

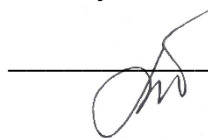
МИНОБРНАУКИ РОССИИ

**Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Тульский государственный университет»**

**Естественнонаучный институт
Кафедра «Биотехнологий»**

Утверждено на заседании кафедры
«Биотехнологий»
«30» января 2023 г., протокол № 6

Заведующий кафедрой

 О.Н. Понаморева

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по выполнению лабораторных работ
по дисциплине (модулю)
«Биохимия»**

**основной профессиональной образовательной программы
высшего образования – программы бакалавриата**

по направлению подготовки
19.03.01 Биотехнология

с направленностью (профилем)
Экобиотехнология

Форма обучения: очная, заочная

Идентификационный номер образовательной программы: 190301-01-23

Тула 2023

Разработчик методических указаний

С.В. Алферов, доцент каф. БТ, доцент, к.хим.н.
(ФИО, должность, ученая степень, ученое звание)



(подпись)

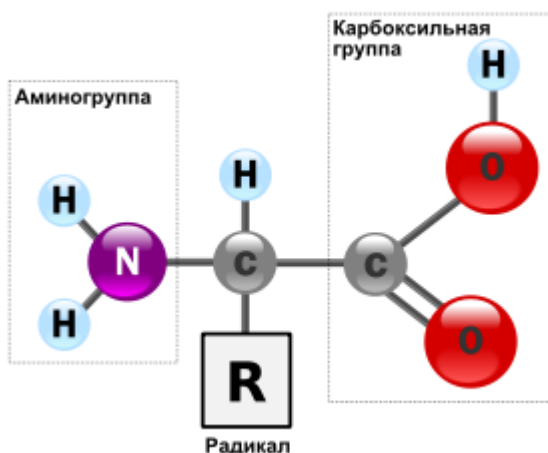
Раздел I. БЕЛКИ

Белки или *протеины* (что в переводе с греческого означает «первые» или «важнейшие») – это биологические полимеры, состоящие из α -аминокислот, соединенных пептидными связями.

Белки делятся на простые и сложные. *Простые белки* состоят только из аминокислотных остатков. *Сложные белки* помимо пептидных цепей содержат в своем составе простетические группы – небелковые вещества, различные по химическому строению (нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, ионы металлов и др.).

Белки, количественно преобладают над всеми макромолекулами, присутствующими в живой клетке, и составляют более половины сухого веса большинства организмов.

Разнообразие существующих в природе белков определяется аминокислотным составом. Все 20 аминокислот, встречающихся в белках, характеризуются общей структурной особенностью – наличием карбоксильной и аминогруппы, связанных с одним и тем же атомом углерода. Различаются же аминокислоты боковыми цепями (R-группами). Общая формула α -аминокислот:



Белки имеют несколько уровней структурной организации: первичный, вторичный, третичный и в некоторых случаях четвертичный.

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ НА АМИНОКИСЛОТЫ. АНАЛИЗ АМИНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА БЕЛКОВ

Работа 1. Сравнение аминокислотного состава различных белков

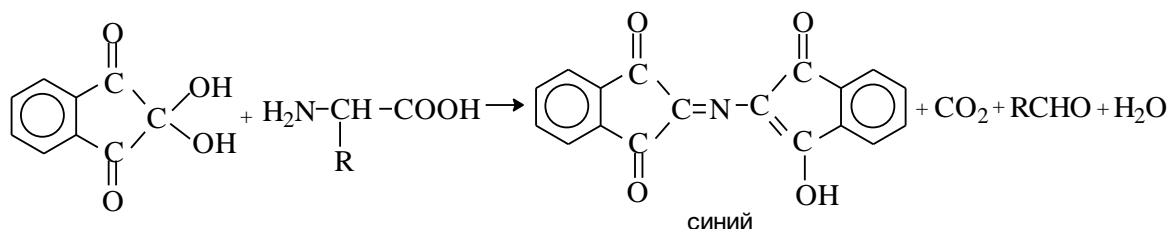
Цель работы – Сравнить питательную ценность различных белков.

Качественные реакции (или цветные реакции) используются в клинико-биохимических лабораториях, фармацевтической практике и биохимических исследованиях для обнаружения присутствия белка и аминокислот в биологических средах, качественного анализа белковых лекарственных средств. Многие качественные реакции положены в основу методов количественного определения белков и аминокислот. Состав аминокислот определяет не только свойства белка, но и его питательную ценность. Биологически полноценными считаются белки, содержащие все незаменимые аминокислоты.

Материал исследования: раствор яичного белка, раствор желатина (коллаген).

Опыт 1. *Нингидриновая реакция*

При взаимодействии α -аминокислот с трикетоним – нингидрином происходит одновременное окислительное деаминарование и декарбоксилирование с образованием альдегида и окрашенного продукта



конденсации.

Реактивы и оборудование: 1% раствор нингидрина в 95% ацетоне, водяная баня, пробирки, пипетки.

Ход работы. В каждую пробирку наливают по 0,5 мл растворов белков, добавляют по 2 капли раствора нингидрина, содержимое пробирок тщательно перемешивают и нагревают на водяной бане.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

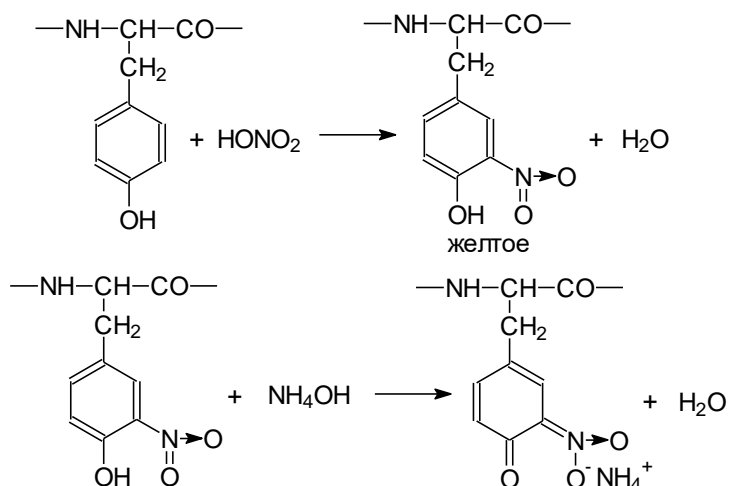
Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о наличии аминокислот в анализируемых белках.

Опыт 2. Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)

Ксантопротеиновая реакция происходит только при наличии ароматических аминокислот в белках (фенилаланина, триптофана, тирозина), поэтому она является качественной на *ароматические аминокислоты*.

При нагревании с концентрированной азотной кислотой белки дают желтое окрашивание за счет образования нитропроизводных ароматических аминокислот. При подщелачивании раствором аммиака желтое окрашивание переходит в оранжевое (образуются аммонийные соли хиноидной структуры):



Реактивы и оборудование: концентрированная азотная кислота; концентрированный раствор аммиака; кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В разные пробирки наливают по 0,5 мл растворов белков. Во все пробирки добавляют по 5 капель концентрированной азотной

кислоты и нагревают на водяной бане. Пробирки охлаждают, к охлажденным растворам осторожно прибавляют по 10 капель концентрированного раствора аммиака.

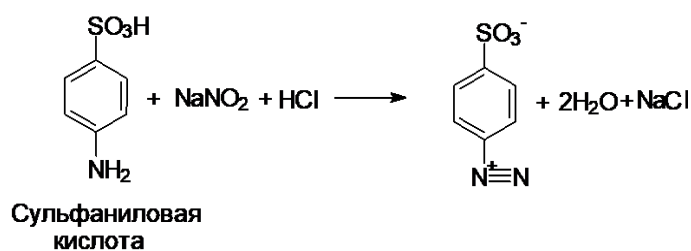
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора			
	Исходный раствор	После добавления HNO_3	После нагревания	После нейтрализации

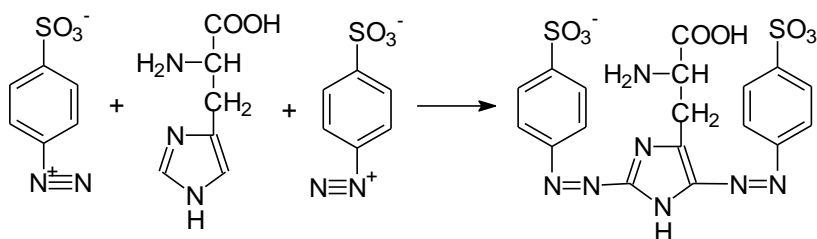
По результатам опыта делают вывод о содержании ароматических аминокислот в анализируемых белках.

Опыт 3. Реакция на гистидин и тирозин (Паули)

При взаимодействии сульфаниловой кислоты в кислой среде с нитритом натрия происходит реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоновая кислота.



При реакции последней с гистидином или тирозином образуется соединение вишнево-красного цвета:



Реактивы и оборудование: 1% раствор сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты, 5% раствор нитрита натрия, 10% раствор карбоната натрия, пробирки, пипетки.

Ход работы.

1. В двух пробирках смешивают по 1 мл раствора сульфаниловой кислоты и по 2 мл раствора нитрита натрия, тщательно перемешивают. Затем в каждую пробирку добавляют 2 мл анализируемых растворов белков и по 6 мл раствора соды.
2. Описанная выше реакция может быть выполнена иным путем. К небольшому количеству диазореактива (соотношение компонентов см. выше) добавляют несколько капель 10% раствора соды и осторожно по стенке пробирки наслаивают раствор белка. На границе двух жидкостей появляется окрашенное кольцо.

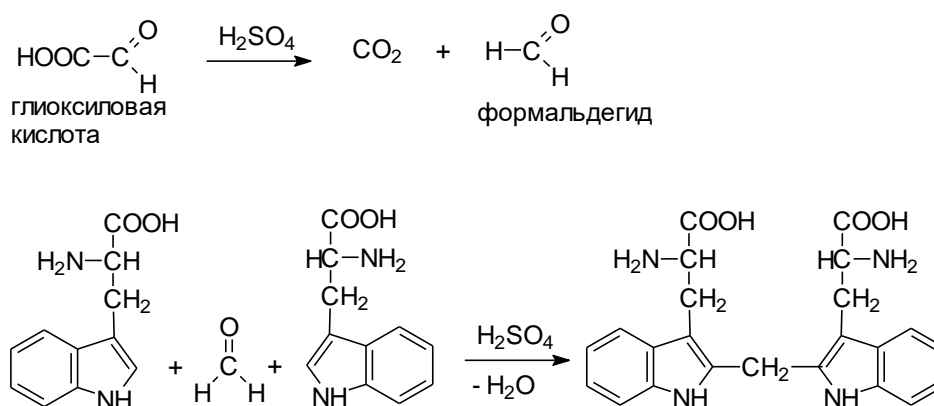
Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

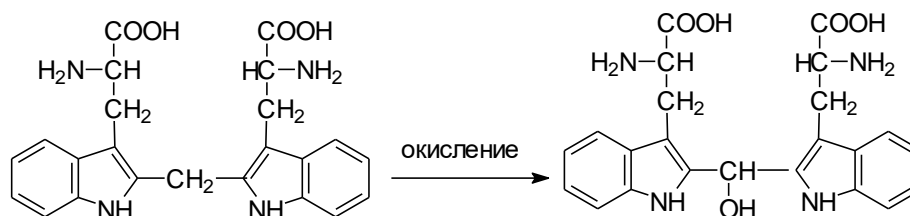
По результатам опыта делают вывод о содержании гистидина или тирозина в анализируемых белках.

Опыт 4. Реакция на триптофан (Гопкинса-Коле или Адамкевича)

Триптофан в этой реакции конденсируется с формальдегидом, выделяющимся из глиоксиловой кислоты под действием концентрированной серной кислоты.



Продукт конденсации окисляется, в присутствии минеральных кислот образуются окрашенные в сине-фиолетовый цвет соли (явление галохромии).



Реактивы и оборудование: раствор глиоксиловой кислоты¹; 0,04М раствор сульфата меди (II); концентрированная серная кислота, концентрированная соляная кислота, ледяная уксусная кислота, кипящая водяная баня; пробирки; пипетки.

Ход работы. В пробирки наливают 0,5 мл растворов исследуемых белков. В каждую пробирку добавляют 2 мл ледяной уксусной кислоты, 1 мл раствора глиоксиловой кислоты и по 10 капель раствора сульфата меди (II), перемешивают, и нагревают до растворения образующегося осадка. После охлаждения пробирки приливают 1 мл концентрированной соляной кислоты. Осторожно приливают небольшими порциями по стенкам пробирок 2-3 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы жидкости не смешались. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре.

Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

Материал исследования	Цвет раствора	
	до реакции	после реакции

По результатам опыта делают вывод о содержании триптофана в анализируемых белках.

Опыт 5. Реакция на «слабосвязанную серу» в белке (реакция Фоля)

При кипячении цистеина и цистина в щелочной среде от них легко отщепляется сера в виде сероводорода, образующего сульфид натрия:

¹ Глиоксиловая кислота. К 2 г магния в порошке, слегка увлажненного, приливают при охлаждении 50 мл заранее охлажденного при 0°C насыщенного раствора щавелевой кислоты. Осадок оксалата магния отфильтровывают и промывают небольшой порцией воды. Фильтрат подкисляют уксусной кислотой и доводят водой до объема 200 мл. Раствор сохраняют в холодильнике.


$$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} + 4 \text{ NaOH} \rightarrow \text{Na}_2[\text{Pb}(\text{OH})_4] + 2 \text{ CH}_3\text{COONa}$$


Оформление работы. Результаты опыта вносят в таблицу.

По результатам опыта делают вывод о содержании цистеина в анализируемых белках.

Работа 2. Определение температуры коагуляции яичного белка

Цель работы - Освоить метод определения температуры коагуляции белка.

При увеличении температуры белки *денатурируют* (т.е. теряют свою третичную и вторичную структуру), как правило, необратимо. Температура денатурации белков различается. Однако большинство белков животного происхождения денатурируют при температуре выше 40°C, именно поэтому температура 42°C является критической для человеческого организма.

Материал исследования: яичный белок.

Реактивы и оборудование: прибор для определения температуры плавления; пробирка (диаметр 3–4 мм, высота 2–3 см); капилляр или капиллярная пипетка.

Ход работы. Неразбавленный яичный белок вносят в пробирку капилляром или капиллярной пипеткой в таком количестве, чтобы его высота достигла 1 см. Пробирку прикрепляют к термометру прибора для определения температуры плавления и монтируют его в прибор (рис. 1).

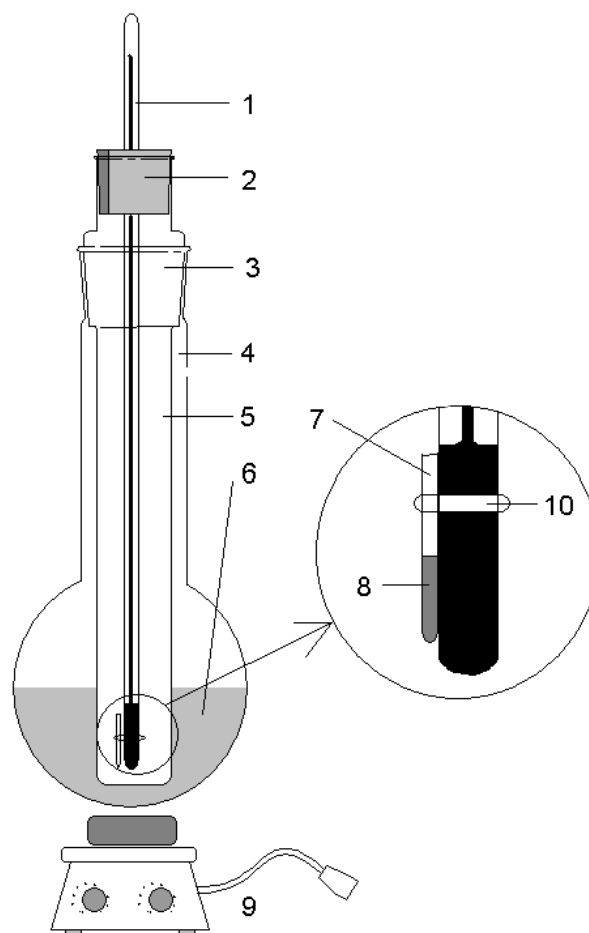


Рисунок 1. Прибор для определения температуры плавления.

1 – термометр; 2 – пробка для крепления термометра с отверстием для сообщения внутреннего пространства колбы и пробирки с атмосферой; 3 – пробка для крепления пробирки; 4 – круглодонная колба; 5 – пробирка; 6 – теплоноситель (глицерин, серная кислота, силиконовое масло, дибутилфталат); 7 – капилляр; 8 – вещество; 9 – колбонагреватель; 10 – резиновое колечко или проволока

Прибор нагревают, отмечают температуру, при которой начинается помутнение белкового раствора, и температуру, при которой происходит полное свертывание белка.

Оформление работы. Полученные данные заносят в лабораторный журнал. Делают выводы.

Работа 3. Осаждение белков. Денатурация белков.

Белки могут быть высажены из раствора не только под действием сильных электролитов, но и с помощью других методов, например: добавлением к раствору белка солей тяжелых металлов, минеральных кислот, а также при нагревании.

Осадочные реакции на белки применяются для обнаружения и количественного определения белков в различных субстратах.

Материал исследования: 1% раствор яичного альбумина.

Реактивы и оборудование: 10 % раствор ацетата свинца, 1% и 10% растворы уксусной кислоты, 10% раствор гидроксида натрия, насыщенный раствор хлорида натрия, водяная баня, штатив с пробирками.

Опыт 1. *Осаждение белков солями тяжелых металлов*

Ход работы. В пробирку к 0,5 мл раствора белка прибавить несколько капель раствора ацетата свинца. При этом происходит помутнение раствора.

Опыт 2. *Осаждение белков при нагревании*

Ход работы. В пять пробирок наливают по 0,5 мл раствора яичного альбумина.

1. В первую пробирку добавляют 1-3 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Осадок при этом не образуется.

2. К раствору белка во второй пробирке добавляют одну каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Выпадает хлопьевидный осадок. Это объясняется тем, что при добавлении к коллоидному раствору белка кислоты мицеллы теряют заряд, белок при этом находится в изоэлектрическом состоянии.

3. Содержимое третьей пробирки нагревают на водяной бане до помутнения раствора.

4. В четвертую пробирку добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок не образуется.

5. В пятую пробирку добавляют 1-2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты и 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия, нагревают. Выпадает осадок белка.

Оформление работы. Результаты опытов занести в таблицу. Объяснить наблюдаемые явления.

№ пробирки	Среда	Наблюдаемые изменения
1	$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$	
2	Кислая (10% раствор CH_3COOH)	
3	Слабокислая (1% раствор CH_3COOH)	
4	Нейтральная	
5	Щелочная (10% раствор NaOH)	
6	Кислая (10% раствор CH_3COOH) + насыщенный раствор NaCl	

Работа 4. Отделение белка от низкомолекулярных примесей методом гель-фильтрации

Цель работы – освоить хроматографические методы очистки и разделения белков. Очистить белок от низкомолекулярных примесей методом гель-фильтрации.

Низкомолекулярные вещества из белкового раствора можно удалить достаточно быстро и полно с помощью гель-фильтрации. Разделение веществ этим методом основано на различии в размерах молекул. Крупные молекулы не проникают в поры гранул геля и выходят из колонки в первую очередь, в то время как небольшие молекулы попадают через поры в гранулы, вследствие этого задерживаются на колонке и движутся с меньшей скоростью. Метод гель-фильтрации часто называют разделением веществ по принципу молекулярного сита.



Рисунок 2. Колонка для отделения белков от низкомолекулярных примесей
методом гель-фильтрации

Свойствами молекулярного сита обладают многие пористые материалы. Наиболее часто для этой цели применяют органические полимеры с трехмерной сетчатой структурой. Например, гели полисахарида декстрана (коммерческое название – сефадексы). При изготовлении сефадексов полисахаридные цепи декстрана соединяются поперечными сшивками. Существует несколько типов сефадекса, различающихся как размером и количеством, так и величиной гранул. Это позволяет применять их для

разделения веществ с разными размерами молекул. Благодаря высокому содержанию гидроксильных групп гранулы сефадекса легко набухают, образуя гель. Чем выше способность геля к набуханию, тем больше номер сефадекса.

Сефадексы отличаются степенью сшивки молекул декстрана друг с другом. Это находит выражение в различной набухаемости гранул сефадекса и пределах эксклюзии (выражаемой значениями молекулярной массы веществ, еще способных входить внутрь гранул сефадекса), в связи с чем и построена их классификация (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика некоторых видов сефадексов

Марка сефадекса	Предел эксклюзии, в единицах молекулярной массы	Поглощение воды, мл/г	Удельный объем в колонке, см ³ /г	Время полного набухания при комнатной температуре, ч	Диапазон фракционирования белков по молекулярной массе, тыс.
G-25	5000	2,5±0,2	4 – 6	3	1,0 – 5,0
G-50	10000	5,0±0,3	9 – 11	3	1,5 – 30
G-75	50000	7,5±0,5	12 – 15	24	3,0 – 75
G-100	100000	10,0±1,0	15 – 20	48	4,0 – 150
G-150	150000	15,0±0,5	20 – 30	72	5,0 – 300
G-200	200000	20,0±2,0	30 – 40	72	5,0 – 600

Для освобождения белковых растворов от солей обычно используют сефадекс марки G-25.

Применение сефадексов для фракционирования сложных белковых смесей типа тех, что характерны для биологических жидкостей (сыворотка крови, гемолимфа беспозвоночных и т. п.) или экстрактов, полученных из животных и растительных тканей, малоэффективно: удастся лишь разделить смесь белков на несколько групп. Тем не менее, в ряде случаев это первая стадия при выделении индивидуальных белков. Сефадексы применяют также на заключительных этапах очистки белка от примеси сопутствующего белка, если последний достаточно резко отличается от первого по величине молекулярной массы.

В последнее время сефадексы применяют для определения молекулярной массы белков путем сопоставления величин свободного (т. е. не занятого гранулами сефадекса) и элюируемого (т. е. необходимого для выноса белка из колонки) объемов колонки.

Материал исследования: яичный альбумин (1%-ный раствор в 0,5%-ном растворе бихромата калия), голубой декстран 1%-ный раствор.

Реактивы и оборудование: биуретовый реактив, колонка размером 1×25 см с гелем сефадекса G-25 (4 г в 0,09 М растворе хлорида натрия), 0,09 М раствор хлорида натрия, мерный цилиндр, штативы с пробирками «Эппендорф» 1,5 мл, пипетки.

Ход работы.

1. Заполнение колонки².

Заполнение гелем колонки ведут осторожно, заливая его медленно и непрерывно по стенке колонки, что предохраняет его от захвата пузырьков воздуха.

2. Определение объема водной фазы колонки V_0 .

Открывают зажим на колонке и сливают 0,09 М раствор NaCl, находящийся над гелем. Зажим закрывают и на поверхность геля очень аккуратно, по стенке, с помощью пипетки наносят 0,5 мл раствора голубого декстрана. Открывают зажим и вытекающую из колонки жидкость собирают в мерный цилиндр и сохраняют до конца опыта. Наблюдают за проникновением нанесенного раствора в гель (поверхность геля не должна оставаться сухой, поэтому по мере вытекания жидкости из колонки раствор NaCl доливают в колонку либо подсоединяют к колонке склянку с раствором).

Заранее готовят пять чистых пробирок. Как только из колонки начнет вытекать окрашенный (голубой) раствор, в эти пробирки собирают окрашенные фракции, по 0,5 мл в каждую пробирку. Элюат из этих пробирок

² 4 г сефадекса предварительно заливают 200 мл 0,09 М раствора хлорида натрия в литровом стакане, хорошо перемешивают и оставляют на 24 часа. Через сутки набухший сефадекс промывают 5 раз 0,09 М раствором хлорида натрия путем декантации. Затем стакан с гелем сефадекса помещают в большой вакуум эксикатор и в течение 1,5 часов деаэрируют под вакуумом, создаваемым водоструйным насосом, после чего гель готов для заполнения колонки.

[illegible]

Работа 5. Разделение смеси белков методом электрофореза в полиакриламидном геле

Цель работы – освоить методы ПААГ-электрофореза для характеристики белков.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле – метод разделения смеси белков в полиакриламидном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью (функцией длины полипептидной цепочки или молекулярной массы, а также укладки белковой молекулы, посттрансляционных модификаций и других факторов). Данный способ фракционирования белков и пептидов широко применяют в современной молекулярной биологии, биохимии, генетике.

Разработано большое количество модификаций электрофореза белков в полиакриламидном геле для решения разных задач и для различных белков и пептидов.

Электрофоретическая подвижность биополимеров в геле зависит от ряда параметров. Скорость миграции пропорциональна заряду молекулы, и в свободной жидкости молекулы с одинаковым удельным зарядом мигрируют с равной скоростью. В случае разделения в среде, имеющей жесткую пространственную матрицу, происходит сегрегация за счет трения о гель. Сила трения зависит от пространственной конфигурации молекулы, в том числе от её размера. Таким образом, в случае электрофоретического разделения нативных белков будет наблюдаться сложная картина их распределения в зависимости от вышеприведенных факторов.

Нативный ПААГ электрофорез

Материал исследования: растворы белков с концентрацией 1 мг/мл (бычий сывороточный альбумин, человеческий сывороточный альбумин, яичный альбумин, глюкозооксидаза, алкогольоксидаза, пероксидаза хрена или другие белки) и раствор, содержащий смесь

перечисленных белков с концентрацией 1 мг/мл каждого белка, белковые маркеры.

Реактивы и оборудование:

Трис (трис(гидроксиметил)аминометан (далее tris-base), трис-гидрохлорид (далее tris-HCl), глицин, акриламид (далее AA), бисакриламид (далее BIS), персульфат аммония (далее PSA), тетраметилэтилендиамин (далее TEMED), глицерин, кумасси ярко голубой G-250, 95% этанол, ледяная уксусная кислота, бромфеноловый синий, 2% раствор агарозы.

Приготовление рабочих растворов

1. 1M Tris-Cl (pH 6,8)

2,46 г tris-HCl и 10,26 г tris-base растворить в колбе на 100 мл и довести до метки дистиллированной водой.

2. 1M Tris-Cl (pH 8,8)

14,56 г tris-HCl и 0,94 г tris-base растворить в колбе на 100 мл и довести до метки дистиллированной водой.

3. 30 % акриламид

Приготовление 30%-ного акриламида:

Реактивы \ Объем 30% акриламида	100 мл	150 мл	200 мл
AA	29,0 г	43,5 г	58,0 г
BIS	1,0 г	1,5 г	2,0 г
H ₂ O	70 г / 70 мл	105 г / 105 мл	140 г / 140 мл

4. 10% PSA

Раствор персульфата аммония готовят в день проведения электрофореза. 0,1 г персульфата аммония, 900 мкл воды.

5. Раствор для окрашивания

0,5 г кумасси ярко голубого G-250, 80 мл этанола, 14 мл ледяной уксусной кислоты, 106 мл воды.

6. Раствор для проявления-1 при окрашивании кумасси G-250

80 мл этанола, 14 мл ледяной уксусной кислоты, 106 мл воды.

7. Раствор для проявления-2 при окрашивании кумасси G-250

10 мл этанола, 14 мл ледяной уксусной кислоты, 176 мл воды.

8. 1х трис-глициновый электродный буфер (pH = 8,8)

Смешать 3,10 г tris-base с 19,3 г глицина и растворить в 1 л воды.

9. 4X загрузочный буфер для нативных образцов

Приготовление 10 мл буфера для нативных образцов:

Tris-HCl (pH 6,8), 1M	2,00 мл
H ₂ O	4,00 мл
Бромфеноловый синий	~1 мг
Глицерин	4,00 мл / 5,0 г

!Все растворы хранить не более 1 месяца при +4°C!

Приготовление гелей для электрофореза нативных белков

1. Разрешающий гель

Приготовление 10 мл разрешающего геля с концентрацией AA 7,5%

Рабочие растворы	Объем
AA, 30%	2,5 мл
H ₂ O	3,65 мл
Tris-Cl (pH 8,8)	3,75 мл
PSA	0,10 мл
TEMED	15 мкл

2. Концентрирующий гель

Приготовление концентрирующего геля с концентрацией AA 5%

Рабочие растворы	Объем
AA, 30%	0,85 мл
H ₂ O	3,40 мл
Tris-Cl (pH 6,8)	0,66 мл
PSA	80 мкл
TEMED	8 мкл

Ход работы.

Электрофоретическая установка представлена на рисунке 3.

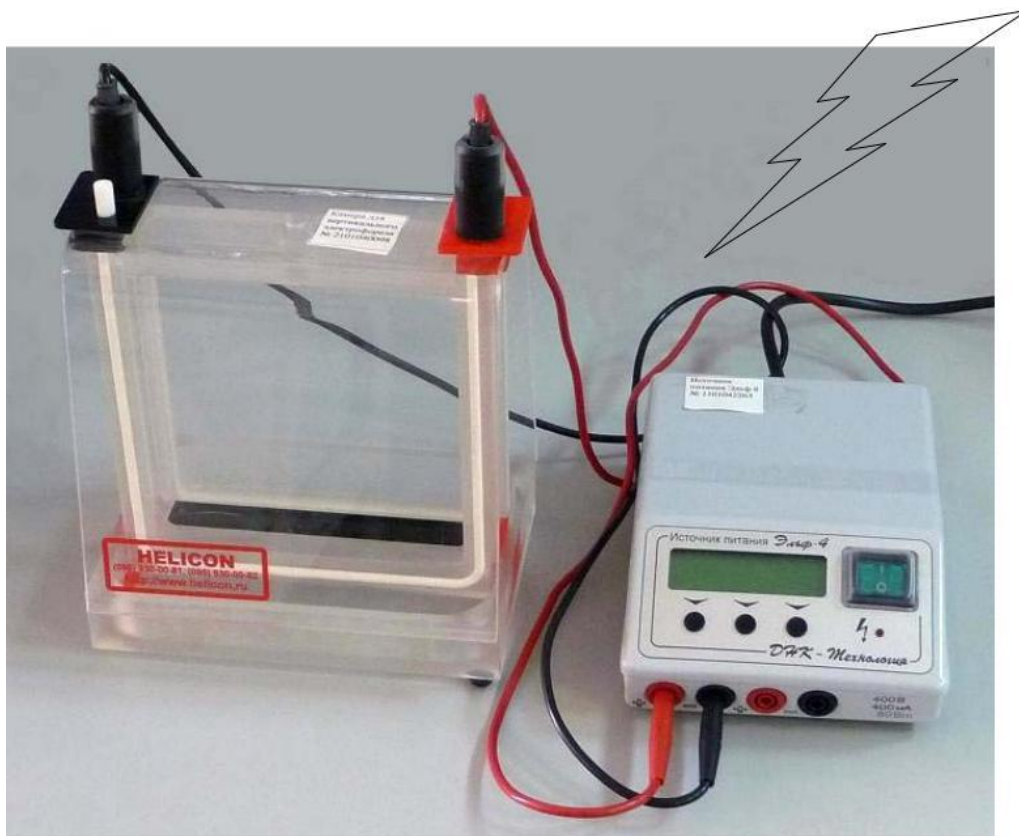


Рисунок 3. Электрофоретическая установка для вертикального электрофореза VE – 2М от фирмы «Helicon» (Москва) с размером стекол слэба (кассеты) 150x122 мм², источник питания «Эльф-4».

1. Верхнюю камеру установить на ровную горизонтальную поверхность. Слэб из стекол с вырезом и без выреза со вставленными вдоль его кромок спейсерами (фторопластовые пластинки) выровнять по основанию ячейки и по боковым граням, затем закрепить зажимами. Стекло с вырезом должно находиться с внутренней (обращённой в верхний буфер) стороны слэба. Затем, если нет необходимости использования двух гелей одновременно, вместо второго слэба ставят заглушку из оргстекла.

2. Провести герметизацию слэбов при помощи расплавленного 2%-ного раствора агарозы вдоль кромок и нижнего торца слэба.

3. Отметить маркером уровень, отстоящий от верхнего торца слэба на 2,5 – 3 см (верхний уровень разрешающего геля). Залить свежеприготовленный 7,5% разрешающий гель до метки (акриламид полимеризуется за 5 – 10 мин), сверху наслоить ~200 мкл воды (для

определения времени конца полимеризации полезно оставить немного раствора акриламида в стакане).

4. Отсосав наложенную воду шприцем, до конца заполнить слэб концентрирующим гелем, вставить гребенку и дождаться конца полимеризации, после чего аккуратно извлечь гребенку из установки.

5. Вставить верхнюю ячейку в нижнюю и заполнить обе ячейки электродным буфером.

6. Образцы растворов белков смешать с 4X загрузочным буфером для нативных образцов в соотношении 3:1.

7. В образовавшиеся после извлечения гребенки лунки нанести 30 мкл смеси растворов белков с загрузочным буфером (около 20 мкг белка в лунке).

8. Подключить блок питания к установке для электрофореза. Электрофорез проводить при силе тока 40 – 45 мА и напряжении 175 – 200 В. При этом мощность, потребляемая установкой, составляет 7 – 9 Вт.

9. Электрофорез проводят до длины пробега фронта красителя 6 – 6,5 см от границы разрешающего геля (70 – 90 мин.).

10. Отключают блок питания и извлекают гель из установки.

11. Помещают гель в раствор для окрашивания на 15 мин., затем перекладывают его последовательно в раствор для проявления-1 (на ночь) и раствор для проявления-2 до полного вымывания красителя.

Оформление работы. Описать принцип метода. Занести рисунок или фотографию электрофореграммы в тетрадь. Сделать выводы.

РАЗДЕЛ 2. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Для количественного определения белков в биологических жидкостях чаще всего используются спектральные методы исследования: *фотоколориметрия и спектрофотометрия*, а также – *рефрактометрический метод*.

Фотоколориметрические методы основаны на цветных реакциях. Среди них наибольшее применение нашли биуретовая реакция на пептидные группы и реакция Фолина.

Прямой спектрофотометрический метод состоит в измерении светопоглощения раствора белка в ультрафиолетовой области при 200-220 нм и при 280 нм (зона поглощения ароматических аминокислот).

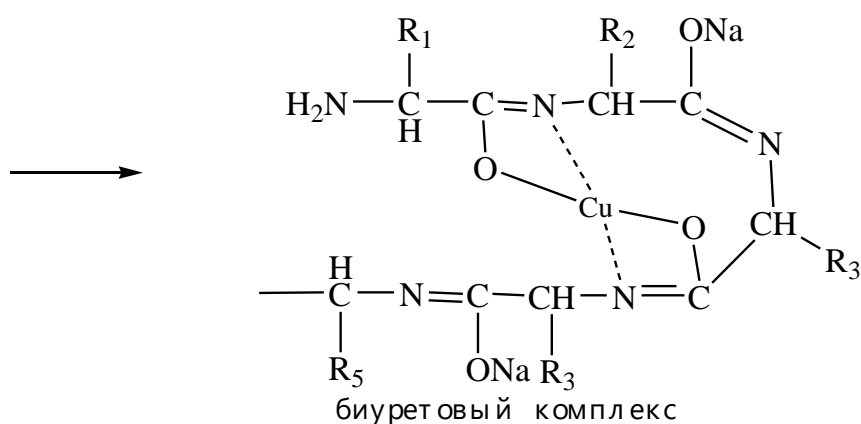
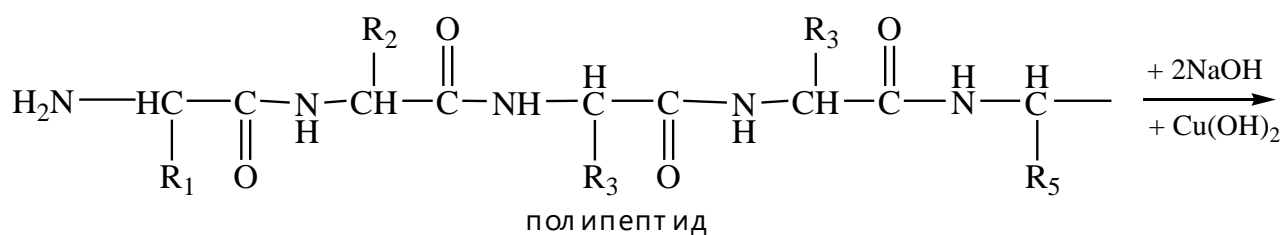
Рефрактометрический метод основан на изменении показателя преломления раствора в зависимости от концентрации белка в нем.

Работа 6. Количественное определение белка биуретовым методом

Цель работы – освоить метод определения белков в биологических жидкостях, применяемый в клинической биохимии.

В основе метода лежит способность белков в щелочной среде давать с раствором сульфата меди фиолетовое окрашивание. Окраска обусловлена образованием комплексов ионов меди с пептидными группами белка. Интенсивность окраски пропорциональна содержанию белка в растворе. Биуретовую реакцию дают все белки, а также олигопептиды, содержащие не менее двух пептидных связей.

Биуретовая реакция не отличается высокой чувствительностью. Поэтому она применяется в тех случаях, когда содержание белка в исследуемом образце достаточно велико (не ниже нескольких мг/мл).



Материал исследования: раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) неизвестной концентрации.

Реактивы и оборудование: 10% раствор БСА; 0,9% раствор хлорида натрия; биуретовый реактив³; фотометр «Эксперт-003»; кювета с толщиной слоя 1 см; штатив с пробирками.

Ход работы.

1. Построение градуировочного графика.

Для построения градуировочного графика применяют стандартный раствор белка. Из 10 % стандартного раствора белка готовят в 6 пробирках растворы белка различной концентрации, как показано в таблице:

³ Биуретовый реактив. В мерной колбе на 250 мл растворяют последовательно 0,375 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 1,5 г сегнетовой соли ($\text{KООС-СНОН-СНОН-СООNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) в 150 мл воды. Затем медленно приливают при перемешивании 75 мл 10% раствора гидроксида натрия и доводят содержимое до 250 мл водой.

№	Стандартный 10% раствор белка, мл	0,9% раствор хлорида натрия, мл	концентрация белка, г/л
р-р сравнения	-	0,1	0
1	0,02	0,08	20
2	0,04	0,06	40
3	0,05	0,05	50
4	0,06	0,04	60
5	0,08	0,02	80
6	0,10	-	100

В пробирки добавляют 3,0 мл биуретового реактива. Через 20 минут измеряют оптическую плотность растворов на фотометре относительно раствора сравнения (0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия + 3,0 мл биуретового реактива). Измерение проводят в кювете толщиной 1 см, длина волны 525нм.

Градуировочный график строят с использованием компьютерных программ (MicrosoftExcel или SigmaPlot). По оси ординат откладывают полученные значения оптических плотностей, а по оси абсцисс – концентрацию белка (в г/л).

2. Определение содержания белка в неизвестной пробе.

В пробирку отмеряют 0,1 мл раствора белка с неизвестной концентрацией и 3,0 мл биуретового реактива и через 20 минут измеряют экстинкцию раствора на фотометре относительно раствора сравнения. Содержание белка находят по калибровочному графику.

Оформление работы. Описать принцип метода. Занести полученные экспериментальные данные в тетрадь. Построить градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации стандартного раствора белка. Пользуясь этим графиком, рассчитать содержание белка в испытуемом растворе и записать результат, рассчитать ошибку эксперимента и сделать вывод.

Работа 7. Количественное определение белка по методу Лоури

Цель работы – освоить чувствительный метод количественного определения белков, научиться определять низкие содержания белков в анализируемых образцах по градуировочному графику.

Среди методов, основанных на количественном определении белков посредством цветных реакций, наибольшей чувствительностью обладает метод Лоури. Метод Лоури основан на измерении интенсивности окраски раствора, в котором одновременно осуществляются, по меньшей мере, две цветные реакции на белок: биуретовая реакция и реакция Фолина с тирозиновыми и цистеиновыми радикалами белковой молекулы. Последняя состоит в восстановлении смеси фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот с образованием комплексного соединения синего цвета. Полагают, что в реакциях восстановления принимают участие комплексные соединения меди, возникшие при взаимодействии белка с щелочным раствором медного купороса. Вторая реакция не очень специфична, но весьма чувствительна. Поэтому метод Лоури позволяет вести определения белков в сильно разбавленных растворах (всего несколько десятков микрограммов от 10 до 200 мкг/мл).

Метод Лоури менее специфичен, чем биуретовый, поскольку на интенсивность окраски влияют многие вещества, которые могут содержаться в тканях или в буферных системах, применяемых в биохимических исследованиях. Поэтому для получения абсолютных данных градуировочный график следует строить по тому же белку, который необходимо определить в растворе.

Материал исследования: биологические жидкости (в определяемом объеме должно находиться от 10 до 100 мкг белка).

Реактивы и оборудование: стандартный раствор БСА (бычий сывороточный альбумин), реактив А (2% раствор карбоната натрия в

0,1 н растворе гидроксида натрия), реактив В (0,5% раствор сульфата меди в 1% растворе цитрата натрия), реактив Фолина⁴, фотометр «Эксперт-003».

Ход работы.

Перед определением смешивают 50 мл реактива А и 1 мл реактива В - (раствор С), реактив Фолина разбавляют в 2 раза.

Для построения градуировочного графика применяют стандартный раствор белка БСА с концентрацией 200 мкг/мл, готовят растворы белка с разной концентрацией, как показано в таблице.

№ пр.	станд. 200 мкг/мл раствор БСА, мл	Дистиллированная вода, мл	Концентрация белка, мкг/мл	Содержание белка в пробе, мкг
р-р сравнения	-	1,00	0	0
1	0,05	0,95	10	10
2	0,20	0,80	40	40
3	0,50	0,50	100	100
4	0,80	0,20	160	160
5	1,00	-	200	200

Одновременно ставят пробирку с пробой неизвестной концентрации.

В каждую пробирку добавляют 5 мл реактива С, перемешивают. Через 10 минут добавляют 0,5 мл разведенного в 2 раза реактива Фолина тщательно перемешивают и помещают в термостат при 37°C на 30 минут для развития окраски. Фотометрируют на фотометре при длине волны 700 нм.

По результатам измерений строят градуировочный график с использованием компьютерных программ (Microsoft Excel или SigmaPlot) и определяют содержание белка в неизвестной пробе.

Оформление работы. Описать принцип метода Лоури. Результаты измерений, градуировочный график и расчеты занести в рабочую тетрадь. Рассчитать ошибку эксперимента и сделать вывод по работе.

⁴ Реактив Фолина. В круглодонную колбу на 1,5–2 л вносят 100 г вольфрамата натрия $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ или 25 г молибдата натрия $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ и в 700 мл дистиллированной воды. К раствору добавляют 50 мл 80%-ного раствора фосфорной кислоты и 100 мл концентрированной HCl . К колбе присоединяют обратный холодильник и кипятят в течение 10 часов, затем прибавляют 150 г Li_2SO_4 , 50 мл воды и 3–4 капли брома. Кипятят без холодильника 15 мин для удаления избытка брома. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят его объем до 1 л водой и фильтруют. Полученный раствор должен быть ярко-желтого цвета. Его хранят в темной склянке и перед употреблением разбавляют дистиллированной водой 1 : 1.

Работа 8. Количественное определение белка по методу Брэдфорд

Цель работы – освоить чувствительный метод количественного определения белков для микроколичеств анализируемых образцов.

Определение концентрации белка методом Брэдфорд – один из наиболее популярных методов, используемый для определения концентрации белка в растворе. Этот метод, так же, как и метод Лоури, требует построения стандартной градуировочной кривой перед измерением концентрации неизвестного белка. Метод Брэдфорд основан на сдвиге спектра поглощения кумасси (Coomassie Blue) в сторону значений 595 нм прямо пропорционально концентрации содержащегося в растворе белка. Кумасси образует комплекс с белком; этот комплекс измеряют при длине волны 595 нм. Абсорбционная фотометрия комплекса кумасси/белок имеет очень высокую чувствительность и эффективна даже в случае следовых концентраций белков. Чувствительность методов Лоури и Брэдфорд сопоставима, но реагенты метода Лоури обладают большим сродством к глобулинам, а метода Брэдфорд – к альбуминам.

Материал исследования: раствор белка неизвестной концентрации.

Реактивы и оборудование: стандартные растворы белка 0,5 мг/мл и 1 мг/мл, реактив Брэдфорд⁵, фотометр «Эксперт-003».

Ход работы.

Перед определением концентрат реактива Бредфорд разбавляют в 5 раз (в пробирку добавляют 1 мл реактива и 4 мл дистиллированной воды).

1. Построение градуировочного графика.

⁵ Реактив Брэдфорд. 100 мг кумасси G-250 растворить в 50 мл спирта и добавить 100 мл ортофосфорной кислоты, довести до 1 л водой и профильтровать через бумажный фильтр. Внимание! Реагент очень чувствителен к белку (1–2 мг/мл). Все должно быть абсолютно чистым и посуда, и бумажный фильтр, и кюветы и руки, иначе раствор посинеет и придет в негодность. Чистый реактив Брэдфорд имеет коричневый цвет и синеет при наличии белка

Для построения градуировочного графика применяют растворы белка с концентрацией 0,5 мг/мл и 1 мг/мл, для построения графика готовят растворы белка согласно таблице:

№ пр.	Концентрация исходного раствора белка, мг/мл	Объем раствора белка, мкл	Дистиллированная вода, мкл	Концентрация белка в пробе, мкг/мл
1	0,5	20	80	100
2	0,5	50	50	250
3	0,5	75	25	375
4	1,0	50	50	500
5	1,0	75	25	750
6	1,0	100	0	1000

Одновременно ставят пробирку с пробой неизвестной концентрации.

В каждую пробирку добавляют по 5 мл разбавленного реактива Бредфорд. Выдерживают пробирки 15 минут в темном месте и измеряют экстинкцию растворов на фотометре против контрольного раствора (реактив Бредфорд). Измерение проводят в кювете толщиной 1 см, длина волны 590 нм.

2. По построенному градуировочному графику, с использованием компьютерных программ (Microsoft Excel или SigmaPlot), определяют содержание белка в неизвестной пробе.

Оформление работы. Охарактеризовать принцип метода Бредфорд, результаты измерений, градуировочный график и расчеты занести в рабочую тетрадь.

Работа 9. Выделение рибонуклеопротеинов из дрожжей и качественное определение продуктов из гидролиза

Цель работы – Выделить дрожжевые рибонуклеопротеины и охарактеризовать основные структурные компоненты.

Нуклеиновые кислоты в клетке находятся в виде нуклеопротеинов. При частичном гидролизе нуклеопротеины распадаются на белки (гистоны) и нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК). ДНК и РНК, имея сходное строение, несколько отличаются по составным компонентам. Специфическими реакциями можно выявить основные компоненты нуклеиновых кислот. При полном гидролизе нуклеиновые кислоты распадаются на составляющие компоненты: гетероциклические основания (пуриновые или пиримидиновые), остатки сахара (рибозу или дезоксирибозу) и остатки фосфорной кислоты.

Материал исследования: свежие пекарские дрожжи.

Реактивы и оборудование: 10% раствор серной кислоты, 0,4% и 10% растворы гидроксида натрия, 1% раствор сульфата меди (II), аммиак концентрированный, молибденовый реактив⁶, 1% раствор нитрата серебра, песок, диэтиловый эфир, ступка, пробирки, круглодонные колбы, обратные холодильники, песчаные бани, воронки, фильтры.

Ход работы.

Опыт 1. *Выделение рибонуклеопротеинов (РНП)*

10 г дрожжей смешивают в ступке со смесью из 2 мл диэтилового эфира и 2 мл воды, добавляют 5 г песка и тщательно растирают, приливая к растертой массе небольшими порциями 40-50 мл 0,4% раствора гидроксида натрия. Растирание продолжают еще 15-20 мин. После этого осадок отфильтровывают или отделяют центрифугированием (10 минут при 10000 об.). Центрифугат сливают в стакан и к нему прибавляют небольшими порциями (по 0,1 мл) 10%-ную кислоту до слабокислой реакции (0,5 мл). Полученный осадок нуклеопротеинов отделяют центрифугированием (10 минут при 10000 об.).

⁶ Молибденовый реактив. Смешивают 15% раствор молибдата аммония с азотной кислотой (конц.) в отношении 110:90.

Опыт 2. Гидролиз РНП

В круглодонную колбу помещают 0,5 г осадка и заливают 4 мл 10% раствора серной кислоты. В колбу вставляют холодильник (стеклянная трубка длиной 25–30 см), и ставят на песчаную баню или асбестовую сетку. Через 1 ч после начала кипения жидкости гидролиз прекращают, дают остыть содержимому колбы и фильтруют через бумажный фильтр. В фильтрате открывают продукты гидролиза нуклеопротеинов качественными реакциями.

Опыт 3. Биуретовая реакция на полипептиды

К 5 каплям гидролизата добавляют биуретовый реактив. Наблюдают за изменением цвета раствора.

Опыт 4. Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу

К 5 каплям гидролизата добавляют 20 капель 10% раствора гидроксида натрия и 10 капель 1% раствора сульфата меди (II) до появления осадка гидроксида меди (II). Пробирку нагревают до выпадения осадка.

Опыт 5. Серебряная проба на пуриновые основания

10 капель гидролизата нейтрализуют 1 каплей концентрированного аммиака и добавляют 5 капель 1% раствора нитрата серебра. При стоянии через 3–5 мин выпадает небольшой рыхлый осадок серебряных соединений пуриновых оснований, окрашенный в бурый цвет.

Опыт 6. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

К 20 каплям молибденового реактива (раствор молибдата аммония в азотной кислоте) добавляют 2 - 3 капли гидролизата и кипятят несколько минут на открытом огне. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорномолибденового аммония:



Оформление работы. Результаты лабораторной работы записывают в тетрадь в виде таблицы.

Компоненты нуклеопroteина	Качественная реакция	Наблюдения

РАЗДЕЛ 3. ФЕРМЕНТЫ

Ферменты (энзимы) – это биологические катализаторы, представляющие собой простые или сложные белки. Простетическая группа сложных белков может быть представлена ионами металлов (*кофакторы*) или различными органическими соединениями (*коферменты*).

Наука, занимающаяся изучением ферментов, называется *энзимологией*.

В трехмерной структуре фермента различают ряд участков, выполняющих определенные функции. Связывание и химическое превращение субстрата происходит в *активном центре* фермента, в котором различают *связывающий* и *каталитический* участки. *Регуляторный* или *аллостерический* центр фермента служит для модификации фермента под действием различных эффекторов.

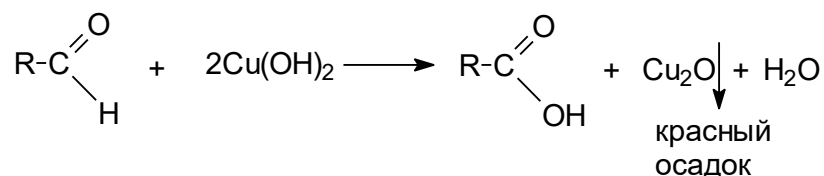
Ферменты содержатся во всех тканях, клетках и биологических жидкостях. Без них не осуществляется ни один химический процесс в организме.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Работа 10. Сравнение действия неорганических катализаторов и ферментов

Главное отличие ферментов от катализаторов небиологической природы состоит в исключительно высокой каталитической активности и ярко выраженной специфичности действия, что обусловлено особенностями строения и механизмом их действия.

Под действием фермента амилазы слюны в ротовой полости начинается процесс переваривания углеводов. Этот фермент эффективно катализирует гидролиз α -(1 \rightarrow 4)-связей в молекуле крахмала, расщепляя полисахарид на олигосахариды и дисахариды - мальтозу и изомальтозу. Мальтоза и изомальтоза являются восстанавливающими дисахаридами могут быть обнаружены по реакции Троммера:



Негидролизованный крахмал можно обнаружить по реакции с йодом, который взаимодействует с крахмалом с образованием синего комплекса.

Ионы водорода (H^+) также являются катализаторами процесса гидролиза. Однако, их действие менее эффективно и неспецифично. В результате гидролиза образуется смесь олигосахаридов и глюкозы. Глюкоза также дает реакцию Троммера.

Цель работы – сравнить эффективность биокатализаторов – ферментов с неорганическими катализаторами.

Материал исследования: раствор амилазы слюны (биологический катализатор), 10% раствор соляной кислоты (неорганический катализатор).

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостат, кипящая водяная баня, раствор Люголя, 10% раствор гидроксида натрия, 1% раствор сульфата меди, крахмал 1% в 0,3% хлориде натрия, дистиллированная вода.

Ход работы.

В три пробирки наливают по 5 мл 1% раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 1 мл дистиллированной воды, во вторую - 1 мл 10% соляной кислоты, а в третью – 1 мл раствора амилазы. Пробирки 1 и 3 помещают в термостат при $t = 38^\circ\text{C}$, а пробирку 2 – в кипящую водяную баню. Через 15–20 мин все пробирки вынимают, охлаждают и из каждой берут пробы на крахмал и восстанавливающие сахара.

Для этого на предметное стекло наносят по капле раствора из трех пробирок и добавляют к каждой по капле раствора Люголя. По интенсивности окраски делают заключение о степени гидролиза.

Для определения восстанавливающих сахаров из каждой пробирки отбирают по 1 мл раствора и добавляют 0,5 мл раствора гидроксида натрия и 5 капель раствора сульфата меди. Нагревают пробирки до кипения.

Оформление работы. Наблюдают за изменением окраски растворов и записывают наблюдения в таблицу и делают вывод.

№ пробы	реакция на крахмал	реакция Троммера
Проба 1		
Проба 2		
Проба 3		

Работа 11. Качественные пробы на присутствие ферментов

Цель работы – ознакомиться с методами обнаружения ферментов.

Ферменты в биологических препаратах и жидкостях можно обнаружить по появлению продукта реакции, которую катализирует данный фермент.

Опыт 1. *Открытие амилазы в слюне*

Материал исследования: разбавленная слюна.

Реактивы и оборудование: водяная баня, стеклянная воронка, цилиндр на 50 мл, стаканы лабораторные, пробирки, 1% раствор крахмала, реактив Люголя.

Ход работы.

1. Приготовление разбавленной слюны.

Рот ополаскивают 2–3 раза водой для удаления остатков пищи. В мерную пробирку вносят 1 мл слюны и добавляют 9 мл дистиллированной воды.

2. Гидролиз крахмала под действием амилазы слюны.

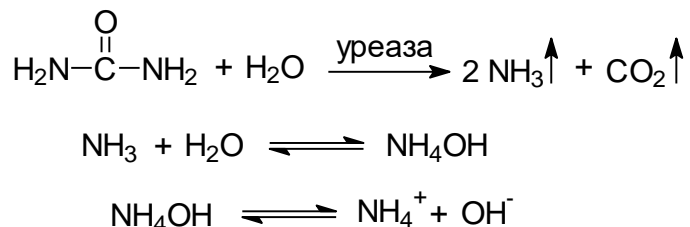
В две пробирки наливают по 5 мл раствора крахмала и в одну из них - 5 мл воды, а в другую – 5 мл раствора слюны. Обе пробирки помещают в водяную баню при 40°C. Через 1 мин от каждой смеси отбирают по капле жидкости и смешивают с каплей реактива Люголя, заранее нанесенного на стеклянную пластинку. Повторяют операцию через 2, 4, 6, 8 мин. Наблюдают за изменением окраски после добавления.

Оформление работы. Результаты наблюдений заносят в таблицу и делают выводы о наличии фермента в слюне.

Время инкубации	Окраска с реактивом Люголя	
	Контрольная проба	Исследуемая проба
1 мин		
2 мин		
4 мин		
6 мин		
8 мин		

Опыт 2. *Открытие уреазы в соевой муке*

Уреаза (карбамид-амидогидролаза; КФ 3.5.1.5) катализирует расщепление мочевины до CO_2 и NH_3 . Появление аммиака смещает pH в щелочную зону, что обнаруживается с помощью индикатора – фенолфталеина.



Материал исследования: уреазы, содержащаяся в соевой муке.

Реактивы и оборудование: термостат, пипетки, пробирки, 1% водный раствор мочевины, 1% спиртовой раствор фенолфталеина.

Ход работы.

В две пробирки отмеривают по 2 мл 1% раствора мочевины, затем в каждую пробирку добавляют по 2 капли фенолфталеина и по 100 мг соевой муки. Обе пробирки хорошо перемешивают. Одну пробирку ставят в термостат при 38°C на 30 мин. Содержимое второй пробирки кипятят на водяной бане.

Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов и записывают наблюдения в таблицу.

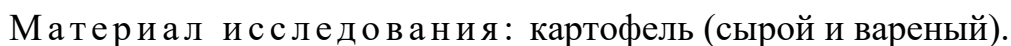
Проба	Наблюдаемая окраска
Свежий раствор уреазы	
Прокипяченный раствор уреазы	

Опыт 3. *Обнаружение тирозиназы в картофеле*

Качественные реакции на окислительно-восстановительные ферменты позволяют определить участие этих ферментов в окислительно-восстановительных процессах. Фермент тирозиназа (монофенолоксидаза) является металлопорфирином, содержащим медь в активном центре. Фермент обладает групповой специфичностью и катализирует окисление многих фенолов: тирозина, адреналина и др. кислородом воздуха.

$$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \xrightarrow{[\text{O}]} \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH} \xrightarrow{[\text{O}]}$$

3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА)



Ход работы. На поверхность среза сырого и вареного картофеля нанести 1-2 капли раствора тирозина. Наблюдать за изменением окраски.

При оформлении указывают фермент, кофермент, донор и акцептор электронов в ткани, донор и акцептор электронов в опыте, а также заносят наблюдения в таблицу.

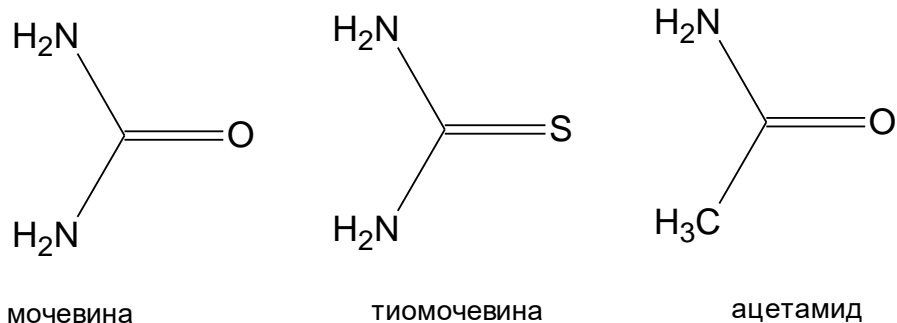
Исследуемый материал	Наблюдения
Сырой картофель	
Вареный картофель	

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Работа 12. Абсолютная специфичность уреазы

Цель работы – выяснить основные виды субстратной специфичности ферментов.

Метод основан на определении аммиака, образующегося под действием уреазы соевой муки на мочевины. Выделение аммиака обнаруживается по запаху и по изменению окраски фенолфталеина. Для подтверждения абсолютной специфичности уреазы сравнивают возможность гидролиза уреазой веществ, сходных по строению с мочевиной:



Материал исследования: соевая мука, соевое молоко.

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, 1% раствор тиомочевины, 1% раствор мочевины, 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина или универсальная индикаторная бумага.

Ход работы.

В одну пробирку помещают 1 мл раствора мочевины, во вторую – тиомочевины. В каждую добавляют примерно 100 мг соевой муки и 2 капли раствора фенолфталеина, тщательно перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре.

Оформление работы. Записать наблюдения в таблицу. Написать протекающие в процессе опыта реакции. Сделать вывод.

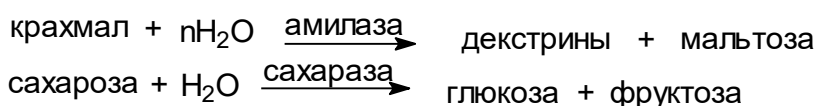
Фермент	Субстрат	Пробы на аммиак	
		фенолфталеин	запах

Работа 13. Специфичность действия амилазы и сахаразы

Цель работы – выяснить основные виды субстратной специфичности ферментов.

Метод основан на сравнительном изучении гидролиза α -амилазой и сахаразой разных субстратов, содержащих гликозидные связи: крахмала и сахарозы.

Ферменты катализируют реакции по схеме:



Материал исследования: раствор амилазы²⁵, 1% раствор сахаразы

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметное стекло, термостат, 2% раствор сахарозы, 1% раствор крахмала, раствор Люголя, 1% раствор сульфата меди, 10% раствор гидроксида натрия.

Ход работы.

Нумеруют четыре пробирки. В пробирки 1 и 2 наливают 2 мл раствора крахмала; в пробирки 3 и 4 – по 2 мл раствора сахарозы. Затем в пробирки 1 и 3 вносят по 0,5 мл раствора амилазы, а в пробирки 2 и 4 – по 0,5 мл раствора сахаразы. Перемешивают содержимое и ставят на 10 мин в водяную баню при $t = 40^\circ\text{C}$. После охлаждения проводят реакции с йодом на присутствие крахмала в пробах 1 и 2 и восстанавливающих сахаров (реакция Троммера) – в пробах 3 и 4.

Оформление работы. Наблюдения записывают в таблицу и делают вывод о специфичности действия исследуемых ферментов.

№ пробы	Фермент	Субстрат	Проба на крахмал	Реакция Троммера
1	амилаза	крахмал		
2	сахараза	крахмал		
3	амилаза	сахароза		
4	сахараза	сахароза		

²⁵ Рот ополаскивают водой для удаления остатков пищи. Отмеряют цилиндром 50 мл дистиллированной воды и ополаскивают ею рот в течение 3-5 мин в несколько приемов. Собранную жидкость фильтруют через вату или фильтр.

ЗАВИСИМОСТЬ СКОРОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ РЕАКЦИИ ОТ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ

Ферменты характеризуются высокой каталитической активностью, специфичностью действия, чувствительностью к изменению внешних факторов (температура, pH, ионная сила, действие ингибиторов и активаторов).

Работа 14. Влияние температуры на активность ферментов

Цель работы – выявить зависимость скорости ферментативной реакции от температуры.

Скорость ферментативных реакций увеличивается при увеличении температуры до определенного предела. При высоких температурах наступает тепловая денатурация ферментов и скорость реакций, которые они катализируют, падает до нуля.

Скорость расщепления крахмала амилазой можно контролировать, используя реакцию крахмала с йодом.

Материал исследования: раствор амилазы слюны

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостат с $t = 40^{\circ}\text{C}$, кипящая водяная баня, баня со льдом, 1% раствор крахмала, реактив Люголя.

Ход работы.

Приготовление раствора амилазы слюны: рот ополаскивают 2–3 раза водой для удаления остатков пищи. В мерную пробирку вносят 1 мл слюны и добавляют 9 мл дистиллированной воды.

Наливают в 4 пробирки по 2 мл раствора крахмала и еще в 4 пробирки по 0,5 мл раствора амилазы. Первую пару пробирок (одна - с ферментом, другая - с крахмалом) помещают в баню со льдом, вторую пару оставляют при комнатной температуре, третью пару пробирок помещают в термостат при 40°C , четвертую - в кипящую водяную баню.

2. Через 5 мин содержимое каждой пары пробирок сливают вместе и оставляют на 5 мин в тех же условиях.

3. Через 1 мин из каждой пробирки отбирают каплю жидкости на предметное стекло и добавляют к ней каплю реактива Люголя. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще на 1 мин и после этого все повторяют. При необходимости увеличивают время инкубации.

4. После исчезновения фиолетового окрашивания записывают время реакции при каждой температуре.

Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов, записывают наблюдения в таблицу и делают вывод.

№ пробы	Температура инкубации, °С	Время реакции, мин
1	0	
2	20	
3	40	
4	100	

Работа 15. Влияние ингибиторов на активность ферментов

Цель работы – оценить влияние тяжелых металлов на активность ферментов

Ионы меди - ингибиторы фермента амилазы. При добавлении Cu^{2+} к реакционной смеси снижается скорость ферментативной реакции. Степень расщепления крахмала амилазой контролируют, используя реакцию крахмала с йодом.

Материал исследования: раствор амилазы слюны

Реактивы и оборудование: пипетки, пробирки, предметные стекла, термостат с температурой 40°C , 1% раствор крахмала, 1% раствор сульфата меди, реактив Люголя.

Ход работы.

Приготовление раствора амилазы слюны: рот ополаскивают 2–3 раза водой для удаления остатков пищи. В мерную пробирку вносят 1 мл слюны и добавляют 9 мл дистиллированной воды.

1. В две пробирки наливают по 1 мл раствора крахмала. В одну пробирку добавляют 5 капель раствора сульфата меди, в другую - 5 капель воды, затем в обе пробирки добавляют по 1 мл раствора амилазы и засекают на секундомере время от начала реакции.

2. Полноту прохождения гидролиза контролируют по раствору в пробирке без ингибитора. Для этого через каждую минуту отбирают пипеткой каплю реакционной массы на предметное стекло и добавляют к ней каплю реактива Люголя. Как только начнет исчезать синее окрашивание в контрольном растворе, проверяют степень прохождения ферментативного гидролиза в пробирке с ингибитором.

Оформление работы: наблюдают за изменением окраски растворов, записывают наблюдения в таблицу и делают вывод.

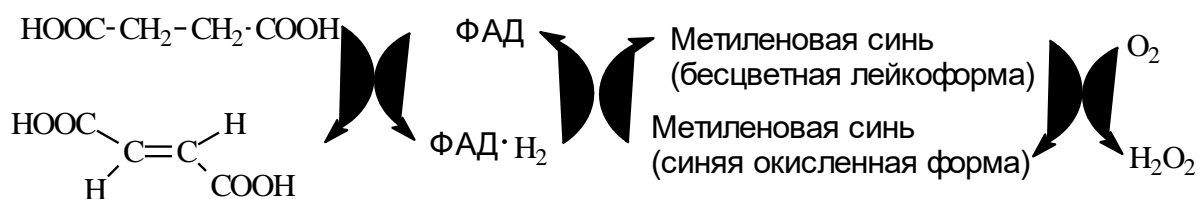
Фермент	Субстрат	Время инкубации, мин	Окраска раствора после добавления йода	
			без ингибитора	с ингибитором

Амилаза	Крахмал	1		
		2		
		3		
		4		

Работа 16. Конкурентное торможение сукцинатдегидрогеназной активности

Цель работы – рассмотреть механизмы конкурентного ингибирования ферментов.

Сукцинатдегидрогеназа мышц является железофлавопротеином, одним из компонентов цепи переноса электронов. Этот фермент локализован в митохондриях. Субстратом сукцинатдегидрогеназы является янтарная кислота, которая окисляется до фумаровой кислоты. В роли искусственного акцептора атомов водорода выступает метиленовая синь. Окисленная форма метиленового синего окрашена в синий цвет, а восстановленная лейкоформа бесцветна. Малоновая кислота является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы. При добавлении к реакционной смеси ингибитора, синяя окраска исчезает медленнее.



Реактивы и оборудование: дистиллированная вода, 0,01 н раствор янтарной кислоты (нейтрализованный NaOH до pH 7,0), 0,01 н раствор малоновой кислоты (нейтрализованный NaOH до pH 7,0), 0,05% раствор метиленового синего, вазелиновое масло, фосфатный буфер (pH 6,8), ножницы, ступка, пробирки, пипетки, термостат.

Материал исследования: мышечная ткань.

Ход работы. Для получения ферментного препарата 1-2 г свежей мышцы, измельченной ножницами, растирают в ступке. Полученную массу равномерно распределяют в три пробирки.

Затем в пробирки приливают реактивы по схеме, приведенной в таблице:

№ пробы	Буфер (V, мл)	Янтарная кислота (V, мл)	H ₂ O (V, мл)	Малоновая кислота (V, мл)	Метиленовая синь (V, мкл)
---------	---------------	--------------------------	--------------------------	---------------------------	---------------------------

1 (субстрат)	1	1	1	-	100
2 (субстрат и ингибитор)	1	1	-	1	100
3 (без субстрата и без ингибитора)	1	-	2	-	100

Содержимое пробирок тщательно перемешивают.

В заполненные пробирки слоем около 1 см наливают вазелиновое масло, чтобы избежать окисления красителя кислородом воздуха. Пробирки помещают в термостат при 40 °С на 5-20 мин. (зависит от активности фермента).

Оформление работы:

При оформлении указывают фермент, кофермент, субстрат, ингибитор, донор и акцептор электронов в ткани, донор и акцептор электронов в опыте, а также заносят в тетрадь таблицу, добавив графу с наблюдениями.

Работа 17. Влияние pH на активность амилазы слюны

Цель работы – выявить влияние водородного показателя на ферментативную активность.

Оптimum pH для действия амилазы слюны можно определить при взаимодействии ее с крахмалом при различных значениях pH среды. О степени расщепления крахмала можно судить по реакции крахмала с раствором йода в течение времени. При оптимальном значении pH расщепление крахмала происходит полностью (фиолетовая окраска с йодом отсутствует). По мере удаления от точки оптимального pH в кислую или щелочную зону расщепление крахмала произойдет только частично до стадии декстринов (красно-бурая или фиолетовая окраска) или крахмал вообще расщепляться не будет (синяя окраска.)

Материал исследования: амилаза слюны.

Реактивы: крахмал, раствор Люголя; дистиллированная вода; растворы фосфатного буфера с разным значением pH (5,4 — 8,0).

Оборудование: стеклянные палочки; пипетки, пробирки; предметные стекла.

Ход работы.

Приготовление раствора амилазы слюны: рот ополаскивают 2–3 раза водой для удаления остатков пищи. В мерную пробирку вносят 1 мл слюны и добавляют 9 мл дистиллированной воды.

1. Перед началом работы определяют активность амилазы слюны. Для этого смешивают 1 мл раствора крахмала и 0,5 мл разбавленной 1: 10 слюны. Через каждые 2 мин отбирают по 1 капле этой смеси и смешивают ее с каплей раствора йода на предметном стекле. Крахмал должен полностью расщепляться приблизительно за 10 мин (появляется желтая окраска при пробе с йодом). Если расщепление происходит быстрее, слюну надо развести еще в 2, 3 или 4 раза.

2. В восемь пронумерованных пробирок добавляют по 2 мл фосфатного буфера с различным pH (от 5,4 до 8,0):

№ пробы	1	2	3	4	5	6	7	8
pH	5,4	5,8	6,2	6,6	6,8	7,0	7,4	8,0

Следует помнить, что при отмеривании разных буферных растворов нельзя пользоваться одной пипеткой. Необходимо использовать каждый раз чистую пипетку (или наливать из бюретки).

3. В каждую пробирку добавляют по 1 мл раствора крахмала и по 0,5 мл приготовленного раствора слюны (разбавленного в зависимости от активности амилазы 1:10; 1:20; 1:50; см. п. 1). Содержимое пробирок хорошо взбалтывают.

4. Через 1 мин из каждой пробирки отбирают каплю жидкости на предметное стекло и добавляют к ней каплю раствора йода. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще на 1 мин и после этого все повторяют. Определяют время реакции в каждой пробирке до появления красно-бурого окрашивания.

Оформление работы. Наблюдения заносят в лабораторный журнал в виде таблицы.

pH	5,4	5,8	6,2	6,6	6,8	7,0	7,4	8,0
Время реакции, мин								

Делают вывод об активности фермента при различных значениях pH среды.

Работа 18. Количественное определение активности грибных амилаз

Цель работы – освоить методы определения активности амилаз, используемые в пищевой промышленности.

Иногда для характеристики ферментных препаратов используют условные единицы активности. Так, для осахаривания зерна в процессе получения спирта используют ферментные препараты – грибные амилазы. Для сравнительного определения активности грибных амилаз используют метод Вольгемута. Метод основан на выявлении предельного разбавления раствора амилазы, при котором еще происходит в стандартных условиях расщепление определенного количества крахмала до эритродекстрина. Условные единицы активности амилаз выражают амилазным числом. Метод Вольгемута используют также для определения амилазной активности в биологических жидкостях.

Материал исследования: разбавленный (1:50) препарат грибных амилаз для использования на спиртовых заводах

Реактивы: 1%-ный крахмал в 1%-ном хлориде натрия; 10%-ная серная кислота; раствор Люголя.

Оборудование: термостат на 37°C; штатив лабораторный с пробирками; пипетки.

Ход работы.

Нумеруют 12 пробирок и вносят в каждую из них по 1 мл воды. Далее в пробирку 1 добавляют 1 мл препарата амилаз и хорошо перемешивают. Затем 1 мл жидкости из пробирки 1 переносят в пробирку 2. Жидкость в пробирке 2 также тщательно перемешивают и 1 мл жидкости из нее переносят в пробирку 3 и т.д. Из последней (12-й) пробирки 1 мл смеси выливают. В каждую пробирку вносят по 2 мл 1%-ного раствора крахмала. Все пробирки помещают в термостат при 37°C на 30 мин, а затем в них прибавляют по 1 мл 10%-ной серной кислоты (для прекращения действия фермента) и по 1-2 капли раствора Люголя.

Оформление работы. Наблюдения заносят в лабораторный журнал в виде таблицы, обозначая синюю, красную и желтую окраску буквами «с», «к» и «ж».

№ пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Разведение вытяжки в пробирках	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096
Окраска раствора												

Отмечают, при каком разведении произошел полный гидролиз крахмала, т. е. находят пробирку с желтой окраской, за которой следует пробирка с красно-фиолетовой окраской (неполный гидролиз). Допустим, что найденная граница лежит между пробирками 7 и 8 (т. е. в пробирке 7 раствор окрашен в желтый цвет). Умножив величину разбавления (в данном случае 128) на 2 (количество миллилитров раствора крахмала в опыте), получим амилазное число для данного ферментного препарата: $128 \times 2 = 256$, т. е. под влиянием амилаз, содержащихся в 1 мл неразбавленной вытяжки, произошло расщепление 256 мл 1%-ного раствора крахмала.

Работа 19. Обнаружение действия животной липазы и определение её активности

Цель работы - установить значимость фермента животной липазы для процесса пищеварения. Освоить метод определения активности животной липазы.

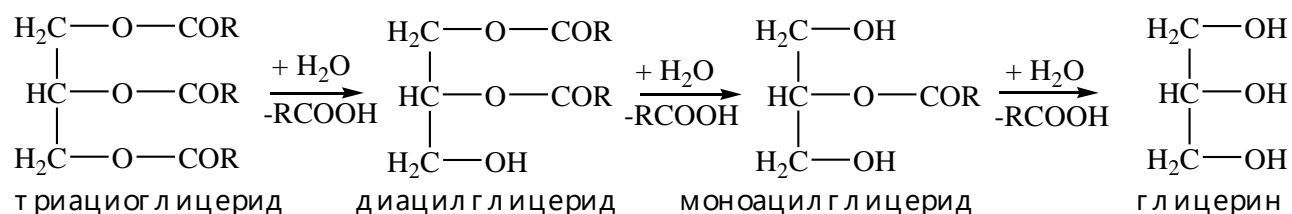
Жиры, или триацилглицерины, практически не всасываются в пищеварительном тракте. В тонкой кишке происходит их гидролиз, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой.

Панкреатическая липаза поступает в кишечник в виде неактивного предшественника – пролипазы. В просвете кишечника происходит активация пролипазы путем образования комплекса с низкомолекулярным белком – колипазой. Последняя присоединяется к пролипазе в молярном отношении 2:1. В результате липаза становится активной и устойчивой к действию трипсина.

Активная липаза катализирует гидролиз эфирных связей в $\alpha(1)$ - и $\alpha'(3)$ -положениях, в результате образуется β -моноацилглицерид и освобождаются две жирные кислоты. В панкреатическом соке помимо липазы содержится моноглицеридная изомераза – фермент, катализирующий внутримолекулярный перенос ацила из β -положения моноацилглицерида в α -положение. А эфирная связь в α -положении чувствительна к действию панкреатической липазы.

Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, моноацилглицерида) всасываются в стенках кишечника. В процессе переваривания и всасывания липидов важную роль играют желчные кислоты. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов переваривания. Липаза один из ферментов подкласса 1 класса гидролаз. Ферменты, входящие в состав этого подкласса,

действуют в присутствии воды на сложно-эфирные связи. Липаза катализирует гидролиз нейтрального жира.



Значительная часть населения страдает ожирением, которое, в свою очередь, провоцирует развитие болезней сердечно-сосудистой системы. Для лечения этих заболеваний необходимо понимание механизма их развития, что невозможно без знания нормальных процессов обмена липидов.

Причиной расстройств метаболизма липидов в организме часто является нарушение их пищеварения и всасывания, что в значительной мере зависит от присутствия желчных кислот. Это сопровождается стеатореей (*повышенное выведения жиров из организма с калом*), развитием гиповитаминозов жирорастворимых витаминов.

Принцип метода: При воздействии липазы на эмульгированные жиры молока происходит их гидролиз. Гидролиз жира сопровождается образованием свободных насыщенных жирных кислот (пальмитиновая, миристиновая, стеариновая и т.д.), количество которых постоянно увеличивается. Их определяют титрованием NaOH в присутствии фенолфталеина, который при нейтрализации кислот приобретает слабо-розовый цвет.

Материал: молоко, разведенное водой в соотношении 1:10

Реактивы и оборудование: 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина; 0,01н раствор NaOH; раствор панкреатина (6 мг/мл), содержащий липазу, колбы конические на 100 мл, пипетки, пробирки, бюретки, термостат.

Ход работы.

1. Определение кислотности молока.

В конические колбы наливают 5 мл разбавленного молока (1:10), добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют 0,01н раствором NaOH по каплям из бюретки до появления слабо-розового цвета (НЕ ПЕРЕТИТРОВАТЬ!!!). При первом титровании нейтрализуются органические кислоты – молочная и другие, которые присутствуют в молоке до начала действия липазы. Данные 2 титрований записывают в таблицу.

2. Определение активности липазы

В 6 пробирок наливают по 5 мл разбавленного молока и 0,5 мл раствора панктеатина. Содержимое пробирок хорошо перемешивают и ставят в термостат (температура 38 -40 °С). Каждые 10 минут из термостата вынимают по 2 пробирки, добавляют 2-3 капли фенолфталеина и титруют 0,01н раствором NaOH по каплям из бюретки до появления слабо-розового цвета (интенсивность окраски должна быть одинаковой для всех проб). Данные титрования записывают в таблицу.

Промежуток времени	V (NaOH), мл		
	№1	№2	Средний
до начала гидролиза			
через 10 мин			
через 20 мин			
через 30мин			

Оформление работы. На основании полученных данных изобразите графически динамику расщепления жира липазой, где по оси абсцисс откладывают время в минутах, а по оси ординат – объемом 0,01н раствора NaOH, пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный промежуток времени, после предварительного вычитания количества щелочи, израсходованной на титрование контрольной пробы.

Выразите активность липазы как концентрацию карбоксильных групп жирных кислот, образовавшихся в 100 мл молока за все время исследования, пользуясь следующей формулой:

$$C = \frac{4,5 \times C_{NaOH} \times \Delta V_{NaOH}}{V_{\text{молока}}}$$

где C - концентрация жирных кислот, образующихся в 100 мл молока (г/100мл);

C_{NaOH} - концентрация раствора NaOH (0,01н);

ΔV_{NaOH} — разность объемов раствора NaOH, израсходованный на титрование 5 мл молока за все время инкубации и контрольной пробы, мл;

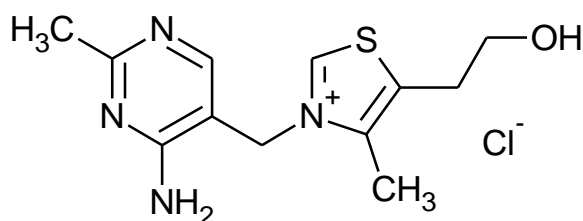
$V_{\text{молока}}$ - объем молока в титруемой пробе, (5мл).

Работа 20. Качественные реакции на витамины

Цель работы – ознакомиться с методами качественного определения витаминов в продуктах.

Качественные реакции используются для обнаружения витаминов. Эти реакции положены в основу количественного определения витаминов в различных источниках.

Опыт 1. Реакции на тиамин (витамин В₁)



В витамине В₁ имеется два гетероциклических кольца: пиримидиновое и тиазоловое, которые могут вступать в специфические для ароматических соединений реакции с участием гетероатомов.

Диазореакция на тиамин – образование сложного окрашенного соединения витамина В₁ с диазобензосульфокислотой.

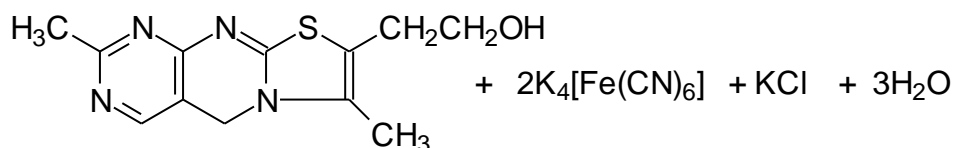
Материал исследования: раствор или порошок тиамина.

Реактивы и оборудование: 1% раствор сульфаниловой кислоты в HCl; 5% раствор нитрита натрия; 10% раствор карбоната натрия; стеклянная посуда; пипетки.

Ход работы. К 5 каплям раствора сульфаниловой кислоты прибавляют 5 капель раствора нитрита натрия и таким образом получают диазореактив. К диазореактиву прибавляют небольшое количество порошка тиамина (на кончике стеклянной палочки) и осторожно по стенкам пробирки 5-7 капель раствора карбоната натрия.

Реакция окисления тиамина в тиохром

При окислении тиамина образуется соединение (тиохром), обладающее голубой флуоресценцией в УФ-лучах.



Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Химическая структура и название витамина	Кофермент	Биологическая роль	Качественная реакция	Цвет раствора или флуоресценция	
				до реакции	после реакции

CC1=C(C)C=CN2C(=N1)C(=O)NC(=O)N2C[C@@H](O)[C@H](O)[C@H](O)[C@H](O)CO

Окисленная форма витамина В₂ представляет собой желтое флуоресцирующее в УФ-лучах вещество. Реакция на рибофлавин основана на его способности легко восстанавливаться. При восстановлении витамина В₂

образуется родофлавин красного цвета, а затем бесцветный лейкофлавин, который не флуоресцирует.

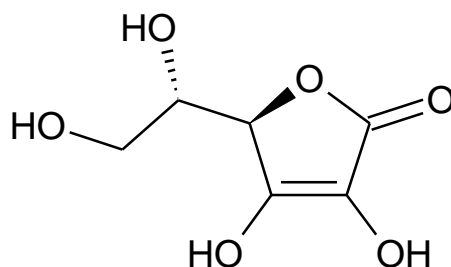
Реактивы и оборудование: концентрированная соляная кислота, кусочки цинка, УФ-лампа.

Ход работы. К 10 каплям раствора рибофлавина прибавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и опускают зернышко металлического цинка.

Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Химическая структура и название витамина	Кофермент	Биологическая роль	Качественная реакция	Цвет раствора или флуоресценция	
				до реакции	после реакции

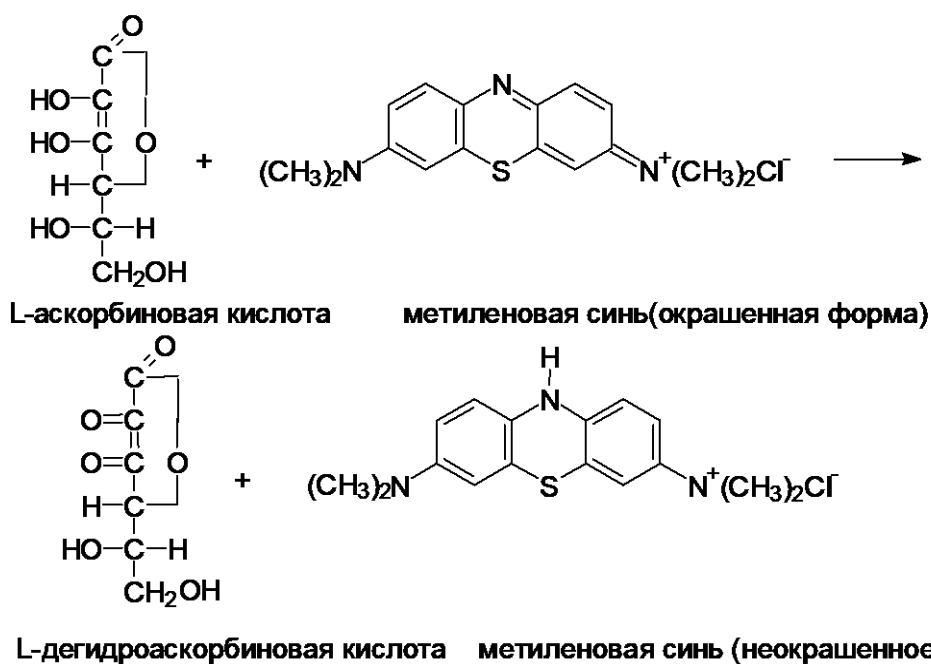
Опыт 3. Качественные реакции на аскорбиновую кислоту (витамин С)



Качественные реакции на витамин С основаны на его способности легко вступать в окислительно-восстановительные реакции, и восстанавливать метиленовую синь, 2,6-дихлорфенолиндофенол, гексацианоферрат (III) калия, нитрат серебра и др.

Материал исследования: раствор витамина С, фруктовые и овощные соки и др.

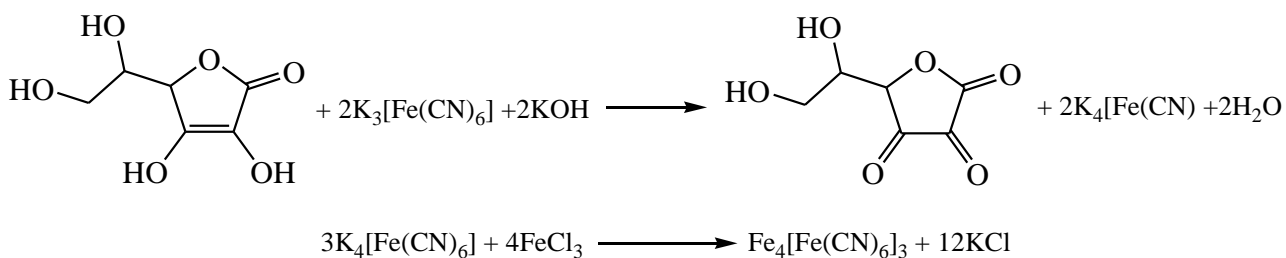
Взаимодействие витамина С с метиленовой синью



Реактивы и оборудование: 0,01% раствор метиленового голубого, термостат, пробирка с пробкой.

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл исследуемого раствора (например, сока) и прибавляют 1 мл раствора метиленовой сини, перемешивают и закрывают пробкой для предохранения от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробирку помещают в термостат при 37-40 °С. Через некоторое время наблюдают обесцвечивание раствора в пробирке за счет восстановления метиленовой сини в лейкоформу. При этом аскорбиновая кислота превращается в дегидроаскорбиновую. Если затем бесцветный раствор метиленовой сини энергично встряхнуть, то раствор вновь приобретает синий цвет.

Реакция витамина С с гексацианоферратом (III) калия



Реактивы и оборудование: раствор гексацианоферрата (III) калия, 5% раствор гидроксида натрия, 10% раствор соляной кислоты, раствор хлорида железа (III).

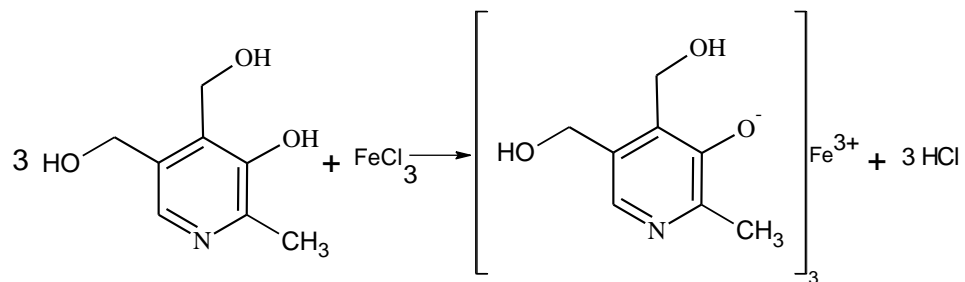
Ход работы. К 1 мл анализируемого раствора добавить 2 капли раствора щелочи, 6-8 капель раствора гексацианоферрата (III) калия и энергично встряхнуть содержимое пробирки. Затем в пробирку добавляют 6-8 капель кислоты и 1-2 капли раствора хлорида железа (III).

Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Структура витамина	Биологическая роль	Наблюдения

Опыт 4. *Феррихлоридная проба на пиридоксин (витамин В₆)*

Цветная реакция на витамин В₆ обусловлена образованием окрашенного в красный цвет комплекса, возникающего при взаимодействии витамина В₆ с хлорным железом.

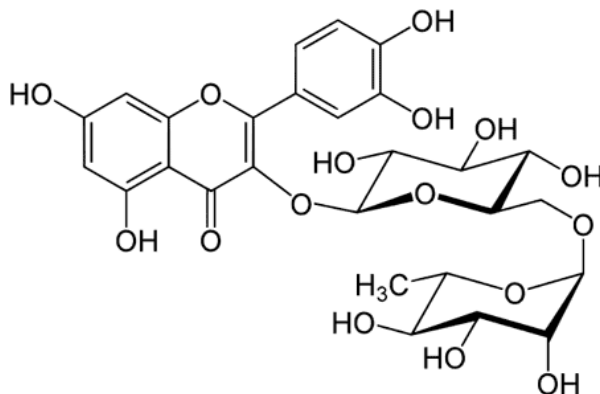


Реактивы и оборудование: хлорное железо, 5% раствор. Штатив с пробирками, пипетки вместимостью 1,0 и 5,0 мл.

Материал исследования: 5% водный раствор пиридоксина.

Ход работы. К 5 мл водного раствора пиридоксина добавляют 1 мл 5% раствора хлорного железа. Содержимое пробирки встряхивают, раствор приобретает красную окраску.

Опыт 5. *Качественная реакция на рутин (витамин Р)*



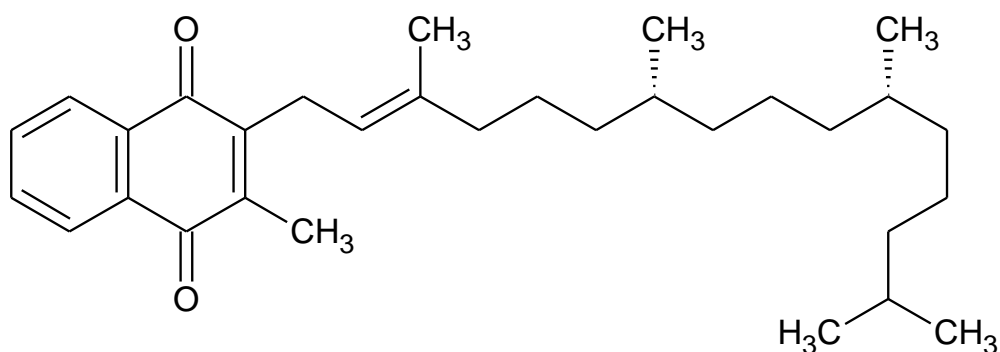
Метод основан на взаимодействии пирокатехинов с хлоридом железа (III) с образованием комплексного соединения зеленого цвета.

Реактивы и оборудование: хлорид железа (III), аналитические весы

Материал исследования: зеленый чай.

Ход работы: на аналитических весах взвешивают 100 мг зеленого чая, добавляют 15 мл дистиллированной воды и кипятят в течение 3 минут. После остывания отбирают в пробирку 1 мл экстракта и добавляют несколько кристалликов хлорида железа (III). Перемешивают и разводят в 2-3 раза дистиллированной водой. Развивается зеленое окрашивание.

Опыт 6. Реакция на викасол (витамин K)



В щелочной среде викасол способен образовывать с цистеином окрашенное соединение.

Материал исследования: спиртовой раствор викасола.

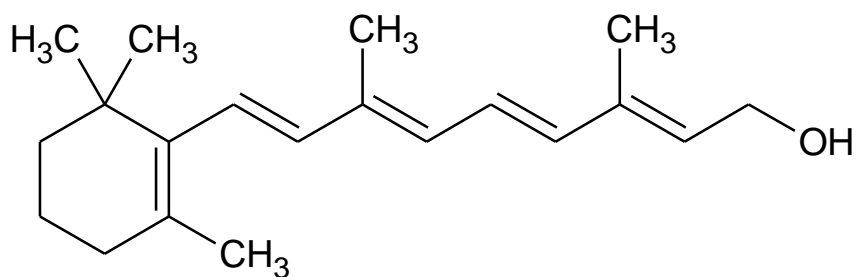
Реактивы и оборудование: 10% раствор гидроксида натрия, 0,025% раствор цистеина.

Ход работы. В пробирку наливают 1 мл раствора викасола (или 0,2% раствора метионина), затем прибавляют 2 капли раствора цистеина и 2 капли щелочи.

Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Структура витамина	Биологическая роль	Наблюдения

Опыт 7. Качественные реакции на ретинол (витамин A)



Материал исследования: растительное масло, рыбий жир, растительный экстракт.

Реакция с сульфатом железа (II)

Реактивы и оборудование: насыщенный раствор сульфата железа (II) в ледяной уксусной кислоте (свежеприготовленный), концентрированная серная кислота.

Ход работы. К 1-2 каплям растительного масла или рыбьего жира или 1 мл растительного экстракта в гексане или ацетоне добавляют 5-10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II) (в случае ацетонового экстракта добавляют смесь уксусной кислоты и ангидрида) и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Каротины дают зеленоватое окрашивание.

Реакция с серной кислотой (реакция Друммонда)

В основе данной реакции лежит способность серной кислоты отнимать от витамина А воду с образованием цветных продуктов.

Реактивы и оборудование: концентрированная серная кислота.

Ход работы. 1 каплю растительного масла растворяют в 4-5 каплях хлороформа и прибавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты.

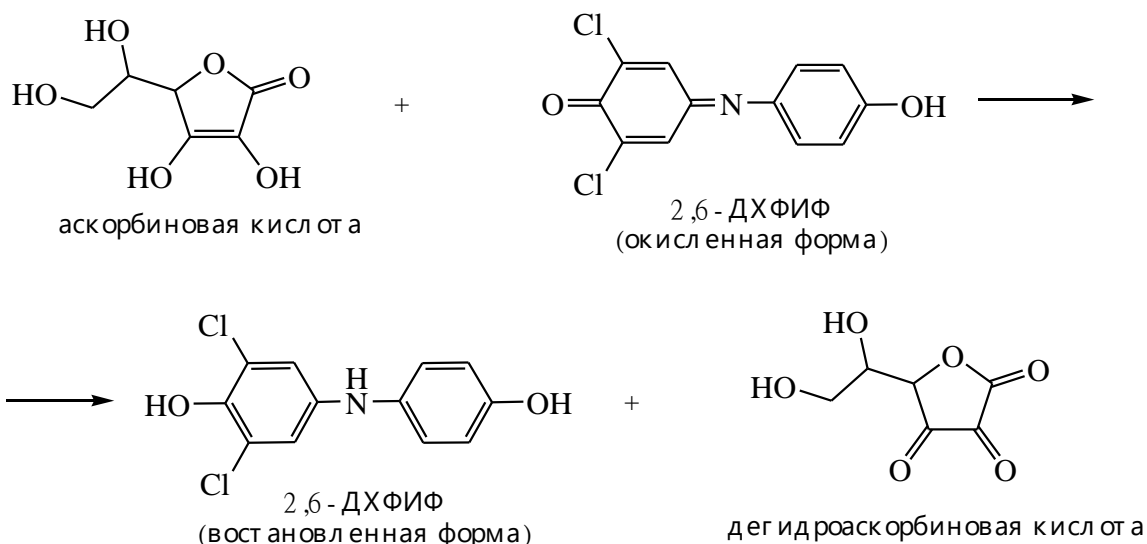
Оформление работы. Наблюдения заносят в таблицу.

Структура витамина	Биологическая роль	Наблюдения

Работа 21. Количественное определение аскорбиновой кислоты

Цель работы – освоить метод количественного определения витамина С в продуктах.

Принцип метода количественного определения витамина С основан на его способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ):



Окисленная форма 2,6-дихлорфенолиндофенола в щелочной и нейтральной среде имеет синюю окраску, в кислой – красную; восстановленная форма ДХФИФ – бесцветная.

По данному методу определяют только восстановленную форму аскорбиновой кислоты.

Реактивы и оборудование: 0,0005 М раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 5% раствор соляной кислоты, кварцевый песок, ступка и пестик; мерные колбы на 100 мл; коническая колба на 50 мл; микробюретка; воронка; фильтровальная бумага.

Ход работы.

Приготовление экстракта из растительного материала. Нарезают 10 г исследуемого материала (капуста, морковь, лимон, шиповник) мелкими кусочками и переносят в ступку. Тщательно растирают, добавляя маленькими порциями 5%-ный раствор соляной кислоты до получения жидкой кашицы. Смесь количественно переносят в мерную колбу на 100 мл. Ступку и пестик тщательно обмывают 5%-ным раствором соляной

кислоты, которую сливают в ту же мерную колбу, следя за тем, чтобы были затрачены все 50 мл соляной кислоты (конечная концентрация ее должна быть 2,5%) После этого содержимое мерной колбы доводят до метки дистиллированной водой, хорошо перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр. Полученный экстракт должен быть совершенно прозрачным.

Определение содержания аскорбиновой кислоты в экстракте. В коническую колбу на 50 мл берут пипеткой 10 мл полученного экстракта растительного материала. Содержимое колбы титруют 0,0005 М раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Работу повторяют с новой порцией того же экстракта.

Оформление работы. Результаты титрования записывают в лабораторный журнал. На основании средней величины титрования, полученной из 2 – 3 определений, вычисляют количество витамина С по формуле:

$$c = 100 \times C_{\text{ДХФИФ}} \times V_{\text{ДХФИФ}} \times M_{\text{аск.к-ты}}$$

где c – содержание аскорбиновой кислоты (в мг на 100 г исследуемого продукта);

$C_{\text{ДХФИФ}}$ – концентрация 2,6-дихлорфенолиндофенола (моль/л);

V – затраченный при титровании объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (мл);

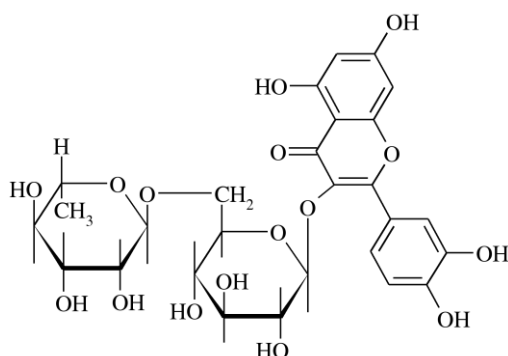
$M_{\text{аск.к-ты}}$ – молярная масса аскорбиновой кислоты (г/моль).

Делают вывод о содержании витамина С в исследуемом образце.

Работа 22. Количественное определение содержания рутина в чае

Цель работы - определить содержание витамина Р в различных сортах чая

В чайных листьях содержится около трехсот ингредиентов, включая белки, жиры, более 10 видов витаминов, а также танин, кофеин и эфирные масла. Поэтому чай питает организм, регулирует физиологические процессы и обладает общим оздоровительным воздействием. Достаточно большое количество его благотворных влияний приписывается содержащемуся в его составе витамину Р (рутину), который стабилизирует основное вещество соединительной ткани путем ингибирования гиалуронидазы, участвует в окислительно-восстановительных процессах организма (синергист витамина С), стимулирует желчеотделение. Суточная потребность составляет 25—50 мг [9].



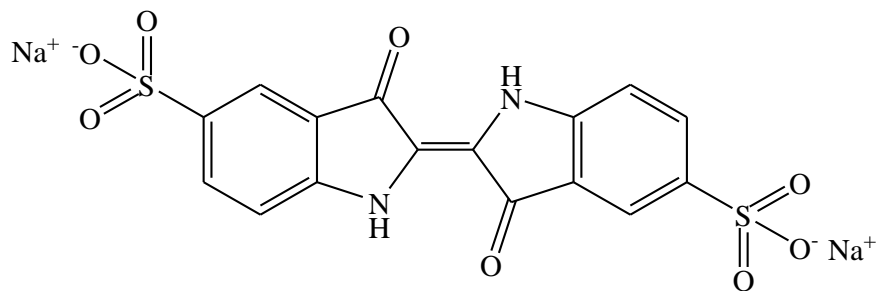
Структурная формула рутина

Недостаток рутина в организме характеризуется следующими проявлениями: общая слабость, быстрая утомляемость, боль в конечностях, мелкие геморрагии в зонах волосяных мешочков на коже. Основными источниками являются цитрусовые, красный перец, черная смородина, шиповник, зеленый чай, гречиха, вишня.

Для количественного определения витамина Р в чае используется методика Левенталя – титрование перманганатом калия в присутствии индигокармина.

Индигокармин — динатриевая соль индиго-5,5'-дисульфокислоты. Индигокармин применяется в химии как окислительно-восстановительный и

кислотно-основный индикатор (интервал pH области перехода от синей формы к жёлтой — 11,6-14,0).



Структурная формула индигокармина

Характерной особенностью является то, что при настаивании чая для сортов зеленого чая характерно увеличение степени экстракции витамина Р. Для черных чаев отмечается увеличение экстракции рутина на 5—10 минуте, с последующим уменьшением его содержания в экстракте вследствие его разрушения. При повторном заваривании чая экстракция витамина Р уменьшается. В среднем содержание витамина Р в сортах зеленого чая больше, чем в сортах черного чая.

Реактивы и оборудование: черные и зеленые чаи различных торговых марок (4 вида), 0,1% раствор индикатора - индигокармин в 20% растворе этилового спирта, 0,05 Н раствор перманганата калия.

Ход работы.

Навеску 100 мг каждого сорта чая переносят в термостойкие стаканчики и приливают 50 мл горячей дистиллированной воды. Производят экстракцию в течение 5 мин. Затем охлаждают каждый стаканчик с экстрактом чая до комнатной температуры.

Затем 10 мл экстракта чая переносят в коническую колбу для титрования, добавляют 10 мл дистиллированной воды и 5 капель индикатора индигокармин (появляется зеленое окрашивание). Приступают к процессу титрования: к содержимому конической колбы добавляют по каплям такое количество перманганата калия, чтобы раствор в колбе приобрел устойчивую желтую окраску. Титрование проводят по 3 раза с каждым экстрактом чая.

Определяют процентное содержание рутина по формуле:

$$X = \frac{3,2 * V_1 * V_2 * 100}{V_3 * m * 1000}$$

X – содержание витамина Р в препарате, г (%)

V₁ – объем 0,05 н раствора перманганата калия, пошедшего на титрование, мл
3,2 стандартный коэффициент пересчета, т.к. 1 мл 0,05 Н раствора КМnО₄ окисляет 3,2 мкг рутина

V₂ – объем, в котором растворена навеска чая (50 мл)

V₃ – объем экстракта, отобранный для анализа (10 мл)

100 – множитель для расчета процентного содержания

1000 – множитель для перевода микрограммов в миллиграммы

m – масса навески, мг