МИНОБРНАУКИ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
БОРИСОГЛЕБСКИЙ ФИЛИАЛ
(БФ ФГБОУ ВО «ВГУ»)

МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ ПО УЧЕБНОЙ ДИСЦИПЛИНЕ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Методические указания для обучающихся по освоению дисциплины

Вид учебных занятий	Деятельность студента
Лекция	Написание конспекта лекций: кратко, схематично, последовательно фиксировать основные положения, выводы, формулировки, обобщения; помечать важные мысли, выделять ключевые слова, термины. Проверка терминов, понятий с помощью энциклопедий, словарей, справочников с выписыванием толкований в тетрадь. Обозначение вопросов, терминов, материала, которые вызывают трудности, поиск ответов в рекомендуемой литературе. Если самостоятельно не удается разобраться в материале, необходимо сформулировать вопрос и задать преподавателю на консультации, на занятиях.
Лабораторные занятия	Конспектирование рекомендуемых источников. Работа с конспектом лекций, подготовка ответов к контрольным вопросам, просмотр рекомендуемой литературы для выполнения заданий на занятиях.
Подготовка к промежуточной аттестации	При подготовке к промежуточной аттестации необходимо ориентироваться на конспекты лекций, рекомендуемую литературу.

Методические материалы для обучающихся по подготовке к лабораторным занятиям

Лабораторная работа 1

Обнаружение аминокислот в растворах (нингидриновая реакция)

Альфа-аминокислоты окисляются кислородом нингидрина и подвергаются окислительному дезаминированию с образованием альдегида, аммиака и углекислого газа. Нингидрин при этом восстанавливается и конденсируется с невосстановленной молекулой нингидрина посредством молекулы аммиака. В результате получаются продукты конденсации, окрашенные в розовый, фиолетовый, синий цвет. Так как альфа-аминокислоты входят в состав белков, то нингидриновая реакция будет положительной как с аминокислотами, так и с белками.

Оборудование и реактивы: электроплитка**,** колбы на 100-250 мл, шприц-дозатор, пипетки, воронка, марля, стеклянные палочки, 1%-ные растворы аминокислот (глицина, глутамина, лейцина), 0,5%-ный раствор нингидрина в этаноле, белок куриного яйца (растворы других белков см. в Приложении).

Ход работы:

Задание 1. Провести нингидриновую реакцию с глицином, глутамином, лейцином.

1. В три пробирки внести по 5 капель каждой из аминокислот.
2. Добавить по 5 капель 0,5 %-ного раствора нингидрина.
3. Осторожно нагреть смесь в стакане с кипящей водой .
4. Отметить изменение окраски раствора.
5. Записать уравнение реакции.

Задание 2. Провести нингидриновую реакцию с раствором белка.

1. Приготовить раствор белка: белок 1 куриного яйца хорошо взбить и затем смешать в колбе при встряхивании с 10-кратным объёмом воды, профильтровать через двойной слой смоченной водой марли, помещенной в воронку.
2. Внести в пробирку шприцом-дозатором 3 мл раствора белка, прилить 5 капель 0,5%-ного раствора нингидрина.
3. Нагреть смесь на водяной бане (в стакане с горячей водой) при 70^0 в течение 2-3 мин. при помешивании.
4. Отметить изменение окраски.
5. Описать результаты наблюдений двух опытов, сделать вывод.

Вопросы и задания

1. Что означает окислительное дезаминирование аминокислот? Приведите общую схему реакции.
2. Какие аминокислоты являются кислыми, какие основными?
3. Перечислите серосодержащие аминокислоты, отметьте их значение в молекуле белков.
4. Назовите незаменимые аминокислоты, поясните почему они так называются.
5. Дайте биологическую оценку следующим гексапептидам: 1) глу-асп- про-ала-цис-глу; 2) глу-вал-про-три-ала-глу.

Лабораторная работа 2

Качественные реакции на белки (ксантопротеиновая и биуретовая реакции)

Методы качественного обнаружения белков основаны на двух типах реакций:

1 – по аминокислотным радикалам молекулы белка;

2 – по пептидным связям белковой молекулы.

Примером реакции первого типа служит ксантопротеиновая реакция. Она происходит при наличии в белках остатков ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина, триптофана). В результате реакции нитрования бензольного кольца образуются желтоокрашенные нитросоединения. Изменение желтой окраски в оранжевую в щелочной среде обусловлено появлением хромофорной группы.

Примером реакции второго типа является биуретовая реакция. При наличии в исследуемом соединении пептидных связей (–CO–NH–) в щелочной среде при добавлении сульфата меди образуется комплексное соединение, окрашенное в фиолетовый цвет.

Оборудование и реактивы: электроплитка, колбы на 100-250 мл, пробирки, пипетки, воронка, марля, шприц-дозатор, стеклянные палочки, концентрированная азотная кислота, 30%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди.

Ход работы:

Задание 1. Провести ксантопротеиновую реакцию на белок.

1. Приготовить раствор яичного белка (см. работу №1).
2. Внести в пробирку шприцом-дозатором 1 мл раствора белка.
3. Добавить 5 капель концентрированной азотной кислоты.
4. Осторожно нагреть (в стакане с кипящей водой).
5. Отметить изменения окраски.

6. Записать уравнение реакции.

<u>Задание 2.</u> Провести биуретовую реакцию на белок.

1. Внести в пробирку 1 мл разбавленного раствора белка.
2. Прибавить 2 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия.
3. Перемешать и добавить 2-3 капли 1%-ного раствора сульфата меди.
4. Вновь перемешать и отметить изменение окраски раствора.
5. Записать уравнение реакции.
6. Описать результаты наблюдений двух опытов, сделать вывод.

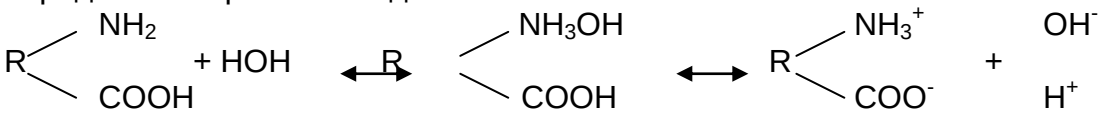
Вопросы и задания

1. Почему связь аминокислот в белках называется пептидной?
2. Какая реакция является качественной на наличие пептидной связи, в чем ее сущность?
3. Откуда произошло название «биуретовая реакция»?
4. Запишите реакцию поликонденсации аминокислот в виде схемы образования дипептида.
5. Является ли инсулин белком или пептидом?

Лабораторная работа 3

Определение изоэлектрической точки белков

Белки по химическим свойствам являются амфотерными веществами, т.е. обладают в одно и то же время свойствами кислот и оснований. Кислотные свойства белков проявляются за счет концевых карбоксильных групп и боковых групп дикарбоновых аминокислот. Щелочные свойства белков обусловлены аминогруппами. Присутствие кислых и основных групп в белках в водной среде определяет образование двойных ионов



У большинства белков реакция среды близка к нейтральной, но несколько сдвинута в кислую сторону, что объясняет преобладание кислых свойств над щелочными. Небольшое количество белков организма (гистоны, протамины) содержат больше аминных групп за счет преобладания лизина и аргинина, и в нейтральных растворах они ведут себя как слабые основания.

При определенном значении pH (для каждого белка неодинаковое) диссоциация карбоксильных групп становиться равной основной: число положительных зарядов равно числу отрицательных и в целом заряд белковой молекулы равен нулю. Белок, суммарный заряд которого равен нулю, находится в электронейтральном состоянии и в электрическом поле не будет передвигаться ни к катоду, ни к аноду; pH раствора, при котором белок находится в изоэлектрическом состоянии, называется изоэлектрической точкой белка (ИЭТ). Растворы белков в ИЭТ наименее устойчивы и белки выпадают в осадок. Исследуя состояние белков при различной концентрации водородных ионов в растворе, находят значение pH среды, соответствующие ИЭТ.

Оборудование и реактивы: штатив с пробирками, бюретки, шприц-дозатор; 0,1н уксусная кислота, 1%-ный раствор желатина в 1н растворе уксуснокислого натрия, этиловый спирт.

Ход работы:

1. Внести из бюретки в 6 пронумерованных пробирок дистиллированную воду по схеме.

	Номер пробирки					
	1	2	3	4	5	6

Раствор	Количество, мл					
Вода дистилл.	8,9	8,7	8,5	8,0	7,0	5,0
CH_3COOH, 0,1н	0,1	0,3	0,5	1,0	2,0	4,0
Желатин, 1%	1	1	1	1	1	1

2. Добавить из другой бюретки (или пипеткой) 0,1н уксусную кислоту соответственно схеме опыта.
3. Прилить шприцом-дозатором в каждую пробирку по 1 мл раствора желатина, содержимое взболтать и внести по 0,5 мл этилового спирта.
4. Через 10-20 минут наблюдать помутнение, которое обозначить по схеме: + слабая коагуляция, ++ средняя, +++ сильная. Занести результаты в таблицу.

Форма записи

	Номер пробирки / pH раствора					
	1	2	3	4	5	6
	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
Коагуляция						

5. pH раствора, где отмечена сильная коагуляция, соответствует изоэлектрической точке желатина.
6. Описать результаты наблюдений, сделать вывод.

Вопросы и задания

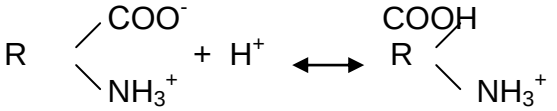
1. Чем определяются свойства белков?
2. При электрофорезе какие белки будут двигаться к аноду, какие к катоду и как будут вести себя белки, находящиеся в изоэлектрической точке?
3. Охарактеризуйте состояние белка в форме золя и геля.
4. Какие связи и взаимодействия формируют вторичную и третичную структуры белковой молекулы?
5. На какие виды делятся белки по форме молекулы? Приведите примеры.

Лабораторная работа 4

Реакции осаждения белков

В состав белков входят разнообразные аминокислотные радикалы, поэтому белки вступают во взаимодействие со многими соединениями (кислотами, ионами металлов, спиртами), а также конкурируют с ними за молекулы растворителя (воды). Во многих случаях результатом указанных процессов является выпадение белков в осадок. Обратимые осаждения белков достигаются добавлением к водным растворам нейтральных солей щелочных металлов $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl, KCl. Механизм действия: адсорбция ионов с противоположным зарядом на коллоидную частицу белка приводит к нейтрализации заряда и понижению устойчивости белка. Метод осаждения белков солями щелочных металлов называют высаливанием. Осадки белков (гель), полученные высаливанием, могут быть растворены при разбавлении водой, т.е. уменьшением концентрации солей.

В сильнокислой среде подавляется диссоциация белка по карбоксильным группам, и молекула белка заряжается положительно (белок находится в растворе даже при кипячении).



В слабокислой среде pH раствора приближается к изоэлектрической точке и возможно образование геля.

В щелочной среде понижается диссоциация белка по радикалам диаминокислот и его молекулы приобретают отрицательный заряд, поэтому он остается в растворе даже при нагревании.

$$R\begin{matrix} COO^- \\ NH_3^+ \end{matrix} + OH^- \longleftrightarrow R\begin{matrix} COO^- \\ NH_2 \end{matrix} + H_2O$$

Под влиянием ионов солей тяжелых металлов (свинца, меди, ртути серебра) белки из состояния золя необратимо коагулируют в гель, так как . ионы солей тяжелых металлов образуют прочные комплексные соединения с их молекулами. Свойства белков связывать тяжелые металлы используются в медицине как противоядие при отравлении солями ртути, меди, свинца. Из растворов белки могут осаждаться органическими кислотами (трихлоруксусной, сульфосалициловой), что используется для удаления белков из биологических жидкостей.

Оборудование и реактивы: штатив с градуированными пробирками, шприц-дозатор, пипетки, насыщенный раствор сернокислого аммония, 0,5%-ный раствор уксуснокислого свинца, 5%-ный раствор сернокислой меди, 20%-ный раствор сульфосалициловой кислоты, 0,1н уксусная кислота.

Ход работы:

1. В 5 пронумерованных пробирок внести шприцом-дозатором по 2 мл раствора яичного белка.
2. В 1 пробирку прибавить 2 мл насыщенного раствора сернокислого аммония.
3. В остальные пробирки по каплям (в избытке реактива осадок может раствориться) внести:
   2-я пробирка 0,5 %-ный раствор уксуснокислого свинца
   3-я пробирка 5 %-ный раствор сульфата меди
   4-я пробирка 20 %-ный раствор сульфосалициловой кислоты
   5-я пробирка 0,1н уксусную кислоту
4. Отметить происходящие изменения в растворе в каждой пробирке.
5. Описать результаты наблюдений, сделать вывод.

Вопросы и задания

1. Какие соединения вызывают осаждение белков?
2. Что является причиной выпадения белков в осадок?
3. Как ведут себя белки в кислой и щелочной среде?
4. Приведите примеры практического использования реакции осаждения белков.
5. Чем объясняется обезвреживающее действие этилового спирта на змеиный яд?

Лабораторная работа 5

Определение белка по азоту методом Кьельдаля

Большинство методов количественного определения белков основано на определении содержания общего азота в исследуемом растительном или животном объекте с последующим пересчетом на белок. Содержание азота в белках величина довольно постоянная и составляет в среднем 16 г на 100г белка. Исходя из этого коэффициент пересчета общего азота на белок равен 6,25 (100:16=6,25)

При определении общего азота органическое вещество минерализуют с концентрированной серной кислотой в присутствии катализаторов. Органическое вещество распадается, окисляясь до углекислого газа и воды. Азот при этом превращается в аммиак, который образует с серной кислотой аммонийную соль.

$R\text{-}CHNH_2\text{-}COOH + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4 + CO_2 + H_2O$

После сжигания аммонийная соль разлагается щелочью, а выделившийся аммиак отгоняют и поглощают борной кислотой.

$(NH_4)_2SO_4+2NaOH \rightarrow Na_2SO_4+2NH_3+H_2O$

$2NH_3+4H_3BO_3 \rightarrow (NH_4)_2B_4O_7+5H_2O$

Тетраборат аммония титруют точным раствором серной или соляной кислоты.

Оборудование и реактивы: весы аналитические (для учебных целей можно технические), аппарат Кьельдаля, электроплитка с асбестовой сеткой или песчаной баней, колба коническая на 250 мл, бюретка, серная кислота концентрированная, катализатор (0,5г сульфата меди и 4,5г сульфата калия), 40 %-ный раствор гидроокиси натрия, 2 %-ный раствор борной кислоты, 0,1н раствор серной кислоты, универсальная индикаторная бумага, смешанный индикатор (см. Приложение).

Ход работы:

1. Навеску 0,2-0,5 г измельчённого животного или растительного материала вносят в колбу Кьельдаля (методику взятия навески см. в Приложении).
2. Приливают 10 мл конц. серной кислоты, добавляют 5 г катализатора и осторожно перемешивают.
3. Горлышко колбы прикрывают стеклянной пробкой "слезкой" (или стеклянной воронкой), колбу ставят в вытяжном шкафу под тягой на электроплитку, закрепив в штативе, и нагревают сперва осторожно затем после прекращения вспенивания нагрев усиливают до слабого кипения.
4. Нагревание продолжают до исчезновения бурой окраски и после просветления жидкости нагревают еще 1-2 часа. В процессе сжигания содержание колбы периодически помешивают вращательными движениями, чтобы смыть частицы, попавшие на горло колбы.
5. Колбу охлаждают, ее содержимое количественно переносят с 200 мл дистиллированной воды (порциями 100, 50 и 50 мл), в перегонную колбу.
6. В перегонную колбу наливают 60 мл 40%-ного раствора гидроокиси натрия, закрывают пробкой с каплеуловителем (насадкой Кьельдаля), соединяют с холодильником Либиха, алонж (приставку) опускают в приемную коническую колбу с 40 мл 2%-ного раствора борной кислоты.
7. Колбу нагревают на электроплитке так, чтобы кипение было равномерным.
8. Через 10-15 мин проверяют окончание отгонки аммиака, подставляя индикаторную бумагу к стекающей жидкости. Отгонку считают оконченной, если цвет бумаги не изменяется.
9. В приемную коническую колбу вносят 6 капель смешанного индикатора и титруют из бюретки 0,1н раствором H_2SO_4 до изменения окраски от яркозеленой до фиолетовой. Записывают объём кислоты, пошедшей на титрование(V).
10. Рассчитывают содержание азота по формуле

    $X_{N2}=\frac{V \cdot 0{,}0014}{m}*100$, %

    где V – объем 0,1н H_2SO_4, мл;

    m – навеска, г;

    0,0014 – количество азота, соответствующего 1мл 0,1н H_2SO_4, г;

    100 – для пересчета в проценты.
11. Вычисляют содержание белка с учетом коэффициента

    $X_б=X_{N2} \cdot 6{,}25$, %

Вопросы и задания

1. Выделите три этапа в методе Кьельдаля.
2. Охарактеризуйте два типа реакций гидролиза белков, в каких условиях они протекают?

3. Какие ферменты катализируют гидролиз белков и пептидов? Какие продукты образуются?
4. Закодируйте в иРНК пептид из следующих аминокислот: лей, -ала, -три, -арг, -фен.
5. Какой белок имеет четвертичную структуру и чем она образована?

Лабораторная работа 6

Ускоренный колориметрический метод определения белка по Несслеру

Метод основан на способности сернокислого аммония, образующегося при минерализации животной или растительной ткани с серной кислотой, давать окрашенные соединения с реактивом Несслера. Действующим началом реактива Несслера является йодная ртуть, которая образует с аммиаком окрашенное соединение в коллоидной форме, имеющее эмпирическую формулу NH_2HgI_2. Цвет раствора буро-красный, интенсивность окраски зависит от количества аммиака в растворе.

Оборудование и реактивы: весы аналитические (для учебных целей можно технические), фотоэлектроколориметр, колбы конические термостойкие на 100-250 мл, колбы мерные на 50 мл и 100 мл, воронки стеклянные, пипетки на 1 мл, 2 мл, 10 мл, мерный цилиндр, бюретка, пробирки, серная кислота (конц.), 30 %-ная перекись водорода, 1 н раствор гидроокиси натрия, реактив Несслера, сернокислый аммоний.

Ход работы:

1. <u>Построение калибровочного графика.</u>

1.1. Готовят образцовый стандартный раствор азота путём растворения 0,118 г $(NH_4)_2SO_4$ в 100 мл дистиллированной воды (исходный раствор), с последующим разведением исходного раствора в 50 раз (1 мл исх. р-ра вносят в мерную колбу на 50 мл и доводят водой до метки).

1.2. Готовят стандартную шкалу азота, для этого в шесть мерных колбочек на 50 мл вносят из бюретки последовательно 3,0; 5,0; 8,0; 10,0; 12,0; 15,0 мл образцового стандартного раствора. В каждую колбочку прибавляют дистиллированной воды до 2/3 объема, затем по 2 мл реактива Несслера, доводят до метки и перемешивают.

1.3. В результате получена стандартная шкала, где растворы содержат соответственно 0,3; 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5 мкг (микрограмм) азота в 1 мл (С). Растворы колориметрируют на фотоэлектроколориметре с синим фильтром №3 [γ = 400 ммк (миллимикрон) в кювете с рабочей гранью 20 мм].

1.4. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество азота в 1 мл (С), на оси ординат – отвечающее ей значение оптической плотности – экстинции (*E*), определенное на колориметре.

2. Сжигание (минерализация).

2.1. Навеску измельченного растительного материала (0,2 г) или животного (0,1 г) помещают в коническую колбу, приливают 10 мл конц.H_2SO_4, осторожно перемешивают круговыми движениями, чтобы смесь возможно меньше попадала на стенки колбы.

2.2. Добавляют 1 мл 30%-ной перекиси водорода, колбу ставят в вытяжном шкафу на нагретую электроплитку с асбестовой сеткой и нагревают. При этом начинается бурная реакция, в результате которой навеска полностью растворяется в серной кислоте и содержимое колбы становится бесцветным.

2.3. Колбу нагревают до выделения белых паров (сернистого газа). Если при этом жидкость буреет, то колбу снимают, охлаждают и опять добавляют 1мл перекиси. Колбу снова нагревают до тех пор, пока жидкость не обесцветится.

2.4. Сжигание считается оконченным, если при интенсивном выделении белых паров жидкость остается бесцветной. Колбу охлаждают, содержимое переносят количественно в мерную колбу на 100 мл, раствор доводят до метки и перемешивают.

3. Определение азота.

3.1. В мерную колбу емкостью 50 мл вносят 1 мл минерализата. Для нейтрализации избытка серной кислоты в колбу добавляют 3,5 мл 1н раствора гидроокиси натрия (до pH 7,5–8,0 по универсальной индикаторной бумаге).

3.2. Содержимое колбы разбавляют дистиллированной водой до 2/3 объема, приливают 2 мл реактива Несслера, доводят водой до метки, перемешивают.

3.3. Полученный окрашенный раствор колориметрируют на фотоэлектроколориметре, по значению экстинции (Е) находят на калибровочном графике содержание азота в исследуемом растворе (С)мкг/мл.

3.4. При визуальной колориметрии в шесть пробирок наливают по 20 мл стандартных растворов шкалы (п.1.3), а в седьмую – 20 мл окрашенного исследуемого раствора (п.3.2). По цвету к седьмой пробирке на белом фоне подбирают аналогичный по интенсивности окраски раствор шкалы и записывают содержание в нем азота (С) мкг/мл.

3.5. Содержание белка (сырого протеина) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{C\cdot 100\cdot 50\cdot 100}{m\cdot 1\cdot 1000000}\cdot 6{,}25\%=\left[\frac{C\cdot 3{,}125}{m}-\right],\ \%$$

где: С – содержание азота в исследуемом растворе, определенное по стандартной шкале, (калибровочному графику), мкг/мл;

m – масса навеки, г;

100 – объем минерализата, мл;

50 – объем колориметрируемого раствора, мл;

100 – для пересчета в проценты;

1000000 – для пересчета содержания азота (С) из мкг в граммы;

6,25 – коэффициент пересчета общего азота на белок.

Вопросы и задания

1. В чем преимущество и особенности метода Несслера?
2. Перечислите три основные типа реакций превращения аминокислот.
3. В результате какой реакции из аминокислот получаются амины?
4. Какая из реакций превращения аминокислот является наиболее важной для их биосинтеза?
5. В результате какой реакции происходит обезвреживание аммиака у растений? Запишите уравнение реакции.

2. УГЛЕВОДЫ

Лабораторная работа 7

Восстанавливающая способность углеводов (реакция Троммера)

Углеводы, молекула которых содержит свободную альдегидную группу, называются восстанавливающими или редуцирующими. Они в щелочной среде способны окисляться и восстанавливать соли меди, серебра, висмута. На этом основан ряд методов качественного определения редуцирующих углеводов. Например, присутствие в растворе восстанавливающих углеводов можно определить реакцией Троммера.

В щелочном растворе глюкоза и другие редуцирующие углеводы восстанавливает гидроксид меди (II) в оксид меди (I). В щелочной среде при добавлении раствора сульфата меди образуется осадок гидроксида меди (II), который в присутствии глюкозы растворяется, окрашивая жидкость в голубой цвет (гидроксид меди I). При нагревании раствор сперва окрашивается в желтый цвет, а затем переходит в красный – образуется оксид меди(I).

При проведении реакции Троммера необходимо следить, чтобы не было избытка сульфата меди, поэтому он добавляется по каплям до прекращения растворения образующегося гидроксида меди. Реакция Троммера идет количественно и избыток гидроксида меди при нагевании теряет воду и переходит в оксид меди II, выпадающий в виде черного осадка.

Оборудование и реактивы: электроплитка, штатив с пробирками, шприц-дозатор, стаканы на 200-300 мл, пипетки, 0,5%-ный раствор глюкозы, 0,5%-ный раствор сахарозы, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди.

Ход работы:

1. В две пробирки внести по 1 мл 0,5%-ного раствора глюкозы и сахарозы.
2. Прилить по 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия.
3. Добавить по каплям 1%-ный раствор сульфата меди, пока не прекратится его растворение (до появления неисчезающей при взбалтывании голубой мути).
4. Пробирки нагреть (в стакане с кипящей водой) и отметить изменение окраски растворов.
5. Описать результаты наблюдений.
6. Сделать вывод.

Вопросы и задания

1. В чем сущность реакции Троммера?
2. Какие соединения образуются при добавлении к щелочному раствору глюкозы раствора сульфата меди?
3. Что нужно сделать, чтобы голубой цвет раствора перешел в красный и какие при этом образуются соединения?
4. Что может произойти при добавлении излишка сульфата меди?
5. Запишите уравнение реакции Троммера.
6. Приведите примеры редуцирующих и нередуцирующих углеводов.

Лабораторная работа 8

Исследование восстанавливающей способности сахаров реакцией Фелинга

Редуцирующие свойства сахаров можно определить реакцией Фелинга. Она основана на том же принципе, что и реакция Троммера. Отличие в том, что в

реакции Фелинга используется гидроксид меди (II) не в свободном состоянии, а в связанном. Он входит в состав реактива Фелинга в виде комплекса с тартратами (вино-кислыми солями) натрия и калия (сегнетовая соль). В данной реакции сегнетовая соль обеспечивает удержание в растворе гидроксид меди.

Реакция Фелинга позволяет избежать недостаток реакции Троммера, при которой избыток сульфата меди приводит к образованию черного осадка оксида меди II ($Cu(OH)_2 \rightarrow CuO\downarrow + H_2O$).

Качественными реакциями на редуцирующие сахара являются также реакция Бенедикта и реакция Гайнеса, в которых избыток гидроксида меди связывается лимоннокислым натрием (в реакции Бенедикта) и глицерином (в реакции Гайнеса).

Оборудование и реактивы: электроплитка, штатив с пробирками, стаканы, пипетки, реактив Фелинга (состоит из двух растворов: 1)34,6 г сегнетовой соли, 10,3 г гидроксида натрия, воды до 100 мл; 2) 6,9 г сульфата меди, воды до 100 мл; оба раствора хранят отдельно и смешивают в равных количествах перед употреблением), 0,5%-ный раствор глюкозы, 1%-ный раствор фруктозы (меда, водного экстракта яблок).

Ход работы:

1. Внести в пробирки по 1мл исследуемых растворов.
2. Прилить по 1 мл реактива Фелинга, перемешать, нагреть до кипения.
3. Отметить изменение цвета, выпадение осадка (при концентрации глюкозы и фруктозы в водной вытяжке яблок 0,5-1,0% – окраска желто-зеленая, при 1% – желтая, свыше 2% – красная).
4. Описать результаты наблюдений.
5. Сделать вывод.

Вопросы и задания

1. В чем принцип реакции Фелинга?
2. Поясните отличие реакции Фелинга от реакции Троммера?
3. В чем преимущества и недостатки каждой из реакций?
4. С растворами каких углеводов реакции Фелинга и Троммера будут положительны?
5. Назовите известные реакции, позволяющие проводить качественные реакции на редуцирующие сахара.

Лабораторная работа 9

Цветные реакции на сахара

Моносахариды и дисахариды, имеющие свободную альдегидную группу являются редуцирующими сахарами, т.е. способны, окисляясь в щелочной среде, восстанавливать многие вещества. На этом основаны реакции обесцвечивания метиленовой сини и индигокармина.

Оборудование и реактивы: электроплитка, штатив с градуированными пробирками, стаканы, пипетки, раствор метиленовой сини (1:1000), раствор индигокармина (1:1000), 5%-ный раствор глюкозы,20%-ный раствор карбоната натрия.

Ход работы:

1. В две пробирки налить по 1мл раствора глюкозы и по 3 капли раствора карбоната натрия.
2. В пробирку №1 внести 3 капли раствора метиленовой сини и нагреть в стакане с кипящей водой. Наблюдать обесцвечивание окраски.
3. В пробирку №2 внести 3 капли раствора индигокармина и прокипятить (в стакане с кипящей водой). Синий цвет раствора переходит в желтый.

4. При охлаждении жидкостей и встряхивании в 1 и 2 пробирках вновь появляется синее окрашивание, так как метиленовая синь и индигокармин окисляются за счет кислорода воздуха.
5. Описать результаты наблюдений.
6. Сделать вывод.

Вопросы и задания

Перечислить углеводы, имеющие свободную альдегидную группу.
Какое соединение образуется в результате окисления глюкозы?
3. Чем отличаются структурные формулы окисленной и восстановленной форм метиленовой сини?
4. Какой признак дает основания заключить, что метиленовая синь и индигокармин восстановлены?

Лабораторная работа 10

Кислотный ступенчатый гидролиз крахмала

При нагревании крахмала с серной или соляной кислотой он расщепляется с образованием более простых полисахаридов с меньшей молекулярной массой – декстринов. При дальнейшей обработке молекулярная масса декстринов падает и конечным продуктом является глюкоза. Крупномолекулярные декстрины окрашиваются йодом в красный цвет, низкомолекулярные – окраски с йодом не дают.

Схема ступенчатого гидролиза крахмала:

Крахмал ← конц. серная кислота, $t = 100^0$, 1-2 мин.
Амилодекстрины + J_2 → сине-фиолетовое окрашивание.
Эритродекстрины + J_2 → красно-бурое окрашивание.
Ахродекстриты + J_2 → окраски не дают.
Мальтодекстрины + J_2 → окраски не дают.
Мальтоза + J_2 → окраски не даёт.
Глюкоза + J_2 → окраски не даёт.

Оборудование и реактивы: электроплитка, штатив с пробирками, шприц-дозатор, пипетки, 1%-ный крахмальный клейстер, серная кислота конц., раствор Люголя, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди, универсальная индикаторная бумага.

Ход работы:

1. Внести в пробирку шприцом-дозатором 5 мл крахмального клейстера .
2. Прибавить 5 капель концентрированной серной кислоты.
3. Перемешать и нагревать в стакане с кипящей водой.
4. Для проведения реакции с йодом в четыре пробирки внести по 3 мл дистиллированной воды и 1 капле раствора Люголя.
5. Через 1-2 мин. после начала кипения гидролизуемого раствора взять пробу примерно 0,3 мл для реакции с йодом.
6. Отметить окрашивание раствора, результаты занести в таблицу (время–окраска раствора).
7. Пробирку с гидролизуемым раствором крахмала продолжать кипятить и проводить отбор проб через 1-2 мин. до отрицательной реакции с йодом.
8. Отмечать изменение окраски раствора и результаты заносить в таблицу.
9. Гидролизат крахмала охладить и нейтрализовать 10%-ным раствором гидроксида натрия по индикаторной бумаге, добавить 1%-ный раствор сульфата меди до прекращения его растворения, нагреть, отметить изменение окраски.
10. Описать результаты наблюдений, сделать вывод.

Вопросы и задания

1. Из какого мономера состоит крахмал и какими связями соединен данный мономер?
2. Составьте упрощенную схему структуры крахмала.
3. Какие соединения образуются при гидролизе крахмала и какими реакциями их можно обнаружить?
4. Перечислите наиболее распространенные гомополисахариды, чем они отличаются от гетерополисахаридов?

Лабораторная работа 11

Гидролиз клетчатки

Клетчатка является достаточно устойчивым соединением. Она нерастворима в воде и в подавляющем большинстве агентов. Устойчивость клетчатки объясняется тем, что ее длинные нитевидные молекулы, взаимодействуя друг с другом, образуют прочные мицеллы, которые собраны в фибриллы, располагающиеся вдоль оси волокна. Отрыв индивидуальных молекул клетчатки от этих устойчивых агрегатов затруднен, и только немногие вещества способны нарушать межмолекулярные связи в мицеллах и растворять клетчатку.

Оборудование и реактивы: электроплитка, штатив с пробирками, стаканы, универсальная индикаторная бумага, 72%-ный раствор серной кислоты (3:1), 40%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди, вата.

Ход работы:

1. В пробирку поместить кусочек ваты, залить его раствором серной кислоты.
2. Через 15-20 мин. (после полного растворения ваты) раствор осторожно развести водой в 10 раз и прокипятить.
3. Раствор остудить и нейтрализовать раствором гидроксида натрия до явно выраженной щелочной реакции по индикаторной бумаге.
4. Добавить по каплям раствор сульфата меди до появления не исчезающей при взбалтывании голубой мути гидроксида меди.
5. Пробирку поставить в стакан с кипящей водой, наблюдать изменение окраски.
6. Описать результаты, сделать вывод.

Вопросы и задания

1. Какой продукт образуется в результате полного гидролиза клетчатки? Напишите его химическую формулу.
2. В чем сходство и отличие в строении клетчатки и крахмала?
3. Под влиянием какого фермента происходит гидролиз клетчатки? Где этот фермент образуется?
4. В какие клеточные структуры входит клетчатка и каково там ее содержание?

3. ЛИПИДЫ

Лабораторная работа 12

Определение кислотного числа жира

Кислотное число характеризует наличие в жире свободных жирных кислот. Измеряется оно количеством миллиграммов гидроксида натрия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот в 1г жира.

Кислотное число характеризует качество жира. В процессе хранения происходит гидролиз глицеридов и накопление свободных жирных кислот. Повышенная кислотность жира указывает на снижение его качества. Кислотное число свежего жира обычно не превышает 1,2-3,5.

Оборудование и реактивы: весы технические, колба коническая, мерный цилиндр, бюретка, пипетка, спиртово-эфирная смесь (1:1), 0,1н раствор гидроксида натрия, 0,1%-ный спиртовый раствор фенолфталеина, подсолнечное масло.

Ход работы:

1. В колбу внести 1г подсолнечного масла.
2. Отмерить мерным цилиндром 10 мл спиртово-эфирной смеси, влить в колбу, хорошо перемешать (работы вести в вытяжном шкафу).
3. Внести 2 капли раствора фенолфталеина.
4. Титровать 0,1н раствором гидроксида натрия до розовой окраски, не исчезающей в течение 1 мин., отметить объем раствора гидроксида натрия, пошедший на титрование.
5. Кислотное число вычислить по формуле:

   К.ч.= $\frac{V \cdot 4{,}0 \cdot K}{m}$,

   где V – объем 0,1н гидроксида натрия, пошедший на титрование, мл;
   4,0 – количество мг гидроксида натрия, содержащееся в 1 мл 0,1н раствора;
   К – поправочный коэффициент к титру 0,1н раствора гидроксида натрия;
   m – навеска жира, г.

Вопросы и задания

1. В чем состоят функции липидов?
2. К какому классу химических соединений относятся жиры?
3. Какие органические кислоты относятся к высшим жирным кислотам?
4. Как происходит гидролиз жиров и распад глицерина?
5. Сравните энергетический выход при распаде 1 молекулы жира и 1 молекулы глюкозы?

Лабораторная работа 13

Определение йодного числа жира

Йодным числом называют количество граммов йода, которое может прореагировать со 100 г жира.

Это число позволяет оценить степень непредельности жира, обусловленную наличием в нем глицеридов, кислоты которых содержат двойные связи. Чем больше в жире ненасыщенных жирных кислот, тем выше его йодное число. Оно составляет: в говяжьем жире 27-47, свином 46-66, подсолнечном масле 129-136, льняном масле 175-201.

Определение йодного числа основано на реакции присоединения йода по месту разрыва двойных связей у ненасыщенных высших жирных кислот.

$$R-CH=CH-R + I_2 + H_2O \rightarrow R-\underset{\underset{I}{|}}{CH}-\underset{\underset{OH}{|}}{CH} + HI$$

Йод добавляется к раствору жира в избытке, а непрореагировавший остаток йода оттитровывают тиосульфатом натрия.

Оборудование и реактивы: колбы конические с пробками, бюретка, пипетка на 10 мл, хлороформ, 0,1н спиртовой раствор йода, 0,1н раствор тиосульфата натрия, 1%-ный раствор крахмала (1%-ный крахмальный клейстер), подсолнечное масло.

Ход работы:

1. В колбу внести 0,1г масла.
2. Добавить 5 мл хлороформа, перемешать до растворения.
3. Отмерить точно и внести 10 мл 0,1н раствора йода.
4. Перемешать содержимое и выдержать 5 мин в темном месте.
5. Титровать при постоянном взбалтывании 0,1н раствором тиосульфата натрия ($Na_2S_2O_3$) до появления светло-желтого окрашивания.
6. Добавить 1 мл раствора крахмала и титровать до исчезновения синего окрашивания.
7. Провести титрование контрольной пробы (без масла) по п.2-6.
8. Вычислить йодное число (ИЧ) по формуле:

$$ИЧ = \frac{(V_к - V_0) \cdot K \cdot 0{,}01269 \cdot 100}{m},$$

где $V_к$ – объем 0,1н $Na_2S_2O_3$, израсходованного на титрование контрольной пробы, проводимой параллельно, исключая п.1 (без масла);

V_0 – объем 0,1н раствора $Na_2S_2O_3$, пошедший на опытную пробу;

К – коэффициент поправки к титру 0,1н раствора $Na_2S_2O_3$;

0,01269- количество граммов йода, эквивалентное 1 мл 0,1н $Na_2S_2O_3$;

100 – коэффициент пересчета на 100 г жира;

m – масса навески жира, г.

Вопросы и задания

1. Какие липиды относятся к простым, какие к сложным?
2. Какие жирные кислоты входят в состав растительных масел?
3. Каким путем идет распад высших жирных кислот?
4. Напишите структурную формулу простого липида и сложного.

4. ФЕРМЕНТЫ

Лабораторная работа 14

Открытие амилазы в слюне

В слюне присутствует фермент альфа-амилаза. Она осуществляет гидролиз крахмала через промежуточные продукты распада (декстрины) до мальтозы. Нерасщепленный крахмал с йодом дает синее окрашивание, а декстрины в зависимости от величины частиц – фиолетовую, красно-бурую, оранжевую окраску, до обесцвечивания (декстрины с молекулярной массой менее 4000 Д и мальтоза окраски с йодом не дают).

Оборудование и реактивы: электроплитка, штатив с пробирками, колбы на 100-250 мл, мензурка, воронка, стаканы лабораторные, шприц-дозатор,1%-ный крахмальный клейстер, раствор Люголя, 1%-ный раствор сульфата меди, 10%-ный раствор гидроксида натрия.

Ход работы:

1. Приготовить раствор слюны: рот ополоснуть 2 раза водой, отмерить мензуркой 50 мл дистиллированной воды и ополоснуть ею рот в течение 3-5 мин в несколько приемов, собранную жидкость профильтровать в колбу через вату.
2. В две пробирки внести шприцом-дозатором по 5 мл крахмального клейстера.
3. Добавить в первую пробирку 5 мл воды, во вторую – 5 мл раствора слюны.
4. Поместить пробирки в стакан с горячей водой при 40^0С на 1 мин.
5. Для проведения реакции с йодом внести в две пробирки по 3 мл дистиллированной воды и по 1 капле раствора Люголя.
6. Взять пробы около 0,3 мл из опытных пробирок и провести реакции с раствором Люголя, отметить окраску растворов.
7. Повторить взятие проб для реакции с раствором Люголя через 2, 4, 6, 8 мин.
8. Полученные данные оформить в виде таблицы: время – окраска раствора.
9. После окончания опыта в пробирках провести реакцию Троммера или Фелинга.
10. Описать результаты, сделать вывод.

Вопросы и задания

1. К какому классу ферментов относится амилаза?
2. Назовите известные амилазы, какие связи они гидролизуют и до каких продуктов?
3. Как влияет pH среды на действие амилазы?
4. Дайте характеристику трансфераз и изомераз.
5. Какие трансферазы называют киназами?

Лабораторная работа 15

Открытие альдегидоксидазы в сыром молоке

Альдегидоксидаза накапливается в молоке при размножении в нем микрофлоры. Она обнаруживается по обесцвечиванию метиленового синего, раствор которого прибавляют к молоку. При наличии альдегидоксидазы происходит восстановление метиленового синего до его бесцветной формы. Донором атомов водорода может служить формальдегид.

$$HCOH + HOH + MC \longrightarrow H\,COOH + MC{\cdot}H_2$$

Формальдегтд Окисленная форма Муравьиная Восстановленная (синяя) кислота форма (бесцветная)

Оборудование и реактивы: электроплитка, шприц-дозатор, штатив с пробирками, пипетки, стаканы лабораторные, 0,5%-ный раствор формальдегида; 0,01 %-ный водный раствор метиленового синего, молоко.

Ход работы:

1. В две пробирки внести по 3 мл молока.
2. Одну пробирку поместить в стакан с кипящей водой , кипятить 2-3 мин и остудить.
3. В обе пробирки внести по 1 мл раствора формальдегида и по 1 мл метиленового синего.
4. Пробирки поместить в стакан с горячей водой при 40^0 и следить за ходом реакции.
5. Отметить изменение окраски молока.
6. Описать результаты наблюдений, сделать вывод.
7. Если бесцветный раствор молока с метиленовым синим встряхнуть на воздухе , то раствор вновь приобретает синий цвет за счет окисления кислородом воздуха.

$$MC \cdot H_2 + O_2 \rightarrow MC + H_2O_2$$

Вопросы и задания

1. Дайте общую характеристику оксидоредуктаз.
2. Какие коферменты входят в состав оксидоредуктаз?
3. Чем характерны оксидазы и анаэробные дегидрогеназы?
4. Опишите механизм действия ферментов.

Лабораторная работа 16

Специфичность действия амилазы слюны

Амилаза слюны ускоряет гидролиз только полисахаридов, не оказывая действия на дисахариды. Продуктом гидролиза крахмала под действием альфа-амилазы слюны является мальтоза. Ее можно обнаружить реакцией Троммера, так как она имеет свободную альдегдную группу и является редуцирующим углеводом. Под действием альфа-амилазы слюны сахароза не гидролизуется, поэтому в данной реакции остается без изменения в виде дисахарида.

Оборудование и реактивы: электроплитка, штатив с пробирками, пипетки, шприц-дозатор, стаканы, 1%-ный раствор сульфата меди, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 0,5%-ный раствор сахарозы, 1%-ный крахмальный клейстер, разбавленная слюна (1:10), раствор Люголя.

Ход работы:

1. В две пробирки внести по 1 мл разбавленной слюны.
2. В 1-ю пробирку добавить 1 мл крахмального клейстера, во 2-ю – 1 мл раствора сахарозы.
3. Пробирки поместить в стакан с водой при $37–40^0$ и выдержать 15 мин.
4. Из первой пробирки взять пробу и провести реакцию с раствором Люголя, отметить окраску раствора.
5. С растворами в первой и второй пробирках провести реакцию Троммера (добавить по 0,5 мл 1%-ного раствора сульфата меди и по каплям до появления осадка 10 %-ный раствор гидроксида натрия).
6. Пробирки нагреть в стакане с кипящей водой и отметить окраску растворов.
7. Описать результаты наблюдений, сделать вывод.

Вопросы и задания

1. На чем основана специфичность действия ферментов?
2. Какие соединения образуются при гидролизе крахмала под действием амилаз?

3. Какой фермент катализирует реакцию гидролиза сахарозы? Какие образуются в результате продукты?
4. Как влияет pH среды на каталитическую активность ферментов?

Лабораторная работа 17

Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы слюны

Регуляция деятельности ферментов осуществляется как в клетке, так и вне её путем присоединения к молекуле ряда низкомолекулярных веществ. Функцию активаторов часто выполняют ионы металлов и некоторые анионы. Ингибиторами могут быть неорганические соли, метаболиты, гормоны.

Оборудование и реактивы: штатив с пробирками, шприц-дозатор, пипетки, 1%-ный крахмальный клейстер, 1%-ный раствор хлорида натрия,
1% -ный раствор сульфата меди, раствор Люголя, разбавленная слюна (1:10)
.

Ход работы:

1. Внести в три пронумерованные пробирки шприцом-дозатором по 1 мл раствора слюны.
2. Добавить: в 1-ю пробирку 2 капли 1%-ного раствора хлорида натрия, во 2-ю – 2 капли 1%-ного раствора сульфата меди, 3-ю пробирку оставить для контроля.
3. Прилить в каждую пробирку по 0,5 мл крахмального клейстера, перемешать и оставить в штативе при комнатной температуре на 3 мин.
4. Внести в три пробирки по 1 мл дистиллированной воды и по 1 капле раствора Люголя, затем добавить по 3 капли содержимого опытных пробирок.
5. Отметить изменение окраски растворов (при необходимости реакцию с раствором Люголя повторить через 1-2 мин).
6. Результаты наблюдений оформить в таблице.
7. Установить степень гидролиза крахмала в разных вариантах опыта.
8. Сделать вывод.

Вопросы и задания

1. Какие три центра содержит активный центр фермента?
2. Какие добавочные группы входят в состав двухкомпонентных белков-ферментов?
3. Какие ионы чаще всего являются активаторами или ингибиторами ферментов?
4. Чем вызвано влияние активаторов на каталитическую активность ферментов?
5. Охарактеризуйте действие ингибиторов.

Лабораторная работа 18

Влияние температуры на активность амилазы слюны

На активность ферментов оказывает влияние температура: низкая температура снижает активность, а с ее повышением от минимальной до оптимальной активность ферментов увеличивается. Для большинства ферментов оптимальная температура составляет 37-40^0. Высокие температуры (более 60^0) ингибируют (денатурируют) ферменты.

Оборудование и реактивы: электроплитка**,** штатив с пробирками, термометры, пипетки (или щприц-дозатор), стаканы, палочки стеклянные, чашки Петри, 1%-ный крахмальный клейстер, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди, раствор Люголя, раствор слюны (1:10).

Ход работы:

1. Пронумеровать 4 пробирки и внести шприцом-дозатором по 2мл 1%-ного крахмального клейстера.
2. Пробирку №1 поместить в кипящую водяную баню (в стакан с кипящей водой), пробирку №2 – в стакан с водой при 40^0, пробирку №3 оставить при комнатной температуре, пробирку №4 поместить в лед.
3. Через 10 мин во все пробирки добавить по 0,5 мл раствора слюны и помешать стеклянной палочкой.
4. Для наблюдения за ходом гидролиза через 1,2,4,6,8 и 10 мин отбирать пробы из каждой пробирки и проводить реакцию с раствором Люголя.
5. Отмечать изменение окраски растворов в каждой пробирке и заносить результаты наблюдений в таблицу (№ пробирки, температура, результаты реакции через 1,2,4,6,8,10 мин).
6. Сделать вывод о величине температурного оптимума амилазы слюны.

Вопросы и задания

1. В чем отличие ферментов от неорганических катализаторов?
2. Какие типы реакций катализируют ферменты?
3. Перечислите свойства ферментов.
4. Как влияет температура на ход ферментативной реакции?

5. ВИТАМИНЫ

Лабораторная работа 19

Качественные реакции на жирорастворимые витамины

Для витамина А характерны цветные реакции с треххлористой сурьмой и серной кислотой. При взаимодействии витамина А с насыщенным раствором хлорида сурьмы в хлороформе образуется окрашенный в синий цвет продукт. В присутствии серной кислоты витамин А гидролизуется с образованием голубого окрашивания, быстро переходящего в буро-красное(возможен сине-фиолетовый цвет).

Для витамина Е характерны цветные реакции с азотной кислотой и хлоридом железа(III), в результате которых витамин Е окисляется с образованием соединений, окрашенных в оранжево-красный или красный цвет.

Оборудование и реактивы: электроплитка, штатив с пробирками, пипетки, серная кислота (конц.), азотная кислота (конц), 1%-ный раствор хлорного железа ($FeCl_3$) в 96%-ном этаноле, эфир, растворы витаминов А и Е в масле (рыбий жир).

Ход работы:

<u>Задание 1.</u> Провести цветную реакцию на витамин А с серной кислотой.

1. В сухую пробирку по стенке внести 3 капли раствора витамина А в масле (или 3 капли рыбьего жира).
2. Прибавить 1 каплю концентрированной серной кислоты.
3. Отметить изменение окраски.
4. Описать результаты наблюдений, сделать вывод.

<u>Задание 2.</u> Провести цветную реакцию на витамин Е с концентрированной азотной кислотой и хлоридом железа (III).

1. В две сухие пробирки внести по 3 капли масляного раствора витамина Е.

2. В одну пробирку прибавить 6 капель концентрированной азотной кислоты, нагреть в стакане с горячей водой.
3. В другую пробирку прибавить 3 капли эфира и 3 капли 1%-ного раствора хлорида железа (III).
4. Смеси тщательно перемешать, интенсивно встряхивая.
5. Отметить изменение окраски.
6. Описать результаты наблюдений, сделать вывод.

Вопросы и задания

1. Объясните термин «витамины», кто его предложил?
2. Опишите биологическую роль витаминов А, Д, Е.
3. Какие продукты являются источниками витаминов А, Д, Е?
4. Какой витамин является особо важным для детей в первый год жизни?
5. Запишите структурные формулы витаминов А, Д, Е.

Лабораторная работа 20

Качественные реакции на водорастворимые витамины

Методы обнаружения водорастворимых витаминов основаны на их способности под воздействием специфических соединений давать окрашенные вещества.

Витамин B_1 (тиамин) в щелочной среде с диазореактивом (смесь солянокислого раствора сульфаниловой кислоты с раствором нитрита натрия) образует сложное комплексное соединение оранжевого или красного цвета.

Реагентами, с которыми взаимодействует витамин С (аскорбиновая кислота), являются гексацианоферрат (III) и 2,6-дихлорфенолиндофенол. В первом случае в присутствии хлорного железа наблюдается синее окрашивание (образуется берлинская глазурь, $Fe_4[Fe(CN)_6]$). Второе соединение (2,6 дихлорфенолиндофенол), имеющее синий цвет, аскорбиновая кислота восстанавливает и обесцвечивает.

Оборудование и реактивы: фарфоровая ступка, штатив с пробирками, пипетки, солянокислый раствор сульфаниловой кислоты (0,9 г сульфаниловой кислоты растворяют в 9 мл концентрированной соляной кислоты, объём доводят дистиллированной водой до 100 мл), 5%-ный раствор нитрита натрия, 20%-ный раствор карбоната натрия, 0,02%-ный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола, молоко, капуста.

Ход работы:

Задание 1. Провести качественную реакцию на витамин B_1.

1. В пробирку внести 5 капель солянокислого раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5%-ного раствора нитрита натрия (диазореактив).
2. К полученному раствору диазореактива прибавить 1мл молока и 5 капель 20%-ного раствора карбоната натрия.
3. Отметить изменение окраски.
4. Описать результаты наблюдений, сделать вывод.

Задание 2. Провести качественную реакцию на витамин С.

1. Приготовить сок капусты: для этого 10 г измельчённого материала растереть в ступке и сок слить в стаканчик.
2. Внести в пробирку 1 мл сока капусты.
3. Прибавить 1 мл 0,02%-ного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.
4. Отметить изменение окраски.
5. Описать результаты наблюдений, сделать вывод.

6. Записать уравнение реакции.

Вопросы и задания

1. Когда и кем были открыты витамины?
2. Какой витамин был впервые получен в лаборатории и чем объясняется его название?
3. Опишите биологическую роль витаминов B_1 и B_2.
4. В состав каких коферментов входят витамины B_2, B_3, B_5 (PP)?
5. Запишите структурные формулы витаминов B_1 и B_2.

Лабораторная работа 21

Определение витамина С в молоке

Метод основан на титровании пробы молока в кислой среде раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. Это соединение имеет синий цвет. Аскорбиновая кислота его восстанавливает и обесцвечивает. В кислой среде 2,6-дихлорфенолиндофенол имеет розовый цвет. По количеству раствора реактива, пошедшего на титрование, определяют содержание витамина С.

Оборудование и реактивы: колбы конические на 100-250 мл, шприц-дозатор, пипетки, бюретка, 2%-ный раствор соляной кислоты, 0,001н раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (приготовление см. в Приложении), молоко.

Ход работы:

1. В две колбы внести по 5 мл молока.
2. Прибавить 10-20 мл дистиллированной воды и шприцом-дозатором по 1 мл 2%-ного раствора соляной кислоты для создания кислой среды.
3. Содержимое колб перемешать и титровать 0,001н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания.
4. Отметить объем раствора, пошедшего на титрование в первой и второй колбе (V_1 и V_2). Рассчитать среднюю величину титрования (V).
5. Содержание витамина С в молоке вычислить по формуле:

$$C=\frac{V\cdot 0{,}088\cdot 100}{5}$$, мг % (мг на 100г продукта),

где 0,088 – количество витамина С (мг), эквивалентное 1мл 0,001н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола;

100 – пересчет на 100 г исследуемого продукта;

5 – объем молока, взятого на титрование (мл);

V – средняя величина объема 0,001н раствора 2,6-дихлорфенлиндофенола, пошедшего на титрование, мл.

6. Внести в пустую колбу 5мл прокипяченного молока и определение повторить от п.2 до п.5.
7. Сравнить полученные результаты, сделать вывод.

Вопросы и задания

1. Опишите биологическую роль витамина С.
2. Какие продукты являются источником витамина С.
3. Какова суточная норма витамина С для человека и чем она восполняется?
4. В каких условиях повышается потребность в витамине С?

Лабораторная работа 22

Количественное определение витамина С в растительном материале

Реагентом, с которым взаимодействует аскорбиновая кислота, является 2,6–дихлорфенолиндофенол. Это соединение имеет в нейтральной среде синий цвет, а в кислой среде – розовый. Аскорбиновая кислота, извлеченная из растительного материала соляной кислотой, восстанавливает 2,6–дихлорфенолиндофенол с образованием бесцветного соединения. Содержание витамина С определяется титрованием. В эквивилентной точке избыточная капля 2,6–дихлорфенолиндофенола в присутствии соляной кислоты окрашивает раствор в розовый цвет.

Оборудование и реактивы: весы технические**,** фарфоровая ступка, шприц-дозатор, колбы конические, бумажный фильтр, воронка, мерный цилиндр, мерная колба на 100 мл, пипетки на 10 мл, бюретка, 2 %-ный раствор соляной кислоты, 0,001н раствор 2,6–дихлорфенолиндофенола (см. Приложение), растительный материал (капуста, картофель, лук).

Ход работы:

1. Нарезать растительный материал мелкими кусочками и взять навеску 2 г.
2. Навеску тщательно растереть в ступке с 2 мл дистиллированной воды до получения кашицы (для улучшения гомогенезации рекомендуется добавить 0,5–1 г стеклянного песка).
3. Влить в ступку 30 мл дистиллированной воды, полученный гомогенат перенести в мерную колбу на 100 мл (в мерный цилиндр или стакан). Ступку и пестик смыть водой 2 раза порциями по 20-25 мл, слить туда же, добавить дистиллированную воду до метки и тщательно перемешать.
4. Полученный экстракт профильтровать в колбу (или стаканчик).
5. Отмерить 10 мл фильтрата в две конические колбы и 1 мл 2%-ной соляной кислоты.
6. Титровать из бюретки раствором 2,6–дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 0,5 мин.
7. Отметить количество мл раствора 2,6–дихлорфенолиндофенола, пошедшее на титрование в первой и второй колбе, вычислить среднее значение (V).
8. Провести контрольное титрование смеси реактивов (10 мл дистиллированной воды и 1 мл 2%-ного раствора соляной кислоты) – $V_к$.
9. Вычислить объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование экстракта, за вычетом объема раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование контрольной пробы ($a = V - V_к$).
10. Содержание витамина С (X) рассчитать по формуле:

$$X = \frac{a \cdot K \cdot 0{,}088 \cdot V_1 \cdot 100}{V_2 \cdot m}, \text{ мг \% (мг на 100 г)},$$

где а – объем 0,001н раствора 2,6–дихлорфенолиндофенола, мл;

К– поправка к титру 0,001н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола (в исследовательских работах определяется по ГОСТ 24556-81, в учебной практике принимается равной 1);

0,088 – количество аскорбиновой кислоты (мг), эквивилентное 1 мл 0,001н раствора 2,6–дихлорфенолиндофенола;

V_1– общий объем экстракта, мл;

V_2– объем фильтрата, взятый для титрования;
m– навеска растительного материала, г;
100 – для пересчета на 100 г продукта.

Вопросы и задания

1. Опишите проявления гиповитаминоза при недостатке витамина С.
2. В каких фруктах и овощах содержится больше витамина С?
3. Какие факторы вызывают снижение содержания витамина С в растительных продуктах?
4. К какому классу соединений относится витамин С и какой продукт образуется при его окислении? Запишите уравнение реакции.

6. ГОРМОНЫ

Лабораторная работа 23

Качественные реакции на инсулин

Инсулин является гормоном белковой природы, в молекуле которого полипептидные цепи соединены дисульфидными мостиками. Поэтому инсулин дает биуретовую реакцию, характерную для всех белков, и реакцию на серусодержащие аминокислоты.

Оборудование и реактивы: штатив с пробирками, пипетки, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сернокислой меди, 20% -ный раствор сульфосалициловой кислоты, 30%-нвй раствор гидроксида натрия, 5%-ный раствор уксуснокислого свинца, раствор инсулина с водой 1:1.

Ход работы:

Задание 1. Провести обнаружение инсулина биуретовой реакцией.

1. Внести в пробирку 5 капель раствора инсулина.
2. Прибавить 5 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1%-ного раствора сульфата меди.
3. Перемешать, отметить изменение окраски.
4. Объяснить механизм реакции, сделать вывод.

Задание 2. Провести реакцию инсулина с сульфосалициловой кислотой.

1. Внести в пробирку 1 мл раствора инсулина.
2. Прибавить 5 капель 20%-ного раствора сульфосалициловой кислоты.
3. Отметить изменения в пробирке.
4. Объяснить механизм реакции, сделать вывод.

Задание 3. Реакция Фоля.

1. Внести в пробирку 5 капель раствора инсулина.
2. Добавить 5 капель 30 %-ного раствора гидроксида натрия и 1-2 капли 5 %-ного раствора уксуснокислого свинца.
3. Нагреть пробирку до выпадения черного осадка.
4. Объяснить механизм реакции, сделать вывод.

Вопросы и задания

1. В чем отличие действия гормонов от ферментов?
2. Где вырабатывается гормон инсулин?
3. Дайте характеристику биологического действия инсулина.
4. Какие гормоны относятся к пептидным гормонам?

5. Опишите механизм действия пептидных гормонов.

Лабораторная работа 24

Качественные реакции на адреналин

Адреналин относится к группе гормонов производных аминокислот. По химическому строению это 1-(3,4-диоксифенил)-2-метиламиноэтанол. В молекуле адреналина содержится структура двухатомного фенола – пирокатехина. При добавлении к раствору адреналина раствора хлорного железа развивается зеленое окрашивание, которое обусловлено наличием остатка пирокатехина. Вторая качественная реакция основана на способности адреналина в щелочной среде образовывать с диазореактивом комплексное соединение красного цвета.

Оборудование и реактивы: штатив с пробирками, шприц-дозатор, пипетки, 3%-ный раствор хлорида железа (III), 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфаниловой кислоты, 5%-ный раствор нитрита натрия, 10%-ный раствор карбоната натрия, раствор адреналина (1:1000).

Ход работы:

Задание 1. Провести реакцию с хлоридом железа (III).

1. Внести в пробирку 1 мл раствора адреналина.
2. Прибавить 1 каплю 3%-ного раствора хлорида железа ($FeCl_3$), перемешать.
3. Отметить изумрудно-зеленое окрашивание.
4. Добавить 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия.
5. Отметить вишнево-красное окрашивание.

Задание 2. Провести реакцию с диазореактивом.

1. Внести в пробирку 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты, прибавить 1 мл 5%-ного раствора нитрита натрия (получается диазореактив).
2. Добавить к диазореактиву 1 мл раствора адреналина (1:1000) и 1 мл 10%-ного раствора карбоната натрия.
3. Содержимое перемешать, отметить изменение окраски в красный цвет
4. Описать результаты наблюдений, сделать вывод.

Вопросы и задания

1. Где в организме вырабатывается гормон адреналин?
2. Дайте характеристику биологического действия адреналина.
3. Как классифицируются гормоны?
4. Какие гормоны относятся к стероидным?
5. Опишите механизм действия стероидных гормонов.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приготовление некоторых препаратов

1. **2,6-дихлорфенолиндофенол** (0,001н раствор). Взвешивают точно 0,22 г реактива, растворяют в 500 мл дистиллированной воды и оставляют на ночь, затем фильтруют в мерную колбу емкостью 1 л, доводят водой до метки и перемешивают (срок хранения раствора 1 месяц). При выполнении научно-исследовательских работ для стабилизации раствора при его приготовлении на 1 л добавляют 300 мл буферной смеси. Для этого берут водные растворы KH_2PO_4 –9,078 в 1 л и Na_2HPO_4 – 11,867 г в 1 л. Растворы хранят отдельно, перед употреблением их смешивают в соотношении 2:3 (pH 6,9-7,0); готовят 300 мл смеси для 1 л раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.
2. **Методика взятия навески в колбу Кьельдаля.** На чашку весов помещается тара, изготовленная из плотной металлической фольги в виде "лодочки" длиной 15 см. Фиксируется предварительная масса тары (m_0). На данную тару вносится сухой измельченный до величины частиц 1мм исследуемый материал (0,1-0,2 г животный материал или 0,3-0,5 г растительный). Фиксируется масса навески с тарой (m_1). "Лодочка" с навеской вводится в горизонтальном положении в горло колбы Къельдаля после чего колба и "лодочка" резко приводятся в вертикальное положение, в результате навеска материала высыпается на дно колбы (такой прием позволяет избежать попадания частиц навески на стенки горла колбы). Тара "лодочка" опять взвешивается(m_2) и ее масса вычитается из массы навески с тарой. Таким образом точная масса навески составит $m = m_1 – m_2$
3. **Растворы белков для проведения качественных реакций.**
   1). Неразбавленный белок куриного яйца. Отделяют белок трех куриных яиц от желтков (масса белка в одном яйце в среднем равна 33 г), получается около 100 мл неразбавленного раствора белков куриного яйца. Этот раствор содержит примерно 88% воды, 1% углеводов 0,5% минеральных веществ, остальные 10% составляет белок. 2). Разбавленный раствор яичного альбумина. Белок одного куриного яйца хорошо взбивают и смешивают с 10-кратным объемом дистиллированной воды. Раствор фильтруют через двойной слой смоченной водой марли. В осадке остается яичный глобулин, фильтрат содержит примерно 0,5% альбумина (концентрация альбумина в белке куриного яйца составляет около 6%). 3). Белки мяса. Помещают в стакан 50г измельченного обезжиренного мяса, добавляют 100 мл 10%-ного раствора хлорида натрия, перемешивают и оставляют стоять 15-20 мин при помешивании. Отфильтровывают жидкость через двойной слой марли. Раствор содержит в основном мышечный альбумин и глобулин. 4). Белки молока. К 50 мл свежего молока добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония в осадок выпадают глобулины и казеин. Отфильтровывают через бумажный фильтр раствор альбуминов. 5). Растительный альбумин. 25 г пшеничной муки смешивают со 100 мл дистиллированной воды. Смесь периодически встряхивают в течение 1 часа. Взвесь муки отделяют на фильтре через бумажный фильтр. Раствор содержит в основном альбумин пшеничного зерна.
4. **Раствор Люголя (**раствора йода в йодиде калия). Растворяют 1 г йода и 2,5 г йодида калия в 20 мл воды. После растворения объем раствора доводят в 100 мл воды.
5. **Смешанный индикатор.** Готовят основной раствор: смешивают 100 мл 0,1%-ного спиртового раствора метилового красного с 25 мл 0,1%-ного спиртового раствора метиленового синего (основной раствор можно готовить в меньшем объеме, но в той же пропорции). Раствор хранят в темной склянке. Рабочий раствор: 1 объем основного раствора смешивают с 1 объемом этилового спирта и 2 объемами воды.

6. **Раствор сульфата аммония (насыщенный)**. Растворяют 75,4 г $(NH_4)_2SO_4$ в 100 мл теплой воды (35-40^0). Оставляют на сутки, после чего раствор фильтруют и разливают в склянки
7. **Стеклянный песок.** Битое стекло измельчается в лабораторной мельнице в течение 0,5 мин.
8. **Хромовая смесь для мытья посуды.** В форфоровый стакан наливается концентрированная серная кислота и добавляется 5% (по объму) размельченного в порошок кристаллического двухромовокислого калия ($K_2Cr_2O_7$). Смесь хорошо перемешивают и оставляют на сутки. Хранят в посуде из толстого стекла. Используется для мытья сильно загрязненной химической посуды. Перед мытьем посуду сперва ополаскивают водой, затем наливают хромовую смесь до 1/3–1/4 объема сосуда и осторожно медленно смачивают внутренние стенки. После этого хромовую смесь выливают в тот же сосуд, в котором она хранится, при этом смачивают оставшиеся не смоченными смесью стенки посуды. Через несколько минут посуду моют сначала водопроводной потом дистиллированной водой. После длительного употребления цвет хромовой смеси из темно-оранжевого переходит в темно-зеленый, что служит признаком ее непригодности.
9. **Шприц-дозатор.** На шприц медицинский без иглы надевается поливиниловая трубка от использованных систем капельниц. Трубка обрезается необходимой длины в зависимости от назначения. Объем шприца берется по необходимости в среднем 5-10 мл. Назначение шприца – отбор и дозирование воды и растворов реактивов в реакциях не требующих высокой точности.