так, ряд цветных реакций на белок является по существу реакциями на ту или иную аминокислоту, входящую в состав белка. Поэтому, для установления наличия белка недостаточно какой-нибудь одной реакции.

Белки разделяют на две группы: протеины, или простые белки, не содержащие небелковых групп, и протеиды, или сложные белки, содержащие помимо собственно белка, ещё и небелковую (простетическую) группу.

Среди простых белков животного происхождения чаще всего приходится встречаться с альбуминами и глобулинами.

Альбумины растворимы в воде, осаждаются при насыщении раствора сернокислым аммонием, обычно не содержат аминокислоты – глицина. Примерами альбуминов являются альбумины кровяной сыворотки, молока, яичного белка, альбумины мышц (миогены).

Глобулины не растворимы в чистой воде, но растворимы в присутствии в ней нейтральных солей; осаждаются в полунасыщенном растворе сернокислого аммония, т.е. при добавлении к раствору белка равного объема насыщенного раствора этой соли. К глобулинам относят глобулины сыворотки крови и молока, куриного яйца, мышечные глобулины (миозин, глобулин X).

Среди сложных белков следует отметить: хромопротеиды – соединения белка с пигментом, например, гемоглобин; нуклеопротеиды – соединения белка с нуклеиновыми кислотами; фосфопротеиды – белки, содержащие фосфор, например казеин, мукопротеиды (глюкопротеиды) – соединение белка со сложными углеводами – мукополисахаридами, например муцин слюны (простые углеводные группировки содержатся во многих белках).

Значение цветных реакций состоит в том, что они дают возможность обнаружить присутствие белка в биологических жидкостях, растворах и установить аминокислотный состав различных природных белков. Эти реакции применяются как для качественного, так и для количественного определения белка и содержащихся в нем аминокислот.

Существуют два типа цветных реакций: 1) универсальные – биуретовая (на все белки) и нингидриновая (на все α -аминокислоты и белки); 2) специфические – только на определенные аминокислоты как в молекуле белка, так и в растворах отдельных аминокислот (реакция Фоля, Миллона, Сакагучи)

Цветные реакции свойственны составным частям белка - аминокислотам или образуемым ими группировкам. Так, полипептиды, а также все пептоны и белки дают биуретовую реакцию, характерную для наличия пептидных связей. Все аминокислоты, полипептиды и белки дают окрашивание (обычно фиолетовое) при нагревании с нингидрином.

Некоторые аминокислоты (тирозин, триптофан, фенилаланин, цистеин, аргинин, гистидин) к их остатки (например, в молекуле белка) дают характерные цветные реакции,

В большинстве белков при помощи чувствительных реакций можно обнаружить углеводные компоненты.

Реактивы и оборудование: 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди, 0,5%-ный водный раствор нингидрина, концентрированная азотная кислота, концентрированная серная кислота, 30%-ный раствор гидроксида натрия, 5%-ный раствор ацетата свинца, ледяная уксусная кислота.

Приготовление реактивов:

Приготовление 1%-ного раствора яичного белка. Белок куриного яйца фильтруют через марлю и затем разводят дистиллированной водой 1:10

Приготовление реактива Миллона: 40 г ртути растворяют в 57 мл концентрированной азотной кислоты ($\rho = 1,4$ г/мл) сначала при комнатной температуре, а затем в водяной бане. Раствор разводят 2 объемами воды с небольшим количеством 1%-ного раствора нитрита калия и нитрита натрия. Через некоторое время жидкость сливают с отстоявшегося остатка. При длительном хранении реактив окисляется.

α -Нафтол, 0,1% спиртовой раствор: 0,1 г α -нафтола растворяют в 100 мл 70%-ного спирта.

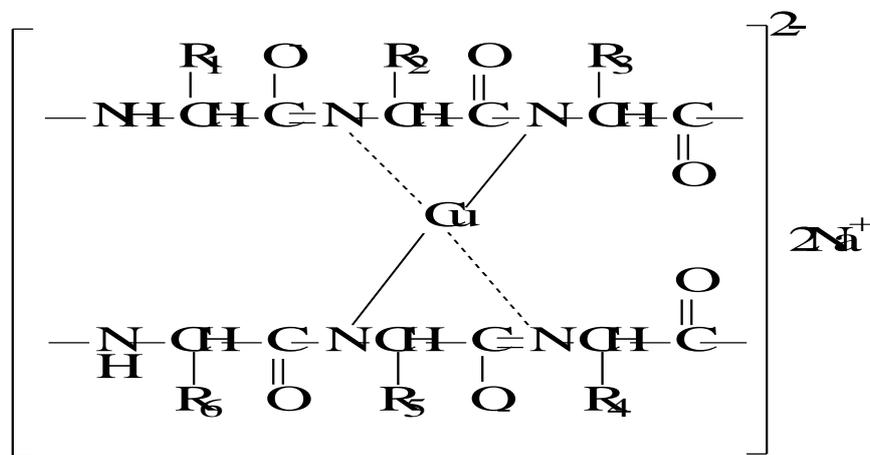
Гипобромит натрия, 2%-ный раствор: 2 г брома (0,65 мл, относительная плотность 3,12 г/мл) растворяют в 100 мл 5%-ного раствора гидроксида натрия при охлаждении (лед). Приготовление реактива ведут под тягой.

Опыт 1 Биуретовая реакция (на обнаружение пептидных связей в белках)

В щелочной среде в присутствии солей меди белки дают фиолетовое окрашивание. Окраску дает комплексное соединение меди с пептидными группами: $-\text{CO}-\text{NH}-$. Биуретовая реакция получается также с продуктами неполного гидролиза белка – пептонами и полипептидами.

Эта реакция является универсальной для всех белков, так как она открывает наличие не менее двух пептидных связей (первичную структуру белка).

В основе биуретовой реакции лежит способность пептидных связей ($-\text{CO}-\text{NH}-$) в щелочной среде образовывать с сульфатом меди окрашенные комплексные соединения, цвет которых зависит от длины полипептидной цепи.



Раствор нативного белка дает сине-фиолетовое окрашивание, а продукты его гидролиза (пептиды) – красно-фиолетовый цвет.

Свое название биуретовая реакция получила от производного мочевины - биурета, который дает эту реакцию. Биурет образуется при нагревании мочевины с отщеплением от нее аммиака.

Биуретовая реакция получается также с некоторыми немногочисленными соединениями, не содержащими пептидных групп (например, при наличии в молекуле групп $-\text{CS}-\text{NH}-$ или $=\text{CH}-\text{NH}-$).

Биуретовую реакцию дают: аминокислоты гистидин и амид аспарагиновой кислоты - аспарагин.

Ход работы

1 Помещают в сухую пробирку несколько кристалликов мочевины и нагревают на слабом огне. Мочевина сначала плавится. Когда сплавленная масса начнет твердеть, нагревание прекращают и дают пробирке остыть. В результате нагревания из мочевины образуется биурет, а аммиак улетучивается (об этом узнают по запаху).

2 К полученному в пробирке биурету прибавляют около 1 мл 20% раствора сернокислой меди. При встряхивании получается характерное розовато-фиолетовое окрашивание. Необходимо избегать прибавления избытка раствора сернокислой меди, так как голубая окраска получающегося гидрата окиси меди может маскировать реакцию.

3 Прodelьвают биуретовую реакцию с раствором белка. В пробирку вносят 5-10 капель 1%-ного раствора яичного белка, 3-6 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1-2 капли 1%-ного раствора сульфата меди и перемешивают. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовое окрашивание.

Нельзя добавлять избыток сульфата меди, так как синий осадок гидрата окиси меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

Опыт 2 Ксантопротеиновая реакция

Подавляющее большинство белков при нагревании с крепкой азотной кислотой дает желтое окрашивание, переходящее в оранжевое при добавлении щелочи или аммиака По-гречески «ксантос» - желтый, откуда реакция и получила название ксантопротеиновой. Такое желтое окрашивание можно наблюдать при попадании крепкой азотной кислоты на кожу, ногти, шерсть и т.п. Эта реакция характерна для бензольного ядра циклических аминокислот (тирозина, фенилаланина, и триптофана), которые содержится почти во всех белках. При действии крепкой азотной кислоты на эти аминокислоты происходит нитрование бензольного кольца с образованием нитросоединений желтого цвета. При добавлении щелочи желтое окрашивание переходит в оранжевое.

Следует избегать прибавления избытка реактива Миллона, так как этот реактив содержит азотную кислоту, которая может дать желтое окрашивание (ксантопротеиновую реакцию), маскирующее реакцию Миллона.

3. Проводят аналогичным образом миллонову реакцию с раствором желатины. Если желатина достаточно чиста, реакция не получается, так как в молекуле желатина остаток тирозина отсутствует.

Опыт 4 Реакция Сакагучи

С помощью этой реакции обнаруживают аминокислоту аргинин, содержащую гуанидиновую группировку. Сущность реакции заключается в том, что эта группировка в присутствии щелочи и гипобромита окисляется и, соединяясь с α -нафтолом, образует окрашенное соединение красного цвета.

Ход работы

К 5 каплям 1%-ного раствора яичного белка приливают 5 капель 10%-ного раствора едкого натра, 3 капли 0,1%-ного спиртового раствора α -нафтола и по каплям (всего 1-5 капель) 2%-ного раствора гипобромита натрия. Жидкость в пробирке приобретает красный цвет.

Опыт 5 Реакция Адамкевича (на триптофан)

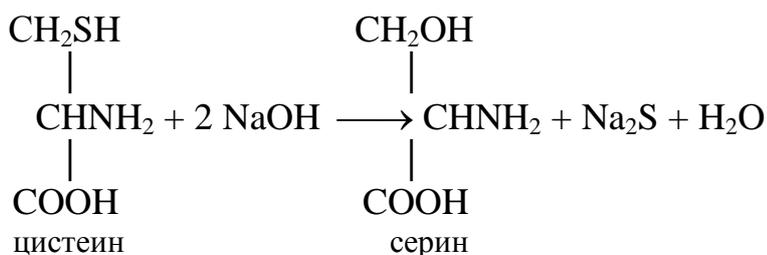
Эта реакция открывает аминокислоту триптофан и основана на его способности в кислой среде взаимодействовать с альдегидами кислот, и образовывать окрашенные продукты конденсации.

Ход работы

В пробирку вносят 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и 5 капель ледяной уксусной кислоты. Раствор вначале слегка нагревают, затем охлаждают и по стенкам пробирки (**осторожно!!!**), чтобы жидкости не смешивались, приливают 10 капель концентрированной серной кислоты. При стоянии на границе двух слоев наблюдается красно-фиолетовое окрашивание в виде кольца.

Опыт 6 Реакция Фоля

В состав молекулы большинства белков входят содержащие серу аминокислоты - цистин и цистеин. Под действием щелочи эти аминокислоты легко отщепляют серу в виде сероводорода или сульфида натрия. Поэтому почти все белки дают положительную реакцию на слабо связанную серу.



Ацетат свинца при реакции со щелочью дает плюмбит натрия Na_2PbO_2 . При взаимодействии этих продуктов реакций образуется осадок сульфида свинца.



Ход работы

К 5 каплям 1%-ного раствора яичного белка приливают 5 капель 30%-ного раствора гидроксида натрия и 1 каплю 5%-ного раствора ацетата свинца. Через 1-2 мин после интенсивного кипячения появляется бурый или черный осадок.

Ион серы S^{2-} , образующийся из цистеина или цистина в сильнощелочной среде можно обнаружить с помощью нитропруссидной реакции. К 10 каплям 1%-ного раствора яичного белка добавляют 10 капель 20%-ного раствора щелочи, интенсивно кипятят, затем после охлаждения приливают 3-5 капель свежеприготовленного 5%-ного раствора нитропрусида натрия, после чего появляется красно-фиолетовое окрашивание. Интенсивность окрашивания в данных реакциях зависит от количества аминокислот, содержащих серу, и от количества белка в растворе.

Опыт 7 Реакция на присутствие углеводных компонентов

Почти все белки содержат в своём составе углеводные компоненты. Благодаря этому большинства белков, как показали Баллас и Подобедов, в присутствии концентрированной серной кислоты дают характерное для углеводов фиолетовое окрашивание с α -нафтолом (реакция Молиша) или красное окрашивание с тимолом. Окраску с нафтолом или тимолом дают фурфурол и его производные, которые образуются из углеводов под действием концентрированной серной кислоты.

Ход работы

1 Наливают в 2 пробирки по 1-2 мл раствора сахара, добавляют в первую пробирку 5-6 капель раствора α -нафтола, а в другую пробирку - 5-6 капель раствора тимолола.

2 Осторожно подслаивают в обе пробирки по 1-2 мл концентрированной серной кислоты. Наблюдают фиолетовое (в случае α -нафтола) и красное (в случае тимолола) окрашивание на границе раздела серной кислоты и раствора сахара.

3 Проводят те же реакции, взяв вместо раствора сахара раствор белка. Отмечают положительную реакцию, указывающую на наличие углеводных групп в белке.

Опыт 8 Реакция Вуазене (на триптофан)

Ход работы

В пробирку внесите 2 мл раствора яичного белка и 1 каплю раствора формальдегида. К полученной смеси при охлаждении (лед) добавьте по каплям 6 мл серной кислоты (конц.). Через 10 мин внесите 10 капель раствора нитрита натрия. Аналитический эффект: сине-фиолетовый цвет раствора.

Содержащийся в яичном белке триптофан, конденсируясь с формальдегидом, образует окрашенный продукт конденсации бис-2-триптофанилметан (I), который окисляется до бис-2-триптофанилкарбинола (II), образующего в кислой среде соль, окрашенную в фиолетовый цвет.

Контрольные вопросы

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Дайте определение и приведите классификацию аминокислот.
- 3 Перечислите протеиногенные аминокислоты.
- 4 Сформулируйте правила образования названия аминокислот.
- 5 Перечислите качественные реакции на аминокислоты (реактивы, условия проведения, аналитический эффект).
- 6 Укажите реакции аминокислот по карбоксильной группе, напишите уравнения реакций.
- 7 Укажите реакции аминокислот по аминогруппе, напишите уравнения реакций.
- 8 Какие элементы можно обнаружить в составе аминокислот?

Лабораторная работа № 2 Реакции осаждения белков

Цель работы:

- 1 ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций белки;
- 2 закрепить представления о структурах белковых молекул;
- 3 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
- 4 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
- 5 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

Устойчивость белков в биологических жидкостях организма животных обуславливают два фактора:

- заряд и водная оболочка – для гидрофильных белков
- только заряд – для гидрофобных белков.

Для каждого белка характерна по крайней мере одна трехмерная структура, в которой он стабилен и проявляет биологическую активность при физиологических условиях (рН, температура). Эта структура называется нативной конформацией белка.

При изменении внешних условий белки теряют нативную структуру.

Денатурация – изменение уникальной структуры белковой молекулы, приводящее к потере характерных свойств (растворимости, электрофоретической подвижности, биологической активности и т.д.)

Наиболее ярким признаком денатурации является резкое снижение биологической активности, при этом разрушаются в основном невалентные водородные и дисульфидные связи и не затрагиваются пептидные связи.

При непродолжительном действии возможен возврат биологической активности, т.е. ренатурация белка с полным восстановлением исходной структуры и нативных свойств.

Для белков характерны следующие основные физико-химические свойства: высокая вязкость растворов, незначительная диффузия, способность к набуханию в больших пределах, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, низкое осмотическое давление и высокое онкотическое давление, способность к поглощению лучей при 280 нанометрах (10–9м).

Реактивы: 1%-ный раствор яичного белка, 1%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный раствор гидроксида натрия, концентрированные серная, соляная и азотная кислоты, 10%-ный раствор сульфосалициловой кислоты, 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, 10%-ный раствор сульфата меди, 5%-ный раствор ацетата свинца, 5%-ный раствор нитрата серебра, неразведенный яичный белок, насыщенный раствор сульфата аммония;

Оборудование: фильтры, стеклянные палочки, спиртовки, пробирки, штативы, электрическая плитка.

Известно, что в растворе белки сохраняются в нативном (природном) состоянии за счет факторов устойчивости, к которым относятся заряд белковой молекулы и гидратная (водная) оболочка вокруг неё. Удаление этих факторов приводит к выпадению белков в осадок. Осаждение белков может быть обратимым и необратимым в зависимости от природы используемых реактивов.

Необратимое осаждение белков

Необратимое осаждение белков связано с глубокими нарушениями вторичной и третичной структуры и потерей им нативных свойств, т.е. денатурацией белков. Она вызывается кипячением белка, действием солей тяжелых металлов, растворами минеральных и органических кислот и щелочей.

Опыт 1 Осаждение белка кипячением

Белки являются термолабильными соединениями и при нагревании свыше 50⁰- 60⁰ С наступает денатурация. Сущность тепловой денатурации заключается в разворачивании специфической структуры полипептидной цепи и разрушении гидратной оболочки белковых молекул, что проявляется заметным уменьшением их растворимости. Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в изоэлектрической точке белка, т.е. при таком значении рН среды, когда суммарный заряд белковой молекулы равен нулю. Белки, обладающие кислыми свойствами, осаждаются в слабокислой среде, а белки, обладающие щелочными свойствами – в слабощелочной. В сильнокислых и сильнощелочных средах денатурированный при нагревании белок в осадок не выпадает, так как частицы его перезаряжаются и несут в первом случае положительный, а во втором отрицательный заряд, что повышает его устойчивость в растворе.

Ход работы

В четыре пронумерованные пробирки приливают по 10 капель 1%-ного раствора яичного белка. Затем:

а) первую пробирку нагревают до кипения. Раствор белка мутнеет, но так как частицы денатурированного белка несут заряд, они в осадок не выпадают. Это связано с тем, что яичный белок имеет кислые свойства (изоэлектрическая точка его равна рН 4,8) и в нейтральной среде заряжен отрицательно.

б) во вторую пробирку добавляют 1 каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Выпадает осадок белка, так как белок приближается к изоэлектрической точке и белок теряет заряд.

в) в третью пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Осадка не образуется, так как в сильнокислой среде частицы белка приобретают положительный заряд (сохраняется один из факторов устойчивости белка в растворе).

г) в четвертую пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают до кипения. Осадка не образуется, так как в щелочной среде отрицательный заряд частиц увеличивается.

Опыт 2 Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Концентрированная серная, соляная, азотная и другие кислоты при взаимодействии с белком вызывают его денатурацию. Это связано с тем, что кислоты удаляют гидратную оболочку и нейтрализуют заряд молекулы. При избыточном количестве серной и соляной кислот выпавший осадок денатурированного белка вновь растворяется, по-видимому, за счет перезарядки молекул белка и частичного его гидролиза. При добавлении же избытка азотной кислоты растворения осадка не происходит (механизм этого явления до конца не изучен). Поэтому в клинических лабораториях при определении белка в моче пользуются азотной кислотой.

Ход работы

В три пробирки наливают по 5-10 капель концентрированных серной, соляной и азотной кислот. Затем, наклонив пробирку под углом 45° , осторожно по стенке пробирки (так, чтобы жидкости не смешивались) наслаивают такой же объем 1%-ного раствора яичного белка. На границе двух слоев жидкости появляется осадок белка в виде белого кольца. Затем, осторожно, встряхивая пробирки, обнаруживают растворение белка в пробирках с соляной и серной кислотами, тогда как в пробирке с азотной кислотой растворения белка не происходит.

Опыт 3 Осаждение белков органическими кислотами

Органические кислоты типа трихлоруксусной, сульфосалициловой вызывают необратимое осаждение белков, основанное на нейтрализации заряда и удалении гидратной оболочки с белковой молекулы. Однако, трихлоруксусная кислота денатурирует только белки, тогда как сульфосалициловая кислота осаждает и белки, и высокомолекулярные

полипептиды, поэтому в клинической лабораторной практике при определении остаточного азота используют трихлоруксусную кислоту., чтобы можно было раздельно определить содержание азота белков и других азотсодержащих веществ – пептидов, мочевины, аминокислот и др.

Ход работы

В две пробирки приливают по 5 капель 1%-ного раствора яичного белка, затем в одну из них вносят 1-2 капли 10%-ного раствора сульфосалициловой кислоты, а в другую – такое же количество 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. В пробирках выпадает осадок белка.

Опыт 4 Осаждение белков солями тяжелых металлов

Белки при взаимодействии с солями ртути, свинца, меди и других тяжелых металлов денатурируют и выпадают в осадок. В основе этого процесса лежит адсорбция металла на поверхности белковой молекулы, в результате которой происходит образование нерастворимого комплекса. Это свойство белков широко используется в клинике при отравлениях солями тяжелых металлов. В качестве адсорбентов этих металлов применяют белки молока и сырых яиц, что приводит к ограничению всасывания металлов и снижению степени отравления.

Однако при избытке некоторых солей (ацетата свинца, сульфата меди) наблюдается растворение (пептизация) первоначально образовавшегося осадка. Это связано с накоплением ионов металла на поверхности денатурированного белка и появлением положительного заряда на белковой молекуле. При избытке солей серебра и ртути растворения осадка не происходит.

Ход работы

В три пробирки вносят по 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и прибавляют: в первую пробирку – 1 каплю 10%-ного раствора сульфата меди, во вторую – 1 каплю 5%-ного раствора ацетата свинца, в третью – такое же количество 5%-ного раствора нитрата серебра. Во всех пробирках выпадает осадок. Затем, в первую пробирку добавляют 10 капель 10%-ного раствора сульфата меди и наблюдают растворение осадка. В третью пробирку наливают 10 капель 5%-ного раствора нитрата серебра – растворение осадка не происходит.

Опыт 5 Осаждение белков органическими растворителями

Ход работы

К 1 мл 1% раствора белка добавляют 2 мл органического растворителя (96% этанола, хлороформа, ацетона или эфира) и перемешивают. Образование осадка можно усилить добавлением нескольких капель насыщенного раствора хлорида натрия.

Опыт 6 Осаждение белков реактивами на алкалоиды

Танин, пикриновая кислота, растворы диодида ртути в иодиде калия, фосфорновольфрамовая и фосфорномолибденовая кислоты взаимодействуют с группой веществ, содержащих пиррольные, индольные, имидазольные

гетероциклы, несущие положительный заряд в слабокислой среде. Наличие подобных группировок в белках приводит к образованию осадков, при этом растворы надо подкислить.

Протамины и гистоны осаждаются в нейтральной среде.

Ход работы

В три пробирки наливают по 1 мл 1% раствора белка, по 4-5 капель 1% раствора уксусной кислоты и по 2-3 капли: в первую пробирку - 10% раствора пикриновой кислоты, во вторую - насыщенного раствора танина, в третью - 5% раствора железисто-синеродистого калия. Наблюдают выпадение осадка.

Лабораторная работа № 3 Сложные белки

Сложные белки – комплексы, состоящие из белка и небелкового компонента, называемого простетической группой. К сложным белкам относятся: нуклеопротеиды, гликопротеиды, липопротеиды, металлопротеиды и сложные белки-ферменты. Так, небелковой частью хромопротеидов являются окрашенные вещества, фосфопротеидов – фосфорная кислота, нуклеопротеидов – нуклеиновые кислоты и т.д. С помощью цветных реакций можно открыть составные компоненты сложных белков.

Цель работы:

1 изучить состав сложных белков – хромопротеидов, фосфопротеидов, нуклеопротеидов;

2 научиться практически открывать сложные белки, открывать их составные части и компоненты.

Реактивы: 1 г пекарских дрожжей, 10%-ный раствор серной кислоты, дистиллированная вода, концентрированный раствор аммиака, 1%-ный раствор нитрата серебра, 1%-ный спиртовой раствор тимола концентрированная серная кислота, молибденовый реактив (7,5 г молибдата аммония, вода, 32%-ная азотная кислота ($\rho = 1,2$ г/мл), 2 мл молока, ледяная уксусная кислота, стеклянная палочка, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 10%-ный раствор азотной кислоты, 0,5%-ный раствора фенолфталеина, 1%-ный раствор яичного белка.

Оборудование: круглодонная колба на 100 мл, фильтры, пробка с обратным холодильником длиной 25-30 см, стеклянные палочки, спиртовка, пробирки, штативы, асбестовая сетка

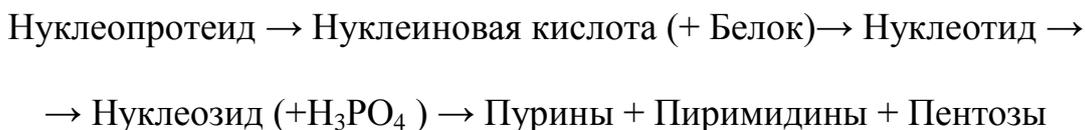
Реакции на нуклеопротеиды

Нуклеопротеиды состоят из белка и нуклеиновых кислот, которые построены из моонуклеотидов.

Нуклеиновые кислоты – это биополимеры, мономерными звеньями которых являются нуклеотиды живых организмах нуклеиновые кислоты входят в состав нуклеопротеидов. Нуклеопротеиды – комплексы белка, являющиеся важнейшими составными элементами ядер живых клеток и вирусов. Связь белка, обладающего основными свойствами, с молекулами нуклеиновой кислоты (НК) в них осуществляется за счет солеобразных и

водородных связей и легко разрушается путем солевой коагуляции белка. В результате этого процесса НК могут быть выделены в свободном виде. Нуклеотидами (в широком смысле) называют природные или синтетические соединения, в которых гидроксилы углеводного остатка нуклеозида этерифицированы одной или несколькими фосфатными группами, т.е. он является нуклеозидфосфатом.

Нуклеозиды – это природные или синтетические соединения, молекулы которых состоят из пуринового или пиримидинового основания, связанного N-гликозидной связью с остатком Д-рибозы или 2,-дезоксид-Д-рибозы. Важнейшую роль в установлении строения НК сыграла реакция гидролиза, который можно осуществить ступенчато по приведенной схеме:



Молекулы нуклеиновых кислот всех типов живых организмов – это длинные неразветвленные полимеры полинуклеотидов. Роль мостика между нуклеотидами выполняет 3, 5-фосфорнодиэфирная связь, соединяющая 5-фосфат одного нуклеотида и 3,-гидроксил остаток углеводной составляющей следующей. Поэтому такая цепь является полярной. На одном ее конце остается свободной 5-О-Фн-группа, а на другом – 3-ОН-группа остатка фосфорной кислоты у 5 атома углерода одного мононуклеотида с гидроксильной группой пентозы у 3 атома углерода другого. Данный тип связи осуществляет "первичную структуру" нуклеиновых кислот.

Нуклеиновые кислоты классифицируют на 2 типа:

1 – дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), из которых при полном гидролизе можно выделить аденин, гуанин, цитозин, тимин, дезоксирибозу и фосфорную кислоту;

2 – рибонуклеиновые кислоты (РНК), гидролизующиеся до аденина, гуанина, цитозина, урацила, рибозы и фосфорной кислоты.

Нуклеиновые кислоты в клетке находятся в виде нуклеопротеиновых комплексов, которые рассматриваются как сложные белки, простетической группой которых являются нуклеиновые кислоты.

Для качественного анализа химического состава нуклеопротеидов может быть использован гидролизат дрожжей как объект, богатый нуклеопротеидами. При частичном гидролизе нуклеопротеиды распадаются на белок (протамины или гистоны) и нуклеиновые кислоты. При полном гидролизе нуклеопротеидов могут быть обнаружены: полипептиды (биуретовая реакция), пуриновые основания дают специфическую реакцию образования осадка солей серебра; фосфорную кислоту обнаруживают молибдатом аммония, рибозу или дезоксирибозу – по реакции "серебряного серебра", с реактивом Фелинга или пробой Троммера.

Приготовление гидролизата дрожжей

1 г пекарских дрожжей помещают в круглодонную колбу на 100 мл и добавляют 20 мл 10%-ного раствора серной кислоты и 20 мл дистиллированной воды. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником длиной 25-30 см, закрепляют в несколько наклонном положении и кипятят под тягой 1 ч на асбестовой сетке при слабом нагревании. Затем охлаждают, доводят до первоначального объема и фильтруют. Фильтрат используют для дальнейшей работы.

С гидролизатом проводят следующие реакции:

а) **биуретовую** – для подтверждения наличия белков в составе нуклеопротеидов

Ход работы

К 6 каплям гидролизата прибавляют 10 капель 10%-ного раствора едкого натра до отчетливой щелочной реакции (по лакмусу, опущенному в пробирку), затем 2 капли 1%-ного раствора сульфата меди; появляется розовая или фиолетовая окраска.

б) **пробу на пуриновые основания**. Она основана на образовании комплексных пуриновых оснований с солями серебра.

Ход работы

К 10 каплям гидролизата добавляют 10 капель до щелочной реакции (по лакмусу, опущенному в пробирку) концентрированного раствора аммиака и 10 капель 2%-ного раствора нитрата серебра. Через 3-5 мин образуется рыхлый осадок бурого цвета.

в) **реакцию Молиша** – на пентозную группировку. В её основе лежит взаимодействие тимола с фурфуролом, образующимся из пентоз при нагревании с серной кислотой, что приводит к появлению окрашенного продукта конденсации.

Ход работы

К 10 каплям гидролизата дрожжей прибавляют 2-3 капли 1%-ного спиртового раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно) – 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание.

г) **качественная реакция на углевод**.

Ход работы

К 5 каплям гидролизата дрожжей приливают 3 капли 0,2%-ного раствора α -нафтола и 20 капель концентрированной серной кислоты; появляется розово-фиолетовое окрашивание.

д) **молибденовую пробу** – на фосфорную кислоту, когда при взаимодействии с молибденовым реактивом образуется фосфорная соль молибдата аммония.

Приготовление молибденового реактива. 7,5 г молибдата аммония растворяют в 100 мл воды и добавляют 100 мл 32%-ной азотной кислоты ($\rho =$

1,2 г/мл). Полное растворение молибдата аммония происходит после добавления азотной кислоты.

Ход работы

В пробирку с 3-5 каплями гидролизата дрожжей вносят 20 капель молибденового реактива. Кипятят несколько минут. При охлаждении образуется желтый кристаллический осадок.

Реакции на фосфопротеиды

Простетической группой этих сложных белков является фосфорная кислота. Представителями фосфопротеидов являются казеиноген молока, вителлин яиц, ихтулин икры рыб, ферменты – пепсин, фосфорилаза и др.

Биологическая роль фосфопротеидов заключается в том, что они служат одним из питательных материалов для развития эмбрионов и для растущих организмов. Так, казеиноген молока содержит все незаменимые аминокислоты и фосфорную кислоту. Вместе с казеиногеном в организм ребенка попадает фосфорная кислота, необходимая для развития скелета и процессов обмена веществ.

Выделение казеиногена из молока

80% белков молока приходится на долю специфического фосфопротеида казеина. Этот белок обладает кислыми свойствами и находится в молоке в виде растворимой кальциевой соли. При подкислении казеин выпадает в осадок в виде белых рыхлых хлопьев, которые легко отделяются фильтрованием. Не следует добавлять в молоко избыток кислоты, так как молекулы казеиногена перезаряжаются и вновь переходят в раствор, что мешает осаждению.

Ход работы

К 2 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды и затем 2 капли ледяной уксусной кислоты. Выпавший осадок отфильтровывают и промывают на фильтре 2 раза дистиллированной водой, а затем собирают стеклянной палочкой в пробирки и используют для следующих работ.

Доказательство белковой природы казеиногена

С частью осадка казеиногена проделывают цветные реакции на белки и аминокислоты – биуретовую, Фоля, Миллона.

Ход работы

Оставшуюся часть осадка подвергают гидролизу, для чего помещают его в пробирку, куда добавляют 2 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия. Пробирку закрывают пробкой со стеклянной трубкой и кипятят 10-15 мин на асбестовой сетке. Охлаждают. В гидролизате **открывают фосфорную кислоту.**

Ход работы

Гидролизат подкисляют несколькими каплями 10%-ного раствора азотной кислоты, в присутствии 1-2 капель 0,5%-ного раствора фенолфталеина до обесцвечивания и отфильтровывают в сухую пробирку. К 5 мл фильтрата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят несколько минут.

Раствор окрашивается в лимонно-желтый цвет, а при стоянии выпадает осадок такого же цвета фосфомолибденовокислого аммония.

Реакции на гликопротеиды

Это сложные белки, простетическая группа которых представлена углеводами, а также их производными (гексозаминами, глюкуроновой кислотой, сиаловой кислотой и др.) они входят в состав ткани, слизи (муцин), клеточных мембран.

Простетическая группа гликопротеидов представлена нейтральными и кислыми мукополисахаридами. К кислым мукополисахаридам относятся гиалуроновая, хондроитинсерная кислоты и гепарин. Гиалуроновая кислота входит в состав соединительной ткани, роговицы глаза, стекловидного тела, пупочного канатика, сердечных клапанов. Хондроитинсерная кислота содержится в хрящевой и соединительной тканях, гепарин – в легких и печени.

Нейтральные мукополисахариды входят в состав слизистых секретов – слюны, желудочного сока, в веществах, определяющих группу крови, в гормонах, в ферментах (трансферрин, холинэстераза). Мукополисахариды могут встречаться в тканях и жидкостях организма и в свободном состоянии.

Гликопротеиды играют важную роль в организме, неся опорную и защитную функции, препятствуя проникновению в организм инфекции. Входя в состав межклеточного и межтканевого вещества, они оказывают цементирующее действие, являются связкой в суставах.

Открытие углеводного компонента в яичном белке

Ход работы

В сухую пробирку вносят 5 капель 1%-ного раствора яичного белка и проводят реакцию Молиша. К 10 каплям раствора яичного белка прибавляют 2-3 капли 1%-ного спиртового раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно) – 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание.

Выделение муцина из слюны

Ход работы

В пробирку собирают 2-3 мл слюны и добавляют 4-5 капель ледяной уксусной кислоты. Выпадает осадок муцина. Жидкость из пробирки осторожно сливают, а с осадком муцина проводят реакцию Молиша для доказательства присутствия углевода в этом белке.

Контрольные вопросы

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Укажите элементный состав белков и пептидов.
- 3 Охарактеризуйте свойства пептидов.
- 4 Почему белки можно представить как природные полипептиды?
- 5 В чем состоят функции белков?

- 6 Как классифицируют белки?
- 7 Какова структура белка?
- 8 Понятие о коагуляции и денатурации. Причины данных явлений.
- 9 Охарактеризуйте растворимость белков.
- 10 Как влияет на белки нагревание в нейтральной, кислой и щелочных средах?
- 11 Перечислите качественные реакции на белки (реактивы, условия проведения, аналитический эффект).
- 12 Укажите общие цветные реакции на белки и аминокислоты
- 13 Укажите условия выделения казеина из молока.
- 14 Какой состав имеют продукты гидролиза казеина?

Лабораторная работа № 4 Ферментативный гидролиз крахмала

Ферменты — биологические катализаторы белковой природы. Термин фермент (от лат. fermentum закваска) был предложен в начале XVII в. голландским ученым Ван Гельмонтом для веществ, влияющих на спиртовое брожение. Ферменты и катализаторы неорганической природы, подчиняясь общим законам катализа, имеют сходные признаки:

- катализируют только энергетически возможные реакции;
- не изменяют направление реакции;
- не расходуются в процессе реакции;
- не участвуют в образовании продуктов реакции.

Почти все химические процессы в организмах и в различных производственных смесях протекают при участии ферментов.

Ферменты очень чувствительны к воздействию тепла, кислот, щелочей и солей металлов.

Большинство ферментов в водном растворе при комнатной температуре быстро теряет свою активность, поэтому растворы и препараты ферментов необходимо хранить при пониженных температурах. При длительной работе с растворами ферментов необходимо вносить антисептики (толуол или тимол) во избежание развития в растворах микроорганизмов.

Ферменты можно экстрагировать из растительного или животного материала водой, а затем водным экстрактом действовать на тот или иной субстрат (например, на крахмал или на белок). Учитывая количество образующихся продуктов реакции или изменения субстрата, определяют активность того или иного фермента. Так определяется активность ферментов, растворимых в воде. Однако ферменты не всегда растворяются в воде. Например, фермент липаза из семян клещевины не растворяется в воде. Поэтому в некоторых случаях применяются автолитические методы, основанные на том, что размолотый и растертый испытуемый материал помещается в воду и оставляется на определенное время при температуре 40-45°C. Под действием как растворимых, так и нерастворимых ферментов, содержащихся в испытуемом материале, происходят соответствующие реакции.

Таким образом, определяется суммарное действие ферментов, как растворимых в воде, так и нерастворимых.

Действие ферментов можно определить по вызываемому ферментами изменению окраски субстрата, по накоплению продуктов распада субстрата, по изменению вязкости, по изменению угла вращения плоскости поляризации и другими способами.

Белковую часть сложных белков ферментов называют апоферментом, а небелковую – кофактором. Кофактор условно делится на кофермент (коэнзим), легкодиссоциирующий и простетическую группу, труднодиссоциирующую. Кофермент легко присоединяется к различным апоферментам, а простетическая группа соединяется только с одним апоферментом.

Гидролиз представляет собой один из методов изучения состава вещества. Он может быть кислотным, щелочным или ферментативным; между ними имеются определенные различия, различия одним из которых является температура. Если первые два вида гидролиза протекают при длительном кипячении, то ферментный вид осуществляется при температуре человеческого тела.

В качестве фермента, гидролизующего крахмал на его составные части – декстрины, мальтозу, глюкозу, выступает амилаза слюны. Оценку результатов опыта проводят с помощью цветных реакций – с йодом и реакции Троммера. Негидролизированный крахмал дает синее окрашивание с йодом (положительная реакция) и отрицательную реакцию Троммера, так как он не обладает восстановительной способностью. Соответственно продукты гидролиза крахмала (мальтоза и глюкоза) не дают реакции с йодом, но положительно реагирует на реактив Троммера.

Цель работы:

1 ознакомить студентов с методиками проведения ферментативных реакций на примере сахарозы, амилазы, холинэстеразы;

2 исследовать влияние реакции среды, концентрации фермента и субстрата, температуры на ферментативные реакции;

3 изучить процесс ингибирования холинэстеразы фосфорорганическими соединениями;

4 закрепить представления об особенностях строения молекул ферментов;

5 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;

6 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;

7 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

Реактивы и оборудование: 1% раствора крахмала, термостат или водяная баня, 1% раствор йода, 5 % раствор сульфата меди, 10% раствор гидроксида натрия.

Ход работы

В две пробирки наливают по 10 капель 1% раствора крахмала. В одну из них (пробирка №1) вносят 4 капли воды (контроль), а во вторую (№2) – 4 капли раствора слюны, разведенной в 5 раз. Перемешивают и ставят термостат или

водяную баню на 15 мин при 37 С. Затем из пробирки №1 отбирают по 4 капли исследуемого вещества, которые вносят в две различные пробирки.

а) **Реакция на крахмал.** В одну из пробирок добавляет 1 каплю 1% раствора йодида калия (реакция с йодом). В присутствии крахмала появляется синее окрашивание.

б) **Реакция Троммера.** В другую – 3 капли 5 % раствора сульфата меди и 5 капель 10% раствора гидроксида натрия и осторожно нагревают до кипения (реакция Троммера). Появление красного окрашивания указывает на присутствие в растворе конечных продуктов гидролиза крахмала – глюкозы и мальтозы. Аналогичную процедуру сделать с содержимым пробирки №2. Результаты опыта записать в виде таблицы 1.

Таблица 4 - Гидролиз крахмала амилазой слюны

№ Пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция	
			с йодом	Троммера
1	Крахмал	Вода		
2	Крахмал	(контроль) Амилаза		

Результат должен показать, что в присутствии воды гидролиза крахмала не происходит, и реакция с йодом должна быть положительной, а реакция Троммера – отрицательной, тогда как в присутствии амилазы слюны результаты должны быть противоположными, так как произошел гидролиз крахмала.

Лабораторная работа № 5 Свойства ферментов

Цель занятия:

1 ознакомить студентов с методиками проведения ферментативных реакций на примере амилазы;

2 исследовать влияние реакции среды, концентрации фермента и субстрата, температуры на ферментативные реакции; закрепить представления об особенностях строения молекул ферментов;

3 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;

4 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;

5 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

По своей химической природе ферменты являются белками, поэтому обладают всеми свойствами последних: термолабильностью, амфотерностью, способностью образовывать коллоидные растворы. Наряду с этим ферментам присущи и некоторые только для них характерные свойства, такие как, высокая специфичность, действие при определенном значении рН среды и др.

К общим свойствам ферментов относятся высокая каталитическая активность, специфичность действия, чувствительность к изменению температуры.

Действие почти всех ферментов связано с тем, что фермент временно вступает в химическое соединение со своим субстратом, тем самым видоизменяя его, а затем и отделяясь от него. Особенность ферментов – обратимость их действия. Они катализируют как процесс распада, так и синтеза, однако эти процессы могут катализироваться разными ферментами. Ферменты, являясь белками, обладают термолабильностью, их действие зависит от pH.

Действие ферментов может активизироваться веществами, которые называют активаторами, или замедляться веществами – ингибиторами.

Реактивы и оборудование: 1% раствор крахмала, термостат или водяная баня, 1% раствор йода, 5 % раствор сульфата меди, 10% раствор гидроокиси натрия, амилаза, дистиллированная вода, 2% раствор соляной кислоты, 1% раствор хлорида натрия, 1% раствор сульфата меди, 5% эмульсия сухих сливок, 5% раствор панкреатина, 1% раствор фенолфталеина, 1% раствор карбоната натрия.

Влияние температуры на активность ферментов. Ферменты весьма чувствительны к температуре и проявляют свою наивысшую активность при оптимальном ее значении, которая для ферментов тела человека находится в пределах 35-45⁰С. При высокой температуре (свыше 50⁰С) их активность снижается, а затем наступает инактивация, так как при этом нарушается структура активного центра и не происходит соединения его с субстратом.

Степень инактивации зависит от длительности теплового воздействия. Вследствие тепловой денатурации белковой молекулы фермента происходит замедление и прекращение ферментативных реакций. При низких температурах ферменты хорошо сохраняются, но скорость ферментативного катализа резко снижается. Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется температурным оптимумом фермента. Различные клеточные ферменты имеют собственные температурные оптимумы, которые определяются экспериментально. Для ферментов животного происхождения температурный оптимум находится в интервале 40...50 °С.

В термолабильности ферментов можно убедиться на примере действия фермента амилазы слюны

Ход работы

В две пробирки прилить по 10 капель 1% раствора крахмала. Затем в одну из них добавить 5 капель раствора слюны, разведенной в 5 раз, а в другую – такое же количество предварительно прокипяченной в течение 10 мин слюны. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат на 15 мин при 37⁰С, после чего с содержимым каждой пробирки проделать реакции с йодом, Троммера. В пробирке с прокипяченной слюной гидролиза крахмала не произойдет (почему?).

Специфичность действия ферментов. Каждый фермент действует только на одно вещество или на группу сходных субстратов, что обусловлено соответствием структуры фермента, точнее его активного центра и структуры субстрата. Например, амилаза действует только на крахмал, сахароза – только на сахарозу и т.п.

Специфичность действия бывает абсолютная (действует только на определенный субстрат), относительная, групповая и стереохимическая. Высокая специфичность ферментов определяется только тем, что только некоторые строго определенные функциональные группы, входящие в состав ферментов, могут участвовать в образовании фермент – субстратного комплекса. Специфичность – это избирательность фермента по отношению к субстрату (или субстратам). Специфичность действия ферментов объясняется тем, что субстрат должен подходить к активному центру как "ключ к замку".

Амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов, не действуя на дисахариды. Сахароза состоит из двух молекул глюкозы, но на неё не действует амилаза, поэтому пробирка с сахарозой не даст реакции в реактивном Фелинга.

Ход работы. В две пробирки (№1) вносят 10 капель 1% раствора крахмала, в другую (№2) – 10 капель 2% раствора сахарозы. Затем в пробирки добавляют по 4 капли раствора слюны, разведенной в 5 раз. Перемешивают и оставляют в термостате на 15 мин. при 37⁰С. После этого с содержимым всех четырех пробирок проводят реакции с йодом, с реактивом Фелинга: к 5 каплям исследуемого раствора приливают 3 капли реактива, нагревают пробирку до кипения и кипятят в течение 1 мин. В случае положительной реакции на глюкозу наблюдается красное окрашивание вследствие образующейся закиси меди; результаты заносят в таблицу

Таблица 5 – Определение специфичности действия ферментов

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция с йодом	Реакция Троммера
1	Крахмал	Амилаза		
2	Сахароза	Амилаза		

В выводах следует отметить, в какой пробирке и при каких условиях обнаружено действие ферментов и почему.

Приготовление реактива Фелинга: медный купорос х.ч. выкристаллизовывают из горячего раствора и высушивают на фильтровальной бумаге. Готовят отдельно два раствора: а) 200 г сегнетовой соли и 150 г едкого натра разводят в мерной колбе (1 л) и доводят водой до метки; б) 40г медного купороса разводят в колбе вместимостью 1 л и доводят водой до метки. Перед употреблением смешивают эти два раствора в равных пропорциях.

Влияние рН среды на активность ферментов. Для каждого фермента существует определенное значение реакции среды, при которой он проявляет наивысшую активность. Изменения рН вызывают снижение или полное торможение деятельности фермента. В основе этого лежит нарушение

структуры активного центра (при изменении реакции среды происходит изменение заряда функциональных групп, входящих в состав активного центра). Большинство ферментов проявляет максимальную активность при значениях рН, близких к нейтральным. Лишь отдельные ферменты "работают" в сильно кислой или сильно щелочной среде. Например, активность пепсина – фермента, гидролизующего белки в желудке, – максимальна при рН 1,5...2,5. В щелочной среде "работают" ферменты, локализованные в кишечнике. Изменение оптимального для данного фермента значения рН-среды может привести к изменению третичной структуры фермента, что скажется на его активности. С другой стороны, при изменении рН может измениться ионизация субстрата, что повлияет на образование фермент-субстратного комплекса.

Оптimum рН для амилазы слюны можно определить при взаимодействии её с крахмалом при различных значениях рН.

О степени расщепления крахмала судят по его реакции с раствором йода. При оптимальном значении рН расщепление крахмала произойдет полностью и реакция на крахмал с йодом будет отрицательная, но по мере удаления от этой точки в кислую или щелочную среду расщепление крахмала произойдет только частично, до стадии декстринов, которые дадут и йодом красно-бурую или фиолетовую окраску, или же крахмал вообще не будет расщепляться и реакция с йодом будет положительная.

Ход работы

В 8 пробирок приливают по 1 мл дистиллированной воды, а затем в пробирку №1 вносят 1 мл 0,2% раствора соляной кислоты, перемешивают и отбирают из нее 1 мл смеси, которую переносят в пробирку №3 и так далее. Из пробирки №8 отбирают 1 мл и выливают. Таким образом, получают различные разведения соляной кислоты, которые соответствуют различным значениям рН среды. После этого в каждую пробирку добавляют по 2 мл 1% раствора крахмала и по 1 мл раствора слюны, разведенной 1:10. Пробирки встряхнуть и поставить в термостат на 15 мин при 37⁰С. Затем охладить и добавить во все пробирки по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия. Отметить, что полный гидролиз крахмала произошел в пробирках № 5 и 6, где рН среды раствора находится в пределах 6,8 – 7,2, т.е. оптимальных для действия амилазы.

Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов

Различные вещества могут вызывать или активирование действия фермента (активаторы) или тормозить его активность (ингибиторы). Примерами активаторов служат ионы хлора для амилазы, желчные кислоты для липазы поджелудочной железы, тогда как в качестве ингибиторов амилазы выступают ионы меди; цитохромов, ферментов, участвующих в биологическом окислении, - цианиды и т.п.

Активаторы и ингибиторы влияют на активный центр фермента, способствуют образованию его или блокированию. Они могут взаимодействовать с аллостерическим центром и тем самым менять

ферментативную активность. Например, сульфат меди оказывает тормозящее действие на активность амилазы. Ингибиторами нередко являются продукты промежуточных или конечных реакций какого-либо биохимического процесса. Некоторые природные или синтетические вещества оказывают избирательное ингибирующее действие на ферменты и используются в качестве лекарственных препаратов. В больших дозах подобные вещества могут оказаться ядами.

Обратимые ингибиторы

Различают три типа обратимого ингибирования ферментов; конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное.

Конкурентным называют ингибитор, обратимо взаимодействующий с активным центром фермента. Как правило, конкурентные ингибиторы по структуре похожи на субстрат и могут вытесняться из фермент-ингибиторного комплекса избытком субстрата. Взаимодействие с конкурентным ингибитором не приводит к денатурации или инактивации фермента, поэтому при замене ингибитора на субстрат скорость ферментативной реакции не снижается.

Неконкурентные ингибиторы взаимодействуют с ферментами не в области активного центра, а на каком-то от него удалении, причем никаким избытком субстрата из комплекса не удаляются. При взаимодействии ингибитора с ферментом происходит изменение его конформации с последующей частичной дезинтеграцией активного центра.

Бесконкурентное ингибирование имеет место, когда ингибитор взаимодействует с ферментом только в составе фермент-субстратного комплекса, препятствуя его распаду. Примером необратимого действия ингибиторов на ферменты могут служить фосфорорганические вещества, применяемые в качестве инсектицидов.

Ход работы

В пробирку №1 вносят 1 каплю 1% раствора хлорида натрия, в пробирку №2 – 1 каплю 1% раствора сульфата меди, а в пробирку №3 – 1 каплю воды. Затем во все пробирки добавляют по 10 капель слюны в разведении 1:5. Перемешивают и вносят в каждую пробирку по 5 капель 1% раствора крахмала и оставляют 1-3 мин при комнатной температуре. После чего вносят во все пробирки по 1 капле 1% раствора йода в йодиде калия. Результаты записывают в виде таблицы:

Таблица 6 - Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

№ Пробы	Субстрат	Фермент	Окраска раствора после добавления йода в присутствии		
			воды	сульфата меди	хлорида натрия
1	Крахмал	Амилаза			
2	Крахмал	Амилаза			
3	Крахмал	Амилаза			

Определение амилазной активности слюны

Амилазную активность слюны выражают в количестве субстрата (крахмала), расщепляемого 1 мл слюны за определенный промежуток времени (например, 30 минут). Определение основано на нахождении максимального разведения, при которой исследуемая жидкость еще расщепляет крахмал до стадии красного окрашивания с йодом.

При определении амилазной активности слюны можно также наблюдать влияние на ферменты активаторов и парализаторов (ингибиторов). Так, хлористый натрий в разведенных растворах ускоряет действие амилазы слюны на крахмал. Растворы сернистой меди, наоборот, сильно замедляют действие амилазы слюны.

Ход работы

Наливают из бюретки в 10 пронумерованных пробирок по 1 мл дистиллированной воды.

В первую пробирку отмеривают 1 мл слюны, разведенной водой в 10 раз.

Перемешивают содержимое первой пробирки путем троекратного втягивания пипеткой жидкости из пробирки и последующего выпуска из пипетки. 1 мл полученного раствора переносят из первой пробирки во вторую.

Перемешивают таким же образом содержимое второй пробирки и переносят 1 мл из второй пробирки в третью и т.д. Этим способом получают ряд разведений. Концентрация фермента в каждой последующей пробирке в 2 раза меньше, чем в предыдущей. Из десятой пробирки 1 мл жидкости как излишний выливают.

Наливают во все 10 пробирки еще по 1 мл дистиллированной воды.

Наливают далее из бюретки во все 10 пробирок (начиная с десятой, потом в девятую и т.д.) по 2 мл раствора крахмала и перемешивают содержимое каждой пробирки. Добавление крахмала нужно производить с пробирки, содержащей наименьшую концентрацию амилазы, так как в ней расщепление на холоду идет очень медленно и ошибка за счет одновременного прибавления субстрата практически не отразится на результатах определения.

Одновременно помешивают все 10 пробирок в нагретую до 37°C водяную баню.

Через 30 минут вынимают пробирки из бани, быстро охлаждают их током холодной воды, перемешивают содержимое каждой пробирки и ставят по порядку в штатив.

Прибавляют в каждую пробирку по 2 капли раствора йода, перемешивают и наблюдают в пробирках гамму цветов от желтого к синему. Желтый цвет свидетельствует об отсутствии крахмала, красно-бурый - о присутствии промежуточных продуктов расщепления - различных декстринов, синий - о присутствии крахмала или продуктов его начального расщепления.

Вычисляют амилазную активность исследуемой слюны. При этом исходят из следующего. В пробирке, где жидкость окрашена еще в синий цвет, должного расщепления крахмала не произошло. Достаточное расщепление крахмала, очевидно, имеет место в той пробирке, где нет синего оттенка. Пусть,

например, это будет пятая пробирка (в шестой пробирке уже имеется синий оттенок). В пятой пробирке, не разведенной слюны было $1/320$ мл, т.е. мы можем написать:

$1/320$ мл слюны расщепляет 2 мл 0,1% раствора крахмала
1 мл -----X 0,1% раствора крахмала,

следовательно, $X = 640$

Таким образом, 1 мл неразбавленной слюны расщепляет за 30 минут при 37°C 640 мл 0,1% раствора крахмала. Это принято изображать следующим образом:

α (диастаза) $37^{\circ}/31^{\circ} = 640$ единицам (для данного случая).

Для выяснения активирующего влияния хлористого натрия и парализующего влияния сернокислой меда при гидролизе крахмала амилазой поступают следующим образом.

Производят с одной и той же разведенной слюной три серии определений: 1) по изложенному выше, 2) беря вместо 1 мл дистиллированной воды (п. 5) по 1 мл раствора хлористого натрия и 3) беря вместо 1 мл дистиллированной воды (п. 5) по 1 мл раствора сернокислой меда.

При сравнении результатов всех трех определений обнаруживается разница в активности амилазы.

Определение амилазной активности мочи

Этот метод основан на определении времени, необходимого для полного расщепления крахмала в присутствии 1 мл мочи. Условно за единицу активности амилазы мочи принимают количество фермента, расщепляющее 2 мг крахмала за 15 мин. Активность амилазы выражают количеством единиц в 1 мл мочи.

Моча здоровых людей обладает низкой амилазной активностью по сравнению с амилазой слюны. Определение активности амилазы в моче и сыворотке крови широко используется в клинике при диагностике заболеваний поджелудочной железы.

Ход работы

На сухую чашку Петри заранее капают в разных местах по 1 капле 0,1% раствора йода в йодиде калия (всего 8-10 капель). В пробирку вносят 2 мл 0,1% раствора крахмала, содержащего 0,2 мг крахмала, 1 мл 0,85% раствора хлорида натрия и помещают пробирку в водяную баню при 37°C на 2 мин. Через 2 мин, не вынимая пробирку из бани, добавляют в неё 0,5 мл мочи, перемешивают и отмечают время начала реакции. Затем каждые 2 мин стеклянной палочкой переносят каплю смеси из пробирки на чашку Петри в каплю раствора йода и так продолжают до тех пор, пока окраска капли йода не перестанет изменяться, т.е. до появления желтого цвета, и отмечают время реакции в минутах. Активность амилазы рассчитывают по формуле:

$$X_{\text{ед}} = 15 / T \cdot 0,5,$$

где X – активность амилазы в 1 мл мочи; 15 – время, необходимое для полного расщепления 2 мг крахмала, мин; 0,5 – количество мочи, взятое в реакционную смесь, мл; T – время реакции, мин.

Контрольные вопросы

- 1 Правила техники безопасности при выполнении работы.
- 2 Понятие о ферментах.
- 3 Классификация ферментов.
- 4 Строение фермента.
- 5 Как можно обнаружить присутствие фермента в исследуемом материале?
- 6 Перечислите основные факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции.
- 7 Чем обусловлена специфичность ферментов?
- 8 Понятие об ингибиторах и активаторах.
- 9 Обратимое и необратимое ингибирование.
- 10 Методика исследования свойств сахаразы.
- 11 Методика исследования свойств амилазы.
- 12 Методика проведения биохимической реакции.
- 13 Особенность действия фосфорорганических соединений на фермент холинэстеразу.
- 14 Уравнение реакции гидролиза: сахарозы, крахмала, бутирилхолинйодида.

Лабораторная работа № 6 Нуклеиновые кислоты

Цель работы:

- 1 провести кислотный гидролиз пекарских дрожжей;
- 2 изучить некоторые продукты гидролиза дрожжей;
- 3 привить навыки работы химической посудой, реагентами;
- 4 закрепить полученные знания по строению нуклеиновых кислот;
- 5 ознакомить с качественными реакциями, подтверждающими состав продуктов гидролиза;
- 6 привить навыки работы с литературой и умения формулировать выводы.

Опыт 1 Кислотный гидролиз дрожжей

Оборудование: спектрофотометр, термостат.

Реактивы: раствор ДНК – 0,003%.

Чистоту препаратов нуклеиновых кислот определяют по спектральной кривой поглощения в ультрафиолетовом свете и по величине отношений $E_{260} : E_{230}$ и $E_{240} : E_{280}$.

Ход работы

В спектрофотометрическую кювету наливают 3мл раствора ДНК (0,003%) и на спектрофотометре меряют оптическую плотность (D) при длине волн: 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 нм.

На основе полученных данных строят график зависимости D (ДНК) от длины волны. Находят максимум поглощения в ультрафиолетовом свете препарата ДНК. Затем высчитывают отношения $E_{260} : E_{230}$ и $E_{240} : E_{280}$. Для препаратов нуклеиновых кислот достаточно хорошо очищенных от примесей белков и полисахаридов, эти показатели должны быть в пределах 2,1 – 2,4. Делают вывод о чистоте исследованного препарата ДНК.

Опыт 2 Количественное определение ДНК

Метод основан на свойстве дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, образовывать синее окрашивание прямо пропорционально концентрации ДНК.

Материал исследования: водный раствор ДНК.

Реактивы: дифениламинового реактив (1г. дифениламина в 100мл. ледяной уксусной кислоты, + 2,75мл. H_2SO_4 конц.), дистиллированная вода.

Ход работы

Сначала необходимо построить калибровочный график. Для этого в 3 пробирки наливают по 1мл. раствора ДНК с различной концентрацией (50, 100, 200 мкг/мл) и по 2мл. дифениламинового реактива. Помещают пробирки на 10 – 15 минут в кипящую водяную баню для развития окраски, затем определяют оптическую плотность каждого из растворов. Калибровочный график строят, откладывая по оси абсцисс концентрацию использованных растворов ДНК, по оси ординат – соответствующие им значения оптической плотности.

Затем берут две пробирки: в контрольную пробирку наливают 1мл. воды, в опытную пробирку – 1мл. водного раствора ДНК (неизвестной концентрации). В каждую пробирку добавляют по 2мл. дифениламинового реактива. Обе пробирки помещают на 10 – 15 минут в кипящую водяную баню. Затем пробы остужают и измеряют насыщенность окраски против контроля при $\lambda = 595$ нм. Зная оптическую плотность пробы, по калибровочному графику находят количество ДНК в ней.

Таблица 7 – Состав проб

Пробирки	ДНК (мл)				Дифениламинового реактив (мл)	H ₂ O (мл)
	50 (мкг/мл)	100 (мкг/мл)	200 (мкг/мл)	X (мкг/мл)		
1	1	–	–	–	2	–
2	–	1	–	–	2	–
3	–	–	1	–	2	–
X	–	–	–	1	2	–

К	–	–	–	–	2	1
10 – 15 мин. кипящ. водян. баня						
остудить, оптич. плотность при $\lambda=595$ нм.						

Контрольные вопросы

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Строение нуклеопротеидов.
- 3 Продукты гидролиза нуклеиновых кислот.
- 4 Функции нуклеиновых кислот.
- 5 Классификация нуклеиновых кислот.
- 6 Структуры ДНК и РНК.
- 7 Процессы транскрипции, трансляции, репликации.
- 8 Правила Чарграффа.
- 9 Сходства и различия в строении ДНК и РНК.
- 10 Перечислите цветные реакции на продукты гидролиза нуклеиновых кислот.

Лабораторная работа №7 Открытие витаминов

Витаминами называются органические вещества разнообразной химической природы, которые необходимы в малых дозах для нормального обмена веществ и жизнедеятельности животного и человеческого организма

Витамины образуются, главным образом, в растениях. Животные и человек, получают их с пищей в готовом виде или в виде провитаминов, из которых затем образуются витамины. Витамины необходимы также для нормального роста и развития растений и микроорганизмов.

Витамины разделяются на водорастворимые и жирорастворимые. Водорастворимые витамины в пищевых продуктах могут быть обнаружены по ряду качественных реакций.

Цель занятия:

- 1 научиться определять витамины,
- 2 изучить их качественные реакции;
- 3 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
- 4 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
- 5 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе

Оборудование и реактивы: 1% раствор сульфаниловой кислоты, 5% раствор нитрата натрия, порошок тиамин, 10% раствор бикарбоната натрия, 0,025% раствор рибофлавина, концентрированная соляная кислота, металлический цинк, 0,01 г никотиновой кислоты, 10 % раствор уксусной кислоты, 5% раствор ацетата меди, 10% раствор тиомочевины, витамин В12

беззольный фильтр, концентрированная серная кислота, пробка с обратным холодильником, штатив, дистиллированная вода, 5% раствор пиридоксина, 5% раствор хлорного железа, аскорбиновая кислота, 5% раствор феррицианида калия, концентрированная уксусная кислота, 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,1 г чая, индигокармин, 0,05 н. раствор перманганата калия.

Опыт 1 Водорастворимые витамины

К водорастворимым ферментам относятся витамины группы В, а также витамин С, Р и другие витаминоподобные вещества.

Качественная реакция на тиамин (витамин В1). В основе реакции лежит способность витамина в щелочной среде с diazo-реактивом образовывать окрашенное комплексное соединение.

Ход работы

В пробирку приливают по 5-10 капель 1% раствора сульфаниловой кислоты и 5% раствора нитрата натрия (состав diazo-реактива). Сюда же вносят на кончике ножа или стеклянной палочки небольшое количество порошка тиамина и по стенке пробирки осторожно добавляют 5-7 капель 10% раствора бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

Diazo-реакция. В щелочной среде тиамин с diazo-реактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

Ход работы

К diazo-реактиву, содержащему 5 капель 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5%-ного раствора нитрата натрия, добавляют 1-2 капли 5%-ного раствора тиамина и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5-7 капель 10%-ного бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

Открытие рибофлавина (витамин В2). Реакция основана на способности витамина легко восстанавливаться, что сопровождается изменением окраски раствора из желтой в розовый с дальнейшим обесцвечиванием.

Ход работы

В пробирку приливают 10 капель 0,025% раствора рибофлавина, 5 капель концентрированной соляной кислоты и зернышко металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с витамином, восстанавливая его, и раствор меняет окраску (из желтого на красную и розовую), а затем обесцвечивается.

Открытие никотиновой кислоты (витамина РР). Никотиновая кислота при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок плохо растворимой медной соли.

Ход работы

В пробирку вносят 0,01 г никотиновой кислоты и 20 капель 10 % раствора уксусной кислоты. Нагревают до кипения и добавляют равный объем 5% раствора ацетата меди. При постепенном охлаждении раствора выпадает синий осадок меди комплексной соли и никотиновой кислоты.

Открытие цианкобаламина (витамина В12). Данная реакция основана на способности кобальта, входящего в состав витамина, взаимодействовать с тиомочевинной с образованием при нагревании роданистого кобальта зеленого цвета.

Ход работы

На беззольный фильтр наносят 2-3 капли 10% раствора тиомочевины и высушивают над сеткой газовой горелки. Затем на фильтр добавляют 1-2 капли минерализата витамина. Приготовление минерализата: в пробирку вносят содержимое одной ампулы витамина В12 и 3-5 капель концентрированной серной кислоты, закрывают ее пробкой с обратным холодильником, закрепляют на штативе в несколько наклоненном положении и производят сжигание в вытяжном шкафу до обесцвечивания раствора. По окончании минерализации добавляют 1 мл дистиллированной воды небольшими порциями при постоянном перемешивании и вновь подсушивают. На фильтре (чаще по краям пятна) появляется зеленое окрашивание.

Открытие пиридоксина (витаминов В6). При взаимодействии витамина с хлорным железом образуется соединение красного цвета за счет возникновения комплексной соли типа фенолята железа.

Ход работы

В пробирке смешивают 5 капель 5% раствора пиридоксина и 1 каплю 5% раствора хлорного железа и встряхивают. Смесь окрашивается в красный цвет.

Открытие аскорбиновой кислоты в шиповнике

Витамин С – аскорбиновая кислота является антицинготным или антискорбутным витамином. Витамин С содержится в хлорофиллоносных частях растений, ягодах, плодах, клубнях.

Аскорбиновая кислота легко окисляется при действии ферментов: аскорбиноксидазы, пероксидазы, полифенолоксидазы.

Метод определения аскорбиновой кислоты по Тольмансу основан на ее восстанавливающих свойствах. При титровании раствором дихлорфенолиндофенола происходит окисление аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую кислоту. Конец реакции можно установить по изменению окраски: восстановленная форма дихлорфенолиндофенола приобретает розовую окраску.

Аскорбиновая кислота, содержащаяся в вытяжке из шиповника, восстанавливает феррицианид калия (железосинеродистый калий) в ферроцианид (железистосинеродистый), который, взаимодействуя с хлорным железом, образует плохо растворимую в воде соль трехвалентного железа - берлинскую лазурь.

Ход работы

В пробирку вносят по 2 капли 5% раствора феррицианида калия и 1 каплю раствора хлорного железа. Жидкость приобретает бурую окраску. Затем добавляют 5-10 капель 1% вытяжки из шиповника (приготовленной из экстракта) и цвет раствора переходит в зеленовато-синий, после чего выпадает

осадок темно-синего цвета (берлинская лазурь), который при добавлении воды становится более отчетливым.

Обнаружение аскорбиновой кислоты в соке картофеля или капусты

Аскорбиновая кислота легко вступает в окислительно-восстановительные реакции, что используется для ее качественного обнаружения.

Оборудование и реактивы: сок картофеля; сок капусты (клубни картофеля или часть кочана капусты натрите на терке из нержавеющей стали или пластика, растертую массу отожмите через марлю, сложенную в два слоя); 5 %-ый раствор гексацианоферрата (III) калия; 5 %-ый раствор гидроксида калия; 10 %-ый раствор соляной кислоты; 1,5 %-ый раствор хлорида железа (III); 5 %-ый раствор нитрата серебра (сохраняют в темном месте); 10 %-ый раствор аммиака; дистиллированная вода, терка из нержавеющей стали или пластика; пробирки.

Ход работы

Восстановление ионов железа (III). В две пробирки налейте по 1 см³ сока картофеля и капусты, прибавьте по 2 капли раствора гидроксида калия и столько же раствора гексацианоферрата (III) калия.

Содержимое пробирок тщательно перемешайте, после чего в пробирки добавьте по 6-8 капель 10 %-го раствора соляной кислоты и 1-2 капли раствора хлорида железа (III). Выпадает синий или зеленовато-синий осадок берлинской лазури.

Восстановление ионов серебра. В пробирку налейте 1 см³ раствора нитрата серебра и добавьте по каплям раствор аммиака. Вначале образуется серый осадок, который растворяется в избытке аммиака.

Полученный аммиачный раствор оксида серебра разделите на две пробирки и добавьте в одну 1 см³ сока картофеля, а во вторую - 1 см³ сока капусты.

Пробирки поставьте в горячую (80 °С) воду на 5-10 минут. На стенках пробирок образуется зеркальный налет металлического серебра.

Количественное определение аскорбиновой кислоты в моче

Значение этого определения заключается в том, что между содержанием витамина в крови и моче существует соответствие, которое характеризует обеспеченность организма аскорбиновой кислотой. Однако при гиповитаминозе витамина С содержание его в моче не всегда уменьшается.

В основе метода лежит способность аскорбиновой кислоты обесцвечивать окрашенный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола путем его восстановления в кислой среде, предохраняющей витамин от разрушения.

Ход работы

В коническую колбу отмеривают 10 мл мочи и равное количество дистиллированной воды, перемешивают 1 мл концентрированной уксусной кислоты и титруют 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолом до розовой окраски. Расчет витамина С в моче производят по следующей формуле:

$$X = 0,088 \cdot A \cdot 1500/10$$

где: X – количество витамина (мг/сут); 0,088 – количество витамина С в миллиграммах, эквивалентное 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолдофенола, пошедшее на титрование (мл), 10 – количество миллилитров взятой мочи; 1500 – ориентировочное количество суточной мочи. У здоровых людей в моче содержится 2-6 мг% (0,02- 0,06 г/л) витамина С, а за сутки выделяется 24-75 мг (0,24-0,75).

Количественное определение рутина (витамина Р). Из ряда соединений, обладающих Витаминной активностью, наиболее изучен рутин, действие которого на организм связано с аскорбиновой кислотой. Рутин, как и витамин С, участвует в окислительно-восстановительных реакциях, влияет на проницаемость капилляров. Недостаточность витамина Р обычно сопутствует цинге. Наиболее богатыми источниками являются цитрусовые, чай, черная смородина.

В основу количественного определения рутина положена его способность окисляться перманганатом калия.

Ход работы

К 0,1 г чая приливают 50 мл горячей дистиллированной воды и кипятят 5 мин. Отбирают 10 мл экстракта чая в коническую колбу, куда добавляют 10 мл дистиллированной воды и 10 капель индигокармина в качестве индикатора. Титруют 0,05 N раствором перманганата калия до устойчивости желтой окраски. Расчет производят по формуле:

$$X = 3,2 \cdot A \cdot 50 \cdot 100 / 10 \cdot 0,1 \cdot 1000$$

где: X – количество рутина (мг%); 3,2 – стандартный пересчетный коэффициент титрования (1 мл 0,05 N раствора перманганата калия окисляет 3,2 мг рутина); A – количество миллилитра перманганата калия, прошедшего на титрование; 50 – количество миллилитров воды, добавленное к чаю для экстракции; 100 – коэффициент для пересчета; 10 – количество миллилитров экстракта, взятое для титрования; 0,1 – количество сухого вещества в граммах, взятое для анализа; 1000 – коэффициент пересчета (1 мг = 1000 мкг).

После приведения формула имеет следующий вид:

$$X = A \cdot 16 \text{ мг\%}$$

Для определения рутина в граммах на 1 кг массы тела следует воспользоваться формулой:

$$X = *0,16 \text{ г/кг} A$$

Примечание. Данную работу можно рекомендовать на группу из 3-4 учащихся. При этом экстракция чая делается одна на группу, а титрование и расчет производит каждый.

Опыт 2 Жирорастворимые витамины

Реактивы и оборудование: рыбий жир, хлороформ, концентрированная серная кислота, анилиновый реактив, 0, 1% спиртовой раствор витамина E, концентрированная азотная кислота

Открытие ретинола (витамина A) в рыбьем жире

Ретинол является производным каротина и представляет собой светло-желтое и вязкое масло, может быть выделен в виде кристаллов желтого цвета. Наиболее важным источником витамина A в нашей пище является листовая зелень.

Ретинол не растворяется в воде и хорошо растворяется в жирах и липоидных растворителях. Легко разрушается при окислении и при восстановлении, особенно при нагревании.

При взаимодействии хлороформного раствора рыбьего жира, содержащего витамин A, с концентрированной серной кислотой развивается красно-бурое окрашивание смеси. Предполагается, что в основе этой реакции лежит способность серной кислоты разрушать водную оболочку, в результате чего из нескольких молекул витамина образуется комплекс, имеющий характерное окрашивание.

Ход работы

На сухом часовом стекле смешивают 1 каплю рыбьего жира с 5 каплями хлороформа и 1 каплей концентрированной серной кислоты. Развивается фиолетово-красное окрашивание, быстро переходящее в бурое.

При отсутствии ретинола в пище у взрослых наблюдается потеря зрения в сумерках, у детей поражается роговая оболочка глаза и главным образом понижается сопротивляемость организма инфекционным заболеваниям.

Открытие холекальциферола (витамина D) в рыбьем жире

Отсутствие в пище кальциферола вызывает у детей рахит, а у взрослых остеопороз (хрупкость костей) и остеомаляцию (размягчение костей). Это происходит вследствие уменьшения содержания в костной ткани кальция и фосфора.

Кальциферол относится к группе стеролов, растворяется только в липоидных растворителях. Устойчив при нагревании только без доступа воздуха, в противном случае разрушается.

Нагревание рыбьего жира, содержащего витамин D, в присутствии анилина и концентрированной соляной кислоты приводит к развитию красного окрашивания.

Ход работы

На сухом часовом стекле смешивают 1 каплю рыбьего жира с 5 каплями хлороформа и 1 каплей анилинового реактива (15 частей анилина и 1 часть концентрированной соляной кислоты). Эмульсия окрашивается в желтый цвет, который при нагревании приобретает красную окраску.

Открытие токоферола (витамина E)

При действии концентрированной азотной кислоты на спиртовой раствор витамина E происходит его окисление, что сопровождается развитием красного окрашивания, свойственного продуктам окисления витамина.

Ход работы

В сухой пробирке смешивают при энергичном встряхивании 5 капель 0,1% спиртового раствора витамина Е и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Верхний масляный слой расслоившейся эмульсии окрашивается в красный цвет.

Контрольные вопросы:

- 1 Дайте определение понятиям: витамины, гиповитаминоз, авитаминоз, гипервитаминоз.
- 2 В чем заключается биологическое значение витаминов?
Перечислите основные источники витаминов.
- 3 Какова потребность в витаминах и от чего она зависит?
- 4 В состав каких коферментов входит тиамин, рибофлавин, пиридоксин, никотиновая кислота, пантотеновая кислота?
- 5 Перечислите симптомы пеллагры, бери-бери, цинги.
- 6 Почему водорастворимые витамины необходимо применять ежедневно?
- 6 Каково участие витамина А в процессах обмена веществ?
- 7 Каковы симптомы D-авитаминоза?
- 8 Каково участие витамина D в процессах обмена веществ?
- 9 Какие мероприятия необходимо проводить для профилактики рахита?
- 10 В чем основная причина и каковы признаки гипервитаминоза витаминов А и D?

Лабораторная работа №8 Открытие углеводов

Цель работы:

- 1 ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на углеводы;
- 2 закрепить представления об особенностях строения молекул углеводов;
- 3 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
- 4 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
- 5 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

К природным высокомолекулярным соединениям относятся углеводы, белки, нуклеиновые кислоты.

Углеводы (сахара) – обширная группа природных органических соединений, химическая структура которых часто отвечает общей формуле $C_n(H_2O)_n$, т.е. углерод + вода. Используемый термин возник более 100 лет назад, когда так называли природные соединения, отвечающие формуле $(CH_2O)_n$, т.е. гидраты углерода. Углеводы включают соединения, начиная с низкомолекулярных, содержащих всего несколько атомов углерода, до веществ, молекулярная масса которых достигает нескольких миллионов.

Реактивы и оборудование: 0,5 г α -нафтола, спирт, 0,5 г резорцина, 20% соляная кислота, 0,25 г орцина, 30% соляная кислота ($\rho = 1,15$ г/мл), 10% раствор хлорного железа, 13,3 г кристаллического сульфата меди, дистиллированная вода, едкий натр, глицерин, 1% раствор сахарозы, 1% спиртовой раствор тимола, 1% раствор фруктозы, 1% раствор пентозы, концентрированная соляная кислота, анилин, 10 % раствор гидроокиси натрия, фильтровальная бумага, 10% раствор уксусной кислоты, 1% раствор глюкозы, мальтозы, сахарозы и крахмала, 10% раствор гидроокиси натрия и 5% раствор сульфата меди, безводный карбонат натрия.

По химической природе углеводы представляют собой альдегиды или кетоны многоатомных спиртов. Для жизнедеятельности организма большое значение имеют отдельные представители моносахаридов (глюкоза, галактоза, фруктоза, рибоза, дезоксирибоза и др.), олигосахаридов (сахароза, лактоза и др.), полисахаридов (гликоген, крахмал), в том числе мукополисахаридов (гиалуроновая кислот, гепарин, хондроитинсульфаты и др.).

Приготовление реактивов: 0,5 г α -нафтола растворяют в 50 мл спирта. Перед употреблением разводят водой в 5 раз.

Реактив Селиванова: 0,5 г резорцина растворяют в 100 мл 20% соляной кислоты.

Орциновый реактив: 0,25 г орцина растворяют в 125 мл 30% соляной кислоты ($\rho = 1,15$ г/мл) к раствору добавляют 1 мл 10% раствора хлорного железа. Хранят в темной плотно закрытой склянке.

Реактив Гайнеса: а) 13,3 г кристаллического сульфата меди растворяют в 400 мл дистиллированной воды; б) 50 г едкого натра растворяют в 400 мл воды; в) 15 г глицерина растворяют в 800 л воды. Для приготовления реактива Гайнеса смешивают реактивы «а» и «б», после чего к ним прибавляют реактив «в».

Открытие крахмала

Ход работы

В пробирку вносят 10 капель 1% раствора крахмала и каплю 1% раствора йода в йодиде калия. Наблюдается сине-фиолетовое окрашивание.

Реакция на обнаружение углеводов

С помощью реакции с α -нафтолом или тимолом обнаруживаются незначительные количества углеводов или углеводных компонентов в сложных соединениях.

Ход работы

В две пробирки вносят по 10 капель 1% раствора сахарозы. Затем в одну из них добавляют 3 капли 1% спиртового раствора α -нафтола, а в другую – такое же количество 1% спиртового раствора тимола. В обе пробирки осторожно наслаивают по 0,5 мл концентрированной серной кислоты и на границе двух жидкостей наблюдают фиолетовое окрашивание в пробирке с α -нафтолом и красное в пробирке с тимолом.

Открытие фруктозы (реакция Селиванова)

Кетогексозы (фруктоза) при нагревании с соляной кислотой и резорцином дают вишнево-красное окрашивание.

Ход работы

В пробирку наливают 10 капель реактива Селиванова и 2 капли 1% раствора фруктозы и осторожно нагревают. Развивается красное окрашивание.

Открытие пентоз

Пентозы при нагревании с концентрированными кислотами теряют воду и превращаются в фурфурол, который при взаимодействии с орцином дает зеленое окрашивание, а с анилином – красное.

Ход работы

В пробирку наливают 10 капель орцинового реактива, нагревают до кипения и быстро добавляют 2-3 капли мочи или раствора пентозы. Развивается сине-зеленое окрашивание.

Пробирку с 10 каплями 1% раствора пентозы (рибоза, арабиноза, ксилоза) и 10 каплями концентрированной соляной кислоты осторожно нагревают до кипения, и после охлаждения вносят в нее 5 капель анилина и 5 капель ледяной уксусной кислоты. Раствор окрашивается в красный цвет.

Открытие лактозы

Ход работы

К 1 мл мочи добавляют 0,5 мл концентрированного аммиака и 3 капли 10% гидроокиси натрия. Нагревают до кипения. Появляется ярко-желтое окрашивание, свидетельствующее о наличии в моче лактозы и галактозы.

Открытие мукополисахаридов

Ход работы

15 капель мочи наносят на фильтровальную бумагу и высушивают. Затем опускают в раствор толуидинового синего, после чего бумагу отмывают 10% раствором уксусной кислоты. Пурпурная окраска свидетельствует о наличии в моче мукополисахаридов.

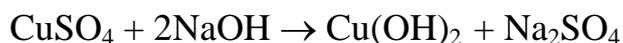
Свойства углеводов

Среди различных свойств углеводов их способность восстанавливать металлы из окислов широко используется для открытия углеводов в клинике, в частности для обнаружения глюкозы в крови и моче.

Реакции на восстанавливающие свойства сахаров

Моносахариды, как и некоторые дисахариды, имеющие свободную карбонильную группу (мальтоза, лактоза), обладают способностью восстанавливать в щелочной среде металлы из окислов в закисную форму или в свободное состояние.

а) **Реакция Троммера.** Глюкоза в щелочной среде восстанавливает окись меди в закись, а сама окисляется до глюконовой кислоты:



O
//

O
//

Cu₂O
↑



Ход работы

В 4 пробирки вносят по 10 капель последовательно в каждую 1% растворы глюкозы, мальтозы, сахарозы и крахмала, а затем добавляют по 10 капель 10% раствора гидроксида натрия и по 1 капле 5% раствора сульфата меди и осторожно нагревают до кипения. Выпадает красный осадок (Cu_2O) в пробирках №1 и №2.

б) Проба Гайнеса. Принцип метода заключается в способности глюкозы восстанавливать при нагревании в щелочной среде гидрат окиси меди в закись меди красного цвета.

Ход работы

К 3-4 мл реактива Гайнеса прибавляют 8-12 капель мочи. Нагревают верхнюю часть смеси. Наблюдают переход бледно-голубого цвета в желтый, а затем в красный.

Ориентировочный экспресс-метод определения сахаров

В клинике важное значение имеют методы, позволяющие быстро определять примерное количество сахара в моче. Данный метод основан на способности образовывать соединения различной окраски в зависимости от количества сахара в присутствии сульфата меди и карбоната натрия.

Ход работы

В ступке растирают в тонкий порошок 1 г сульфата меди с 10 г безводного карбоната натрия Na_2CO_3 . На предметное стекло насыпают немного порошка и наносят несколько капель мочи. Подогревают до кипения. Синий цвет означает отсутствие сахара, желто-зеленый цвет свидетельствует о наличии сахара в моче в пределах 0,5% (5 г\л), зеленый – 1% (10 г\л), красно-коричневый – до 2% (20 г\л) и интенсивно-красный цвет – свыше 2% (20 г\л).

Контрольные вопросы

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов
- 2 Дайте определение и проведите классификацию углеводов.
- 3 Функции углеводов в организме.
- 4 Классификация моносахаридов.
- 5 Строение молекулы глюкозы (доказательства строения, открытая, циклическая, проекционная формулы и формула Хеуорса)
- 6 Химические свойства глюкозы (реакции окисления, алкилирования, ацилирования, уменьшения и увеличения цепи)
- 7 Фруктоза: строение и свойства.
- 8 Сахароза: строение, свойства, гидролиз.
- 9 Крахмал: строение, амилоза, амилопектин, физические и химические свойства.

Лабораторная работа № 9 Открытие липидов (жиров)

Цель работы:

- 1 ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на липиды;
- 2 закрепить представления о структурах липидов;
- 3 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами; ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
- 4 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

Липиды (от греч. липос – жир) – низкомолекулярные органические соединения, практически нерастворимые в воде, которые могут быть извлечены из клеток неполярными органическими растворителями (хлороформ, бензол, петролейный эфир). Отличительным свойством липидов является их гидрофобность (липофильность). Липиды представляют собой разнородные химические соединения.

I Простые липиды:

- 1 ацилглицеролы (жиры, триглицериды и т.п.);
- 2 воска.

II Сложные липиды:

- 1 фосфолипиды
 - глицерофосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, кардиолипин, плазмалоген);
 - сфингофосфолипиды (сфингомиелин);
- 2 стероиды (холестерол, эргостерол, ланостерол, стигмастерол, эхдистероиды);
- 3 гликолипиды (цереброзиды, ганглиозиды, сульфатиды).

Для характеристики жира используют константы или жировые числа:

Кислотное число – масса КОН (мг), необходимая для нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г жира.

Число омыления – это масса КОН (мг), необходимая для гидролиза нейтральных липидов (омыления) и нейтрализации всех жирных кислот (в том числе и свободных), содержащихся в 1 г жира. Чем выше число омыления, тем больше низкомолекулярных кислот входит в состав жира.

Йодное число – это масса йода (г), связываемая 100 г жира. Йодное число характеризует степень ненасыщенности, так как присоединение йода происходит по месту разрыва кратных связей в остатке жирной кислоты. Чем больше йодное число, тем выше ненасыщенность жира.

Липиды широко применяют в медицине и технике. Из них получают основу для мазей, мыло (соли жирных кислот), масляные краски, олифу и т.п.

Реактивы и оборудование:

Жиры (говяжий, свиной, бараний) 10 г, масло (подсолнечное, касторовое, растительное) 10 г, толуол, ацетон, петролейный эфир, диэтиловый эфир,

гексан, этиловый спирт, серная кислота (конц.), соляная кислота (0,5н), соляная кислота (разб. 1:1), гидроксид калия (водный 0,1 н), гидроксид калия, (спиртовой раствор 0,5н), раствор гидроксида натрия (разб.), раствор карбоната натрия 10%, гидросульфат калия (безвод.), раствор нитрата серебра, аммиак (водный раствор), раствор фуксинсернистой кислоты, спиртовой раствор йода (0,2н), раствор тиосульфата натрия (0,1н), раствор крахмала 1 %, бромная вода, раствор гидроксида натрия 35 %; пробирки, колбочки для титрования, держатель, спиртовка, водяная баня, кристаллизатор со льдом, часовое стекло, бюретки.

Опыт 1 Растворимость жиров и масел

а) в 5 пробирок поместите по небольшому кусочку твердого жира (свиного, говяжьего и т.п.) и прилейте по 1 мл: 1 – воды, 2 – этанола, 3 – толуола, 4 – петролейного эфира, 5 – ацетона. Если жир не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости жира на холоде и при нагревании.

б) в 5 пробирок поместите по 0,5 мл растительного масла (подсолнечного, оливкового, кукурузного и т.п) и прилейте по 1 мл: 1 – воды, 2 – этанола, 3 – толуола, 4 – петролейного эфира, 5 – ацетона. Если масло не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости растительного масла на холоде и при нагревании.

Опыт 2 Гидролиз жиров и масел

а) В 2 пробирки поместите по небольшому кусочку жира и прилейте в 1 пробирку 1...2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую – 1...2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5...10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе жиров на холоду и при нагревании.

б) в 2 пробирки поместите по 0,5 мл растительного масла и прилейте в 1 пробирку 1...2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую – 1...2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5...10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе растительного масла на холоде и при нагревании.

Опыт 3 Выделение жира из молока

К 6 мл цельного молока прибавляют 2 мл 10 %-ного раствора Na_2CO_3 , хорошо перемешивают и взбалтывают с 5 мл эфира. Эфирный слой помещают в чашечку для выпаривания на водяную баню (под тягой). После испарения эфира остается сливочное масло – молочный жир.

Опыт 4 Определение ненасыщенности кислот в составе жира

В пробирку поместите 2–3 капли масла (жира) и 8 – 10 капель бромной воды. Пробирку встряхните.

Аналитический эффект: Обесцвечивание бромной воды

Опыт 5 Определение йодного числа

В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают 3...4 капли масла (жира).

Колбу повторно взвешивают на аналитических весах. По разности весов рассчитывают массу навески масла (жира). В колбу добавляют 25 мл спирта (при плохой растворимости слегка подогревают на водяной бане). Затем в колбу вносят 12,5 мл 0,2н спиртового раствора йода (из бюретки), 100 мл воды и перемешивают 5 мин. Содержимое колбы титруют 0,1н раствора тиосульфата натрия до появления слабо желтого окрашивания.

Для более точного определения в колбу приливают 1 мл раствора крахмала и титрование заканчивают до исчезновения синего окрашивания.

Опыт повторяют – контроль, но без масла (жира).

Расчет йодного числа проводят по формуле:

$$\text{И.ч.} = (V_2 - V_1) \cdot 0,0127 \cdot 100/m,$$

где V_2 – объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование контроля; V_1 – объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование пробы масла; 0,0127 – титр тиосульфата по йоду; m – навеска масла (г)

Опыт 6 Определение кислотного числа

В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают примерно 2 мл масла (жира) – 2...3 г. Колбу повторно взвешивают на аналитических весах. По разности рассчитывают массу навески масла (жира) \approx 2...3 г. В колбочку добавляют 10...15 мл смеси спирта с эфиром (1:1), 1...2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н раствор КОН до появления слабо-розового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать в течение 0,5...1 мин.

Кислотное число рассчитывают по формуле:

$$\text{К.ч.} = V \cdot T/m,$$

где К.ч. – кислотное число; V – объем (мл) спиртового раствора КОН, пошедшего на титрование (мл); T – титр 0,1 н раствора КОН; m – масса навески масла (жира), г.

Опыт 7 Омыление жиров

В фарфоровую чашечку поместите 0,5 мл касторового масла (жира) и 4 капли 35 %-ного раствора гидроксида натрия. Тщательно размешайте смесь стеклянной палочкой до получения однородной эмульсии и поставьте на песчаную баню. Продолжайте тщательно размешивать смесь до получения однородной прозрачной слегка желтоватой жидкости. Затем добавьте 2 мл дистиллированной воды и вновь нагрейте, тщательно перемешивая до

полного удаления воды. В результате получается кусочек твердого белого мыла.

Опыт 8 Определение числа омыления

В 2 колбочки помещают: 1...0,5 г жира (навеска на аналитических весах), 2...0,5 мл воды. Затем в обе колбочки добавляют по 15 мл 0,5н спиртового раствора КОН. Колбочки закрывают пробками, соединенными с обратными холодильниками, и кипятят на водяной бане 30...40 минут.

После охлаждения в колбочки прибавляют по 15...20 мл воды, 3–4 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,5н раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания.

Расчет числа омыления проводят по формуле:

$$\text{Ч.о.} = (V_2 - V_1) \cdot 28/m,$$

где Ч.о. – число омыления; V_2 – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование контроля; V_1 – объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование пробы масла; m – навеска масла (г); 28 – масса КОН в 1 мл спиртового раствора.

Контрольные вопросы

- 1 Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
- 2 Дайте определение и проведите классификацию липидов.
- 3 Укажите функции липидов в организме.
- 4 Особенности высших жирных кислот, входящих в состав липидов человека.
- 5 Приведите примеры качественных реакций, доказывающих неперелый характер ВЖК.
- 6 Напишите структурные формулы представителей простых и сложных липидов: ТАГ, фосфолипидов, холестерина.
- 7 Какие реакции лежат в основе омыления жира?
- 8 Какие числа характеризуют состав и строение липидов?
- 9 Перечислите компоненты, участвующие в переваривании жиров.
- 10 Значение ВЖК, холестерина в метаболических процессах.

Лабораторная работа № 10 Обмен простых белков

Цель работы:

1 проследить при помощи хроматографии распределение аминокислот в соответствии с их растворимостью в органических растворителях,

2 практически наблюдать действие фермента желудочного сока пепсина, трипсина, липазы на разрыв пептидных связей и денатурацию белка.

- 3 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
- 4 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
- 5 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе

Реактивы и оборудование: хроматографическая бумага, аланин, лейцин, глутаминовая кислота, чашка Петри, водонасыщенный раствор фенола, 0,1% спиртовой раствор нингидрина.

В организме белки распадаются до аминокислот, которые поступают к органам и тканям, где используются для биосинтеза белков, а также подвергаются различным превращениям. Часть аминокислот и их конечные продукты распада переносятся в кровь и в почки, а затем выделяются с мочой. Содержание аминокислот в крови является относительно постоянным и служит одним из показателей состояния белкового обмена в организме.

Хроматографический метод определения аминокислот. Разделение смеси аминокислот с помощью радиальной хроматографии

Этот метод был впервые предложен в 1903 г. русским ученым М.С. Цветом. В настоящее время он широко применяется для разделения и количественного определения белков, аминокислот, и многих других веществ в крови и в моче.

Он основан на различной способности аминокислот растворяться в органических растворителях.

Для разделения аминокислот наиболее доступным и сравнительно точным методом служит метод распределительной хроматографии на бумаге. Для этих целей необходима хроматографическая бумага, которая служит адсорбентом и где происходит передвижение аминокислот (также может быть использована фильтровальная бумага хорошего качества), водонасыщенный органический растворитель, в качестве которого применяют фенол, смесь бутилового спирта, уксусной кислоты или муравьиной.

Выполнение метода заключается в том, что на хроматографическую бумагу (ближе к концу) наносят исследуемую смесь аминокислот. Этот конец бумаги подсушивают, помещают в растворитель, который вследствие капиллярности бумаги постепенно всасывается в неё. По ходу передвижения растворителя смесь аминокислот будет в нем растворяться и передвигаться. Причем те аминокислоты, которые хорошо растворяются в органическом растворителе, будут переноситься по бумаге дальше, те аминокислоты, растворимость которых хуже, пройдут более короткий путь. Когда фронт растворителя будет приближаться к другому концу бумаги, процесс прекращается. Бумагу высушивают в шкафу и затем проявляют – обрабатывают реагентом, который даст с аминокислотами цветную реакцию. Отдельные аминокислоты обнаруживаются в виде окрашенных пятен, находящихся на разном расстоянии от места нанесения аминокислот (линия старта). Скорость передвижения может быть выражена с помощью коэффициента распределения R_f , который представляет собой отношение расстояния (в миллиметрах),

пройденного данной аминокислотой от линии старта до середины её пятна (а), к расстоянию от места нанесения смеси аминокислот до фронта растворителя (б):

$$R_f = \frac{a}{b}$$

Коэффициент распределения является величиной постоянной для данной аминокислоты при данных условиях.

Ход работы

Бумажный диск хроматографической бумаги, диаметром 12 см делят простым карандашом на четыре части. В центре диска делают небольшой вырез (диаметром 0,5-1 см). В каждом секторе на расстоянии 3-4 мм от разреза в центре диска наносят карандашом точку (линия старта). Затем в отмеченную точку каждого сегмента наносят капилляром небольшую каплю растворов различных аминокислот (целесообразно использовать аланин, лейцин, глутаминовую кислоту и соответственно их смесь, так как коэффициенты распределения этих аминокислот сильно разнятся). Бумагу подсушивают. Из такой же бумаги делают небольшой фитилек и вставляют его в разрез в центре диска. Затем хроматограмму с фитильком помещают на чашку Петри, куда предварительно наливают водонасыщенный раствор фенола так, чтобы фитилек его касался. Чашку Петри накрывают крышкой и оставляют под вытяжкой при комнатной температуре на 1 час, т.е. до тех пор, пока фронт растворителя не дойдет до конца хроматограммы около 1 см. затем, хроматограмму вынимают и высушивают в сушильном шкафу при 80-100⁰С для испарения фенола и фиксации аминокислот. После чего хроматограмму проявляют, обрабатывая её 0,1% спиртовым раствором нингидрина с помощью пипетки или пульверизатора, и вновь высушивают при 100⁰С 5-8 минут. На проявленной хроматограмме в трех секторах будет по одному пятну и в четвертом три пятна, соответствующих аминокислотам в исследуемой смеси. Рассчитывают коэффициенты распределения отдельных аминокислот и аминокислот, находящихся в смеси. Затем, сравнивая их, определяют, какие же аминокислоты входили в состав смеси.

Контрольные вопросы:

- 1 Дайте определение понятиям: катаболизм, анаболизм, ассимиляция, диссимиляция. Что понимают под обменом веществ, или метаболизмом?
- 2 Дайте определение понятиям: промежуточный обмен, энергетический обмен, источники энергии.
- 3 Дайте характеристику этапам освобождения энергии в организме.
- 4 Напишите формулу ацетил-КоА и укажите на его биологическое значение.
- 5 Напишите словами названия соединений, участвующих в цикле Кребса.
Каково биологическое значение цикла Кребса?

Укажите, в ходе каких реакций в цикле Кребса происходит выделение водорода, углекислого газа.

6 Что представляет собой цепь биологического окисления и каково ее значение? Что происходит с водородом (электроном) в цепи биологического окисления?

7 Дайте определение понятиям: макроэргическая связь, макроэргические вещества – приведите примеры; окислительное и субстратное фосфорилирование.

8 Сколько молекул АТФ образуется в цепи биологического окисления, если первичным акцептором водорода является НАД, ФАД?

9 Напишите формулу АТФ и укажите ее значение. Назовите методы, с помощью которых можно изучать энергетический обмен?

Лабораторная работа № 11 Обмен сложных белков

Цель работы:

1 определить конечные продукты обмена нуклеопротеидов – мочевую кислоту, аммонийные соли;

2 научиться обнаруживать билирубин в крови, а также желчные кислоты в моче и уробилина в моче.

3 выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;

4 ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;

5 привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе

Реактивы и оборудование: порошок мочевого кислоты, концентрированная азотная кислота, аммиак, гидроокись натрия, насыщенный раствор $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 5%-ный раствор бензида, 3%-ный раствор перекиси водорода, сыворотка крови, этиловый спирт, 5 г сульфаниловой кислоты, дистиллированная вода, концентрированная соляная кислота, 0,5% раствор нитрата натрия, концентрированный раствор хлорида бария, 25%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, желчь, концентрированная серная кислота, серный эфир

Обмен нуклеопротеидов

Обнаружение мочевого кислоты. Мочевая кислота является конечным продуктом обмена пуриновых оснований, входящих в состав нуклеопротеидов. Её открытие основано на том, что при окислении мочевого кислоты образуется пурпурная кислота, которая при взаимодействии с аммиаком образует окрашенное соединение – аммонийную соль пурпурной кислоты (мурексид).

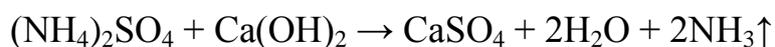
Ход работы

В фарфоровую чашку вносят небольшое количество (с булавочную головку) порошка мочевого кислоты, прибавляют 1-2 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно, нагревая не выше 70°C , выпаривают досуха, сдувая образующиеся пары низших окислов азота. Образуется коричнево-красный осадок. После охлаждения с одного края чашки добавляют 1 каплю

аммиака, при этом развивается пурпурно-красное окрашивание, а с другого края добавляют 1 каплю гидроокиси натрия или калия – появляется фиолетовое окрашивание.

Обнаружение аммонийных солей. Аммиак, образующийся в организме, представляет собой конечный продукт распада аминокислот. Он является токсичным, и поэтому организм выработал механизмы его обезвреживания. К ним относятся образование мочевины, амидов глутаминовой и аспарагиновой кислот – глутамина и аспарагина, восстановительное аминирование α -кетоглутаровой кислоты и связывание аммиака кислотами в виде аммонийных солей. На долю последних приходится около 4-5% от общего количества азота, определяемого в моче.

В основе этого метода лежит реакция разложения аммонийных солей с выделением свободного аммиака:



Ход работы

В пробирку наливают 2-3 мл мочи и 1-2 мл насыщенного раствора $\text{Ca}(\text{OH})_2$, перемешивают и подносят к отверстию пробирки, не прикасаясь к её стенкам, лакмусовую бумагу, смоченную водой. Через некоторое время бумага приобретает синий цвет, за счет поглощения выделяющегося аммиака.

Обмен хромопротеидов

Гемоглобин как представитель хромопротеидов, в тканях организма распадается с образованием вердоглобина, биливердина и, наконец, билирубина. Последний поступает в кровь и транспортируется в печень. По крови билирубин переносится в основном (75%) в соединении с белками (свободный билирубин) и лишь небольшая часть (25%) в комплексе с глюкуроновой кислотой (связанный билирубин). В печени весь билирубин превращается в диглюкоронид – билирубин и поступает в желчный пузырь, где входит в состав желчи и называется желчным пигментом. Кроме билирубина, к желчным пигментам относятся и некоторые его производные, в том числе и биливердин. С желчью желчные пигменты поступают в кишечник, где билирубин подвергается различным превращениям и в виде стрекобилина обнаруживается в кале, а в виде уробилина – в моче. Уровень билирубина и его производных в крови характеризует обмен гемоглобина. Изменение их содержания обнаруживается при желтухе.

Бензидиновая проба на кровь. Гемоглобин разлагает перекись водорода на воду и кислород, который окисляет бензидин с образованием веществ синей и зеленой окраски.

Ход работы

В пробирку наливают 10 капель разведенной крови, такое же количество 5%-ного раствора бензидина и 2 капли 3%-ного раствора перекиси водорода. Развивается синее или зеленое окрашивание.

Открытие билирубина

а) Открытие свободного билирубина

Ход работы

В пробирку отмеривают 1 мл сыворотки крови, 2 мл этилового спирта, перемешивают и фильтруют. К фильтрату добавляют 5 капель свежеприготовленного диазореактива. Развивается красно-розовое окрашивание.

Приготовление диазореактива: (а) раствор 1:5 г сульфаниловой кислоты растворяют при подогревании в 300-400 мл дистиллированной воды, прибавляют 15 мл концентрированной соляной кислоты и доводят водой до 1 л; б) раствор 2: 0,5% раствор нитрата натрия. Перед употреблением смешивают 10 мл раствора а) с 0,3 мл раствора б).

б) Открытие связанного билирубина

Ход работы

На часовое стекло наносят 1 каплю сыворотки крови и добавляют 3 капли диазореактива. Перемешивают палочкой. Образуется характерное для билирубина красное окрашивание.

в) Проба Гаррисона

Ход работы

Полоску фильтровальной бумаги пропитывают концентрированным раствором хлорида бария и высушивают. Затем её помещают на 1 мин в мочу и снова высушивают, после чего наносят 3 капли 25%-ной трихлоруксусной кислоты. При наличии в моче билирубина развивается зеленое окрашивание.

Реакции на желчные пигменты

Качественные реакции на желчные пигменты основаны на получении окрашенных продуктов окисления билирубина: - биливердина – зеленого, билицианина – синего, холетелина – желтого цвета.

а) Проба Розенбаха

Ход работы

2 мл желчи в разведении 1:5 несколько раз профильтровывают через фильтр, после чего в конус фильтра вносят 1 каплю концентрированной азотной кислоты и наблюдают появление цветных колец.

б) Обнаружение уробилина в моче (проба Флоранса)

Один из продуктов превращения билирубина в кишечнике – стрекобилиноген – через систему геморроидальных вен поступает в почки, а оттуда в мочу. Выводимый с мочой стрекобилиноген называется уробилиногеном и на воздухе окисляется в уробилин.

Ход работы

К 4 мл исследуемой мочи добавляют 3 капли концентрированной серной кислоты и 1,5 мл серного эфира: содержимое пробирки осторожно перемешивают. Верхний слой (эфирную вытяжку) отсасывают пипеткой с грушей и переносят в другую пробирку с 10 мл концентрированной соляной

кислоты. На границе жидкостей появляется розовое или красное кольцо, характерное для уробилина.

Контрольные вопросы:

1 В чем заключается значение белков пищи для организма? Дайте определение понятиям: заменимые и незаменимые аминокислоты, полноценные и неполноценные белки, норма белка в питании.

2 Что такое азотистый баланс организма, перечислите его виды. Дайте определение понятия «белковые резервы организма»

3 Перечислите протеолитические ферменты пищеварительного тракта.

4 Назовите пути активации протелитических ферментов.

5 Перечислите основные этапы биосинтеза белка. Дайте определение понятиям: кодон, антикодон, триплет. Что лежит в основе определенной последовательности аминокислот в первичной структуре данного белка?

6 В чем заключается процесс дезаминирования аминокислот? Напишите

7 дезаминирование глутаминовой кислоты.

8 В чем сущность переаминирования, напишите общую схему процесса. Укажите на клиническое значение определения активности аминотрансфераз в крови.

9 Дайте определение понятий: восстановительное аминирование, непрямое

10 дезаминирование. Какими путями дезаминируются аминокислоты в организме?

11 Напишите схематично дезаминирование аланина, серина.

12 Назовите процессы обезвреживания аммиака. В виде каких соединений он

13 выводится из организма? В чем сущность процесса синтеза мочевины? Кто впервые предложил принципиальную схему этого процесса? Дайте характеристику этапов синтеза мочевины. Напишите реакции этапов.

14 Укажите на значение отдельных аминокислот в обмене веществ.

15 Перечислите наследственные заболевания, в основе которых лежат нарушения синтеза белка.

Лабораторная работа №12 Обмен углеводов

Цель:

1 изучить обмен углеводов, наглядно показать процессы, протекающие в организме при переваривании углеводов в пищеварительном тракте;

- 2 изучить влияние слюны, желудочного сока и панкреатина (ферментный препарат из поджелудочных желез убойного скота) на полисахарид пищи – крахмал.

Реактивы и оборудование: Раствор крахмала, раствор панкреатина, дистиллированная вода.

В организме человека и животных углеводы выполняют разнообразные функции. Они служат источником энергии, являются пластическим материалом для построения клеток, а также используются в качестве исходных продуктов для синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот. Организм человека и животных не способен синтезировать углеводы из неорганических веществ и получает их в готовом виде с различными пищевыми продуктами, главным образом растительного происхождения. Суточная норма потребления углеводов равна 450-500 г. Углеводы, поступившие в организм, подвергаются перевариванию в пищеварительном тракте и всасываются в кровь в виде моносахаридов, в основном глюкозы. В крови всегда находится определенное количество глюкозы (3,5-6,7 ммоль/л). В тканях часть глюкозы откладывается в виде гликогена.

Опыт 1 Переваривание углеводов в пищеварительном тракте

Ход работы

В три пробирки приготовьте инкубационные смеси, как указано в таблице.

Таблица 8 – Приготовление растворов

№ пробы	Раствор крахмала, мл	Слюна, мл	Раствор крахмала, мл	Панкреатин, мл	Вода, мл
1	1	1	-	-	1
2	1	1	1	-	-
3	1	-	-	2	-

Пробирки встряхните и поставьте в термостат при температуре 37⁰С на 30 мин. После инкубации содержимое каждой пробирки проанализируйте на присутствие продуктов расщепления полисахарида с помощью реакции Троммера, для чего прибавьте к раствору реактив Фелинга и поместите пробирки на кипящую водяную баню на 10 мин.

Появление красного осадка оксида меди (I) указывает на положительную реакцию Троммера в присутствии глюкозы и мальтозы.

Запишите результаты опыта в протокол и сделайте выводы.

Контрольные вопросы:

- 1 Гликолиз и гликогенолиз, их сходство и отличие

- 2 Аэробный и анаэробный распад, их сущность
- 3 Какова структура амилозы и амилопектина?
- 4 Дайте определение понятиям: гомополисахариды, гетерополисахариды.
- Какие компоненты входят в состав мукополисахаридов?
- 5 Основные пути распада углеводов в организме (схема).
- 6 Напишите уравнения реакции промежуточного обмена и расставьте степени окисления (если необходимо), укажите тип реакции.
- 7 Сущность аэробного процесса.
- 8 Сущность анаэробного процесса.

Лабораторная работа №13 Обмен липидов

Цель работы:

- 1 изучить обмен липидов;
- 2 практически исследовать действие ферментов поджелудочной железы на липиды;
- 3 провести качественные реакции на желчные кислоты, кетоновые тела.

Понятие «липиды» более широкое, чем жиры, и охватывает, помимо собственно жиров, также и жироподобные вещества, или липоиды: фосфатиды и стериды.

Общим свойством всех липидов является растворимость в жировых растворителях: диэтиловом эфире, хлороформе, бензоле, сероуглероде, петролейном эфире, горячем спирте в др. и нерастворимость в воде.

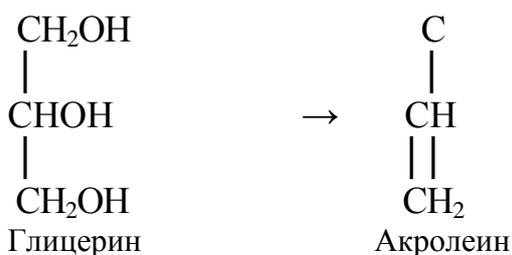
Липиды широко распространены в живой природе и встречаются практически в каждой клетке. Многие липиды и их производные представляют собой биологически активные вещества. Липоидами особенно богата нервная ткань, половые железы, сперма, кора надпочечников.

Собственно жиры играют большую роль в питании (коровье масло, сало, растительные масла и т.п.) благодаря своей высокой калорийности. Кроме того, отложенные в организме жиры (жировая ткань) являются запасными питательными веществами, а также предохраняют внутренние органы от механических повреждений и организм от охлаждения.

Важную биологическую роль играют стероиды и их производные (половые гормоны, желчные кислоты и т.п.).

Жиры дают характерное масляное пятно, например, на бумаге. Реакцией на присутствие жира может служить так называемая акролеиновая проба. Акролеиновой пробой открывается в жирах глицериновый остаток, который при нагревании жира частично переходит в свободный глицерин. Глицерин далее теряет воду и образует ненасыщенный альдегид - акролеин, легко обнаруживаемый по специфическому раздражающему запаху.

Н О
 \ //



Акролеин может образоваться при пережаривании пищи и от его присутствия в значительной мере зависит резкий, удушливый запах кухонного чада. Акролеиновую пробу производят, нагревая жир в присутствии бисульфита калия или натрия (в качестве водоотнимающего средства).

Липиды, не содержащие глицерина (воск, жирные кислоты, стеринны т.п.), акролеиновой реакции не дают.

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

В процессе переваривания и всасывания липидов важную роль играют желчные кислоты. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов переваривания.

Опыт 1 Качественная реакция на желчные кислоты.

Принцип метода. Желчные кислоты можно открыть реакцией Петтенкофера. При взаимодействии желчной кислоты с оксиметилфурфуролом, образующимся из тростникового сахара под действием концентрированной серной кислоты, появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Реактивы и оборудование: 1. Сахароза, 20%-ный раствор, свежеприготовленный. 2. Серная кислота концентрированная. 3. Чашка Петри (сухая). 4. Стекланные палочки. 5. Желчь, разведенная в 2 раза.

Ход работы

На сухую чашку Петри (под которую подложить лист белой бумаги) нанести 2 капли желчи, 2 капли 20%-ного раствора сахарозы и тщательно перемешать. Стекланной палочкой. Затем прилить 7 капель концентрированной серной кислоты и перемешать той же палочкой. Через 2-3 минуты наблюдается красное окрашивание, которое при стоянии переходит в красно-фиолетовую.

Опыт 2 Действие фосфолипаз поджелудочной железы

Принцип метода: Об активности фосфолипаз поджелудочной железы судят по появлению свободной фосфорной кислоты, способной образовывать желтый осадок при нагревании с молибдатом аммония.

Реактивы и оборудование . 1 Панкреатин, 5%-ный раствор. 2 Молибденовый реактив. 3 Лецитин, 1%-ная суспензия в воде (1 желток в 150-300 мл воды).

Ход работы

В две пробирки наливают по 5 капель суспензии яичного желтка. В 1-ю пробирку добавляют 2 капли панкреатина, а во вторую – 2 капли воды. Обе пробирки помещают в термостат при 38⁰С на 30 мин. После инкубации в обе пробирки наливают по 5 капель молибденового реактива, нагревают их на пламени спиртовки и охлаждают водой под краном.

Приготовление молибденового реактива: 7,5 г молибдата аммония растворить в 100 мл воды, прибавить 100 мл 32%-ного раствора азотной кислоты ($\rho = 1,2$ г/мл). наблюдать растворение молибдата аммония

Приготовление панкреатина 5%-ный раствор – 5 г. сухого панкреатина растворяют в 40-50 мл 2%-ного раствора NaHCO₃ и приливают 50-60 мл воды так, чтобы реакция среды на фенолфталеин была слабощелочной (рН 8,0).

Опыт 3 Эмульгирование жира

Жиры и другие липиды нерастворимы в воде, но растворяются во многих органических жидкостях. С водой жир может образовать эмульсию, т.е. дисперсную систему из двух несмешивающихся жидкостей. Эмульсия, однако, неустойчива и при стоянии жир вновь всплывает на поверхность, образуя два слоя - жировой и водный. Если же к смеси добавить немного белка или щелочи, мыла, щелочно реагирующих солей (соды), желчи или некоторых других веществ (эмульгаторы, детергенты), то при взбалтывании эмульсия станет устойчивой. Стойкость эмульсии зависит от того, что эти вещества понижают поверхностное натяжение между поверхностными слоями жировых шариков и раствором белка или мыла, получающегося при взаимодействии жира со щелочами. Понижение поверхностного натяжения препятствует слипанию жировых капель и благодаря этому удерживает эмульсию в стойком состоянии. Примером такой эмульсии может служить молоко. Желчь в особенности обладает свойством эмульгировать жиры, так как содержит соли желчных кислот, сильно понижающих поверхностное натяжение. Это свойство желчи имеет большое значение для переваривания жиров в организме, так как во много раз увеличивает поверхность соприкосновения жира с липазой поджелудочной железы.

Реактивы и оборудование: 1. Растительное масло, 2. Дистиллированная вода, 3. Желчь 4. Едкий кали 5. Карбонат натрия, 6. Белок 7. Пробирки.

Ход работы

В 5 пробирок помещают по 2 капли растительного масла, по 1 мл дистиллированной воды и по 5 капель соответственно в каждую пробирку,

начиная с первой: желчи, едкого кали, карбоната натрия, белка и воды. Пробирки встряхивают и наблюдают образование устойчивых эмульсий во всех пробирках, кроме 5-й, где происходит расслаивание на жир и воду.

Опыт 4 Проба на понижение поверхностного натяжения

Реактивы и оборудование: 1. Пробирки. 2. Желчь, в разведении 1:5 3. Дистиллированная вода. 4. Серный цвет

Ход работы

Берут 3 пробирки. В 1-ю вносят 2 мл желчи, в разведении 1:5, во 2-ю – 0,5 мл разведенной желчи и 1,5 мл воды, а в 3-ю – 2 мл дистиллированной воды. Затем все пробирки ставят на 5 минут в холодную воду и всыпают на конце шпателя серный цвет. Замечают результат: в 1-ой пробирке вся сера опустилась на дно, во 2-ой на дне обнаруживается часть серы., а в 3-ей вся сера опустилась на дно. Следовательно, желчные кислоты снижают поверхностное натяжение.

Опыт 5 Реакции на ацетоновые тела

а) Реакция на образование йодоформа

Реактивы и оборудование: 1. 0,5%-ный раствор ацетона. 2. 10%-ный раствор гидроксида натрия, 3. Йод в йодиде калия (раствор Люголя)

Ход работы

В пробирку вносят 10 капель 0,5%-ного раствора ацетона, 10 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия, и несколько капель йода в йодиде калия (раствор Люголя) и наблюдают образование желтого осадка йодоформа. Аналогичную реакцию проводят с мочой.

б) Реакция с нитропруссидом натрия

Реактивы и оборудование: 1. 0,5%-ный раствор ацетона. 2. 0,5%-ный раствор ацетоуксусной кислоты 3. Ледяная уксусная кислота 4. 10%-ный раствор нитропрусида натрия 5. Концентрированный раствор аммиака

Ход работы

В одну пробирку наливают 10 капель 0,5%-ного раствора ацетона, а в другую – такое же количества 0,5%-ного раствора ацетоуксусной кислоты. Затем в обе пробирки прибавляют по 5 капель ледяной уксусной кислоты и по 3 капли 10%-ного раствора нитропрусида натрия. Встряхивают, после чего осторожно наслаивают по 0,5 мл концентрированного раствора аммиака. На границе двух жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо. Аналогичную реакцию проделывают с мочой.

в) Реакция на ацетоуксусную кислоту

Реактивы и оборудование: 1. 0,5%-ный раствор ацетоуксусной кислоты 2. 10%-ный раствор хлорного железа 3. Раствор нитропрусида натрия.

Ход работы

Приливают в пробирку 10 капель 0,5%-ного раствора ацетоуксусной кислоты и 2 капли 10%-ного раствора хлорного железа. Возникает вишнево-красное окрашивание. При выполнении аналогичной реакции с мочой надо учесть, что после добавления первых двух капель раствора хлорного железа

образуется осадок фосфата железа. Поэтому для получения характерного окрашивания необходимо добавить еще 1-2 капли раствора нитропруссид натрия.

Лабораторная работа № 14 Переваривание жиров

Липаза содержится в семенах растений, особенно много ее в семенах клещевины. Липаза клещевины не растворяется в воде и проявляет свое действие в слабо кислой среде при рН 5, 0-4, 8.

Липаза злаков отличается от липазы клещевины тем, что проявляется свое действие при рН 8,0 и растворяется в воде.

Переваривание (гидролиз) жиров у человека начинается, хотя и в незначительной степени, в желудке. Главным местом переваривания жиров является двенадцатиперстная кишка. Масла представляют собой смеси сложных жирных кислот и глицерина. Кроме того они содержат фосфатиды.

Качество масла характеризуется рядом физических и химических показателей (коэффициент преломления, кислотное число, йодное число, эфирное число, число омыления). Но самым существенным показателем качества масла является содержание в нем отдельных жирных кислот, главным образом, ненасыщенных - олеиновой, линолевой и линоленовой. Ненасыщенные жирные кислоты определяют пищевую ценность масла, т.к. они необходимы для нормального обмена веществ в животном и человеческом организме.

Ненасыщенные жирные кислоты легко окисляются, присоединяя кислород по двойным связям. При этом образуются перекиси и гидроперекиси, которые, в свою очередь, являются сильными окислителями других жирных кислот. Именно, вследствие окисления жира происходит его прогоркание.

Расщепление растительного жира с образованием глицерина и свободных жирных кислот происходит так же под действием фермента липазы.

Липаза панкреатического сока выделяется поджелудочной железой частично в неактивном состоянии, неактивная липаза под действием желчи переходит в активную. В кишечном соке также содержится липаза.

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

Реактивы и оборудование: материал поджелудочной железы, ступка, фильтры, колбы, бюретки, молоко, липаза, желчь, водяная баня, дистиллированная вода, 0,1н щелочь, фенолфталеин.

Ход работы

1 Очищают поджелудочную железу от жира и измельчают ее ножницами.

2 Около 5 г измельченной поджелудочной железы помещают в ступу и тщательно растирают с 10-15 мл воды в течение 4-5 минут,

3 Полученную смесь отфильтровывают в пробирку через 2-3 слоя

марли.

4 В 2 колбы (№ 1 и 2) отмеривают цилиндром по 50 мл молока и добавляют в каждую колбу по 2 мл отфильтрованной вытяжки липазы. В колбу № 1 добавляют, кроме того, 5-6 капель желчи (для активирования липазы).

5 Быстро перемешивают содержимое каждой колбы. Сейчас же отбирают по 10 мл жидкости и переносят их в две другие колбы (для титрования).

6 Первые две колбы (№ 1 и 2) помещают в водяную баню при 37°C.

7 В колбы для титрования прибавляют по 10 мл дистиллированной воды и по 2-3 капли раствора фенолфталеина.

8 Оттитровывают содержимое каждой колбы 0,1н щелочью до слабо розового окрашивания при непрерывном и тщательном помешивании. По окончании титрования записывают результаты, содержимое выливают, и колбы тщательно моют.

9 Еще 3-4 раза каждые 15 минут берут из колбы № 1 и 2 пробы по 10 мл и оттитровывают их с водой и фенолфталеином, как описано выше.

10 Сравнивают объем 0,1н щелочи, пошедшие на титрование каждой пробы из колб № 1 и 2 и откладывая их по времени, вычеркивают кривые расщепления жира.

Так как гидролиз идет постепенно, количество освобождающихся жирных кислот нарастает во времени.

Как видно из приведенного примера, желчь (собственно соли желчных кислот) имеет большое значение для переваривания даже такого сильно эмульгированного жира, как жир молока. Роль желчи для переваривания других жиров еще важнее, так как, помимо активации липазы, желчь переводит жиры в эмульгированное состояние (а также способствует всасыванию жирных кислот). При недостаточном поступлении желчи в кишечник жиры переходят в кал почти неизменными. Так, например, при закупорке желчного протока в кале обнаруживается много неусвоенного жира.

Контрольные вопросы:

1 Перечислите основные этапы обмена жиров. Охарактеризуйте распад триглицеридов.

2 Как происходит окисление жирных кислот? Какова его энергетическая ценность? Что такое липиды? Перечислите основные функции липидов.

3 Напишите формулу триацилглицерина, состоящего из пальмитиновой, стеариновой и линолевой жирных кислот.

4 Укажите на различия в структуре и свойствах насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Приведите примеры.

5 Что такое глицерофосфатиды? Перечислите их свойства.

6 Напишите формулу фосфатидилхолина, фосфатидилсерина.

7 Дайте определение понятиям сфингомиелины, гликолипиды,

липопротеиды.

8 Напишите формулу холестерина и укажите на его значение.

Лабораторная работа № 15 Водный и минеральный обмен

Цель работы:

Научиться определять минеральные вещества в моче на основе качественных реакций на катионы металлов и анионы кислот.

Реактивы и оборудование: дистиллированная вода, индикатор, нитрат ртути, 2 н. азотная кислоты, 1%-ного раствор нитрата серебра, 10%-ный раствор азотной кислоты, 10%-ный раствор соляной кислоты, 5%-ный раствор хлорида бария, молибденовый реактив.

Значение воды и минеральных солей огромно. Все процессы, протекающие в организме, идут в водной среде. Без воды нет жизни. Минеральные вещества участвуют в построении всех органов и тканей, обеспечивают поддержание осмотического давления, активируют многие ферментные системы и выполняют еще большое число разнообразных функций. Содержание воды и минеральных солей в крови постоянно, поэтому их определение имеет важное значение для характеристики состояния организма.

Открытие хлоридов

Количественное определение хлоридов в моче. Количество хлоридов в моче определяют количеством миллилитров нитрата ртути, пошедшим на титрование.

Ход работы

В сахарный стаканчик приливают 1,8 мл дистиллированной воды, 0,2 мл мочи, 4 капли индикатора, перемешивают и раствор титруют нитратом ртути до появления сине-фиолетового окрашивания. В качестве контроля используют стандартный раствор хлора, к 2 мл которого добавляют 4 капли индикатора и раствор оттитровывают нитратом ртути (2 г нитрата ртути растворяют в 200 мл дистиллированной воды и добавляют 20 мл 2н азотной кислоты, доводят общий объем до 1 л)

Расчет:

$$\text{хлор(мэкв/л)} = \frac{0,02 \cdot A \cdot 5 \cdot 1000}{B} = \frac{A \cdot 100}{B},$$

где 0,02 – миллиэквиваленты хлора в 2 мл стандартного раствора; 5·1000 – коэффициент пересчета на 1 л; А – количество раствора нитрата ртути, пошедшее на титрование опыта (мочи); В – количество миллилитров раствора нитрата ртути, пошедшее на титрование контроля (стандартный раствор хлора). В норме хлора в моче 170-210 мэкв/л.

Открытие хлоридов в моче. С мочой хлоридов за сутки выделяется около 15 г из расчета на хлорид натрия. Реакция основана на образовании белого осадка хлорида серебра, нерастворимого в азотной кислоте.

Ход работы

К 10 каплям мочи добавляют 2 капли 1%-ного раствора нитрата серебра и 3 капли 10%-ного раствора азотной кислоты. Выпадает белый осадок.

Открытие сульфатов

В организме сера принимает участие во многих процессах обмена, в том числе и в синтезе некоторых гормонов (инсулина, окситоцина), в обезвреживании токсических продуктов (фенола, крезола и др.)

Ход работы

К 10 каплям мочи добавляют 5 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и 5 капель 5%-ного раствора хлорида бария. Выпадает белый осадок.

Открытие фосфатов

Значение фосфатов для организма трудно переоценить. Он является одной из составных частей костной и зубной ткани, обнаруживается в составе почти всех органов и тканей, поддерживает осмотическое давление, а его соли, особенно АТФ, представляют собой основной аккумулятор энергии в организме, обеспечивающий активирование глюкозы, жирных кислот, аминокислот, процессы синтеза, избирательную проницаемость клеточных мембран.

В основе определения фосфатов лежит их способность образовывать желтый осадок с молибденовым реактивом.

Ход работы

В пробирку наливают 20 капель молибденового реактива, нагревают почти до кипения и добавляют несколько капель мочи. Выпадает желтый кристаллический осадок фосфорных солей молибдата аммония.

Контрольные вопросы:

- 1 Дайте определение гомеостаза. Какими показателями характеризуется гомеостаз?
- 2 Какое значение имеет вода для организма? Что такое вне- и внутриклеточная вода? Каков ее состав?
- 3 Какие органы принимают участие в регуляции водного обмена? Как регулируется водный обмен?
- 4 Какова функция антидиуретического гормона и альдостерона в обмене воды?
- 5 Каково значение минеральных веществ для организма?
- 6 Какова суточная потребность в калии, кальции, фосфоре, железе?
- 7 Укажите на значение калия, натрия, кальция, фосфора и микроэлементов.
- 8 Какие функции выполняют в организме кобальт, марганец, медь, йод?

9 В организме снижена выработка вазопрессина. Как это будет влиять на величину диуреза?

10. В организме повышен синтез альдостерона. Как при этом будет изменяться диурез?

Список литературы

1. Биохимия: учеб. для студентов мед. вузов / под ред. Е. С. Северина.- 5-е изд. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 766 с. : ил. - Прил. : с. 735-760. - Предм. указ.: с. 748-760. - ISBN 978-5-9704-1195-7.
2. Кнорре, Д. Г. 2 Биологическая химия: учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина .- 3-е изд., испр. - М. : Высш. шк., 2002. - 479 с. : ил. - ISBN 5-06-003720-7.
3. Практикум по биохимии: учеб. пособие / под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой.- 2-е изд., перераб. и доп. - М. : МГУ, 1989. - 509 с. : ил - ISBN 5-211-00406-X.
4. Ленинджер, А. Биохимия : молекулярные основы структуры и функций клетки: пер. с англ. / А. Ленинджер . - М. : Мир, 1974. - 957 с. : ил.. - Предм. указ.: с. 915-946.
5. Комов, В. П. Биохимия: учебник для вузов / В. П. Комов, В. Н. Шведова .- 2-е изд., испр. - М. : Дрофа, 2006. - 638 с. - (Высшее образование: Современный учебник). - Предм. указ.: с. 620. - ISBN 5-358-01012-2.