

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

Г. Е. Степанцова

ХИМИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ для
студентов, обучающихся в бакалавриате, по направлению подготовки
19.03.01 Биотехнология

Калининград
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»
2023

УДК 616-003.725

Рецензент

кандидат биологических наук, доцент кафедры химии ФГБОУ ВО «КГТУ»
Н. П. Нефедова

Степанцова, Г. Е.

Химия биологически активных веществ: учеб.-методическое пособие по выполнению лабораторных работ для студ. обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология / Г. Е. Степанцова – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2023 г.– 76 с.

В учебно-методическом пособии по изучению дисциплины «Химия биологически активных веществ» представлены учебно-методические материалы по выполнению лабораторных работ, перечень лабораторных опытов по каждой изучаемой теме, вопросы для самоконтроля, список учебной литературы для направления подготовки 19.03.01 Биотехнология.

Табл. 5, список лит. – 13 наименований.

Учебное пособие рассмотрено и рекомендовано к изданию кафедрой химии 23 сентября 2022 г., протокол № 2

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ рекомендовано к изданию в качестве локального электронного методического материала методической комиссией института агроинженерии и пищевых систем ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 30 марта 2023 г., протокол № 3

УДК 616-003.725

© Федеральное государственное
бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Калининградский государственный
технический университет», 2023 г.
© Степанцова Г. Е., 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
1. ОБЩИЕ ОРГАНИЗАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ...	5
2. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ.....	8
3. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПОДГОТОВКЕ К ВЫПОЛНЕНИЮ И ЗАЩИТЕ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ.....	13
Лабораторная работа № 1.....	13
Тема « α -Аминокислоты, пептиды, белки».....	13
Тема «Витамины».....	18
Лабораторная работа № 2.....	25
Тема «Ферменты».....	25
Лабораторная работа № 3.....	33
Тема «Нуклеопротеиды, нуклеиновые кислоты».....	33
Лабораторная работа № 4.....	42
Тема «Фосфолипиды».....	42
Тема «Изопреноиды».....	45
Тема «Стерины и стероиды».....	48
Лабораторная работа № 5.....	50
Тема «Флавоноиды».....	50
Лабораторная работа № 6.....	55
Тема «Алкалоиды».....	55
Тема «Антибиотики».....	57
Лабораторная работа № 7.....	69
Тема «Методы исследований БАВ».....	69
Библиографический список.....	74

ВВЕДЕНИЕ

Учебно-методическое пособие к лабораторным работам по дисциплине «Химия биологически активных веществ» предназначено для студентов очной формы обучения в бакалавриате по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология (профиль «Пищевая биотехнология»).

Целью освоения дисциплины «Химия биологически активных веществ» является формирование у обучающихся современных знаний, умений и навыков по химии биологически активных веществ для использования при решении профессиональных задач; готовность использовать полученные знания, умения и навыки, при изучении последующих дисциплин естественнонаучного и профессионального циклов подготовки.

В результате освоения дисциплины «Химия биологически активных веществ» у обучающегося формируются следующие профессиональные компетенции, а именно:

способность и готовность использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности, применять методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования:

владение основными методами и приемами проведения экспериментальных исследований в своей профессиональной области; способность проводить стандартные и сертификационные испытания сырья, готовой продукции и технологических процессов.

Непременным условием успешного усвоения дисциплины «Химия биологически активных веществ» является выполнение лабораторного практикума.

В результате освоения лабораторного практикума студент должен

знать: структуру и пространственную организацию белков, нуклеиновых кислот, углеводов, липидов, низкомолекулярных биорегуляторов и антибиотиков;

уметь: использовать знания свойств органических веществ в лабораторной и производственной практике, осуществить очистку и идентификацию органического соединения; определить важнейшие физические характеристики органического соединения;

владеть: приемами определения структуры биологически активных соединений на основе их физико-химических характеристик; правилами безопасной работы в химической лаборатории.

1. ОБЩИЕ ОРГАНИЗИОННО-МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

Таблица 1 – Тематический план лабораторных работ (ЛР)

Номер занятия	Тема дисциплины	Наименование лабораторных работ	Кол-во часов
1	α-Аминокислоты, пептиды, белки	Техника безопасности в химической лаборатории. Изучение физико-химических свойств глобулярных белков, влияние на них различных химических факторов	6
	Витамины	Витамины. в составе различных биосистем. Проведение качественных реакций, количественное определение витаминов в пищевых продуктах	
2	Ферменты	Ферментные препараты различного происхождения. Открытие наличия их в биологическом материале	6
3	Нуклеопро-теиды, нуклеиновые кислоты	Получение гидролизата нуклеопротеидов из молок гидробионтов. и установление его состава с помощью качественных реакций	6
		Аминокислоты, белки, витамины, ферменты, нуклеотиды, нуклеиновые кислоты: состав, строение, физико-химические свойства, биологические функции – теоретическое занятие	
4	Фосфолипиды	Выделение фосфолипидов из икорных продуктов и установление их состава с помощью качественных реакций	6
	Изопреноиды (каротиноиды, стерины и стероиды)	Каротиноиды растительного и животного происхождения. Стерины и стероиды животного происхождения	
5	Фосфолипиды, полиненасыщенные жирные кислоты, каротиноиды, стероиды	Состав, строение, физико-химические свойства, биологические функции – теоретическое занятие.	7
	Флавоноиды	Выделение флавоноидов из citrusовых, изучения строения с помощью качественных реакций. Количественное определение флавоноидов в напитках	
6	Алкалоиды	Выделение никотина из табака открытие его состава с помощью качественных реакций	7
	Антибиотики	Антибиотики. Изучение строения, физико-химические свойства	

Номер занятия	Тема дисциплины	Наименование лабораторных работ	Кол-во часов
7	Стерины, стериды, каротиноиды, флавоноиды, алкалоиды	Состав, строение, физико-химические свойства, биологические функции – теоретическое занятие	6
	Методы исследований БАВ	Выделение терпенов из янтаря и идентификация их	
Итого			44

Общие требования к подготовке к выполнению лабораторных работ

Лабораторные работы проводятся параллельно с изучением теоретического материала.

Обучающийся допускается к выполнению лабораторных работ при наличии у него лабораторного журнала (тетради) с оформленным проектом отчёта по лабораторной работе. Перед его оформлением студенту следует самостоятельно изучить теоретический материал по теме лабораторной работы, используя конспект лекций и рекомендуемую учебную литературу, описание лабораторной работы.

Для повышения качества подготовки к лабораторным занятиям студенту следует ответить на вопросы для самостоятельной работы, приведенные в конце описания каждой лабораторной работы.

Проект отчёта по лабораторной работе должен включать:

- название темы лабораторной работы;
- название лабораторной работы;
- необходимые теоретические сведения по теме данной лабораторной работы;
- цель лабораторной работы и для каждого опыта;
- описание хода работы, уравнения соответствующих реакций;
- свободное место в тетради для наблюдений и выводов.

Наблюдения и выводы по каждому опыту формулируются и записываются только после выполнения каждого опыта в лаборатории органической химии. В лабораторном журнале следует предусмотреть поля.

Записи в лабораторном журнале выполняются ручкой, аккуратно и разборчиво. В случае ошибки слова и цифры зачеркивают и пишут правильные рядом один раз. На титульном листе лабораторного журнала следует привести его название с указанием названия дисциплины, фамилии и инициалов, а также учебной группы студента.

Перед выполнением лабораторной работы преподаватель проверяет у каждого студента наличие оформленного проекта отчета по лабораторной работе, знание им теоретического материала по теме лабораторной работы, хода проведения работы и соответствующих ей уравнений реакций. Преподаватель также обращает внимание студентов на необходимость соблюдения техники безопасности при выполнении лабораторных работ. Правила техники безопасности при работе в химической лаборатории и оказание первой помощи приведены в разделе 2.

Лабораторные работы выполняются студентами индивидуально, что позволяет им тщательно наблюдать ход проведения опытов и на его основе самостоятельно делать выводы, увязывая теоретические знания электронного строения, физических и химических свойств исследуемых органических соединений с практическими наблюдениями. Лабораторные работы включают значительное число опытов в виде качественных реакций на соответствующие функциональные группы. Это будет способствовать более глубокому усвоению студентами закономерностей органической химии, строения и свойств соединений разных классов.

Обучающийся допускается к выполнению лабораторных работ при наличии у него лабораторного журнала (тетради) с оформленным проектом отчёта по лабораторной работе. Перед его оформлением студенту следует самостоятельно изучить теоретический материал по теме лабораторной работы, используя конспект лекций и рекомендуемую учебную литературу, описание лабораторной работы.

Лабораторные работы включают опыты, проводимые капельным методом, не требующим специального обучения. Работа с малыми количествами веществ позволяет правильнее установить оптимальные количественные соотношения между реагентами для проведения соответствующих органических реакций, при этом расход реактивов значительно сокращается и повышается безопасность работы студентов. В ходе выполнения лабораторных работ студенты записывают в лабораторный журнал наблюдения и формулируют выводы по каждому опыту. Преподаватель контролирует правильность выполнения опытов каждым студентом и оформления им отчёта по лабораторной работе.

Лабораторная работа считается принятой (оценка – «зачтено»), если студент её выполнил и правильно оформил отчет (формулирование цели работы, написание уравнения реакций, описание наблюдений, формулирование выводов), ответил на теоретические вопросы по ней.

2. ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ

Общие правила. Работа в химической лаборатории связана с некоторой опасностью, поскольку многие вещества в той или иной степени ядовиты, огнеопасны и взрывоопасны. Опыт показывает, что большинство несчастных случаев, происходящих в лаборатории, является следствием небрежности и невнимательности работающих.

Возможность несчастных случаев может быть исключена при выполнении всех мер предосторожности.

Обычно характер предупредительных мер, обеспечивающих безопасность выполнения эксперимента, зависит от вида работы.

Однако существуют общие правила, выполнение которых обязательно для каждого работающего в лаборатории независимо от того, какой эксперимент он выполняет.

1. Работать одному в лаборатории категорически запрещается, так как в случае несчастного случая будет некому оказать помощь пострадавшему и ликвидировать последствия аварии.

2. Во время работы в лаборатории необходимо соблюдать чистоту, тишину, порядок и правила техники безопасности, так как поспешность, неряшливость часто приводят к несчастным случаям с тяжелыми последствиями.

3. Каждый работающий должен знать, где находятся в лаборатории средства противопожарной защиты и аптечка, содержащая все необходимое для оказания первой помощи.

4. Категорически запрещается в лаборатории курить, принимать пищу, пить воду.

5. Нельзя приступать к работе, пока студенты не усвоили технику ее выполнения.

6. Опыты нужно проводить только в чистой посуде. После окончания эксперимента посуду следует мыть сразу же.

7. В процессе работы необходимо соблюдать чистоту, аккуратность. Следить, чтобы вещества не попадали на кожу лица и рук, так как многие вещества (галогенопроизводные, фенолы, нитросоединения, непредельные соединения и др.) вызывают раздражение кожи и слизистых оболочек.

8. Никаких веществ в лаборатории не пробовать на вкус. Нюхать вещества можно, лишь осторожно направляя на себя пары или газы легким движением руки, а не наклоняясь к сосуду и не вдыхая полной грудью.

9. На всех банках, склянках и другой посуде, где хранятся реактивы, должны быть этикетки (или надпись маркером по стеклу) с указанием названия веществ.

10. Слянки с веществами или растворами необходимо брать одной рукой за горлышко, а другой снизу поддерживать за дно.

11. Категорически запрещается затыгивать ртом в пипетки органические вещества и их растворы.

12. Во время нагревания жидких и твердых веществ в пробирках и колбах нельзя направлять их отверстия на себя и соседей. Нельзя также заглядывать сверху в открыто нагреваемые сосуды во избежание возможного поражения при выбросе горячей массы.

13. После окончания работы необходимо выключить газ, воду, электроэнергию.

14. Категорически запрещается выливать в раковины концентрированные растворы кислот и щелочей, а также различные органические растворители, сильно пахнущие и огнеопасные вещества. Все эти отходы нужно сливать в специальные бутылки.

15. В каждом помещении необходимо иметь средства противопожарной защиты: ящик с просеянным песком и совком к нему, противопожарное одеяло (асбестовое или толстое войлочное), заряженные огнетушители (желательно со сжиженным углекислым газом).

16. На доступном месте в лаборатории должны находиться медикаменты для оказания первой помощи: растворы танина (в спирте), перманганата калия, борной кислоты, гидрокарбоната натрия, йодная настойка, вата, бинты, пластырь, мази от ожогов.

Работа с горючими жидкостями

1. Следует соблюдать крайнюю осторожность при работе с огнеопасными растворителями (этиловый спирт, бензол, петролейный эфир, бензин, спирт, ацетон и др.); работу с ними необходимо вести только вдали от огня (зажженная горелка, включенная плитка с открытой спиралью и т.п.); нельзя держать большие количества огнеопасных жидкостей на рабочем столе.

2. Выливать горючие жидкости следует не в раковину (ОПАСНО!), а в слянки, предназначенные для слива этих жидкостей.

3. Нельзя нагревать горючие жидкости в открытой посуде. Нагревание их, например, при получении растворов (перекристаллизация) или проведение реакции можно вести только в колбе, соединенной с обратным холодильником.

4. Нагревание легкогорючих жидкостей запрещается проводить на открытом пламени горелки или на сетке. При нагревании низкокипящих растворителей (бензол, эфир, ацетон, спирт и др.) следует пользоваться водяными электрическими банями. Нагревание эфира и эфирных растворов можно провести также с помощью горячей воды, подогреваемой вдали от

места работы на другом столе. Нагревание высококипящих горючих жидкостей (толуол, ксилол, лигроин и др.) ведут на электрических песчаных банях или электроплитках с закрытой спиралью.

5. При перегонке низкокипящих огнеопасных жидкостей необходимо применять холодильник с водяным охлаждением и тщательно подбирать пробки при сборке прибора.

6. При возникновении пожара необходимо соблюдать спокойствие, выключить все нагревательные приборы и удалить находящиеся вблизи горючие вещества. Если воспламенилось немного жидкости в сосуде, надо плотно накрыть его асбестом или тряпкой. В случае выливания горячей жидкости на стол, следует засыпать пламя песком. Если оно не гаснет, необходимо тушить с помощью огнетушителя. При воспламенении одежды нужно быстро накрыть пострадавшего имеющимся в лаборатории одеялом.

Работа с ядовитыми и едкими веществами

1. Работа с ядовитыми, раздражающими органы дыхания и едкими, сильно пахнущими веществами должна проводиться в вытяжном шкафу. Перед началом работы надо включить мотор тяги и выдвинуть, если она есть, задвижку в вытяжной трубе. Затем следует опустить шторки у неиспользуемой секции шкафа. В той секции шкафа, где ведется работа, шторка должна быть поднята лишь на 1/3.

2. Нельзя разливать ртуть, которая является сильнодействующим ядом. Пары ртути отравляют работающих в помещении, где разлито хотя бы небольшое ее количество. Пролитую ртуть надо немедленно собрать!

3. При работе с бромом нельзя вдыхать его пары; особенно необходимо беречь глаза. Бром вызывает сильные ожоги. При попадании его на кожу следует немедленно обмыть пораженное место спиртом или бензолом и смазать глицерином или мазью от ожогов.

4. После работы с едкими или ядовитыми веществами надо тщательно убрать рабочее место и вымыть руки.

Работа с кислотами и щелочами

1. Концентрированные соляную и азотную кислоты можно переливать только в вытяжном шкафу.

2. При разбавлении серной кислоты необходимо осторожно, небольшими порциями, при перемешивании и охлаждении прибавлять серную кислоту к воде, а не наоборот.

3. При раздроблении и растирании твердых щелочей, а также хлористого цинка, сернистого натрия и др. едких веществ следует надевать предохранительные очки; просыпанные едкие вещества нужно немедленно собрать.

4. При ожоге кислотами необходимо быстро промыть обожженное место сильной струей воды, а затем раствором бикарбоната натрия. Концентрированную серную кислоту, попавшую на кожу, лучше немедленно (промокнуть, но не растирать) удалить сухой тряпкой и лишь затем водой.

5. При ожоге едкими щелочами надо хорошо промыть обожженное место сильной струей воды, а затем – сильно разбавленной уксусной кислотой.

6. При попадании кислых веществ в глаз, следует тотчас промыть его большим количеством воды и затем – раствором бикарбоната натрия (затем обязательно обратиться к врачу!).

7. При попадании в глаз щелочных средств, следует тотчас промыть его обильно водой и затем – раствором борной кислоты (затем обязательно обратиться к врачу!).

8. Сильно кислые или щелочные жидкости нельзя выливать в раковину; для сбора этих жидкостей в лаборатории должны стоять специальные банки.

Работа с металлическим натрием (калием)

1. Металлический натрий хранят в банке под слоем керосина, взвешивание навески его производится в бюксе с керосином.

2. Следует остерегаться попадания воды на натрий; приступая к работе с ним, надо тщательно насухо вытереть стол.

3. Разрезать куски натрия и срезать с него корки следует на куске бумаги. Обрезки натрия (корки) необходимо собирать в банку с керосином, ни в коем случае нельзя выбрасывать в бак для мусора. Бумагу, на которой резали натрий, обезвреживают следующим образом: сняв с нее все, даже мелкие кусочки натрия, и скомкав, обливают ее в раковине сильной струей воды.

4. Колбу, в которой проводилась реакция с металлическим натрием, нельзя сразу мыть водой; следует уничтожить остатки натрия, растворяя их в спирте. Если заметного количества натрия в колбе не обнаружено, надо все же обмыть стенки колбы небольшим количеством спирта.

Меры первой помощи при несчастных случаях

1. При термических ожогах, чтобы предупредить образование пузырей, нужно сразу же смочить обожжённое место 5%-ным раствором танина в 40%-ном этиловом спирте. Лучше положить небольшой тампон из ваты или марли, смоченный этим раствором.

2. При ожогах крепкими кислотами немедленно убирают их остатки сухим материалом (тряпочками или фильтровальной бумагой) осторожно промокая, затем промывают обожжённый участок сильной струей воды, накладывают тампон из ваты или марли, смоченный 1%-ным раствором соды (гидрокарбонат натрия).

3. При ожогах крепкими щелочами немедленно промывают обожжённый участок сильной струёй воды и накладывают тампон из ваты или марли, смоченный 1%-ным раствором уксусной кислоты.

4. Если кислота или щёлочь попали в глаз, то его тщательно промывают водой, а затем либо 1%-ным раствором гидрокарбоната натрия (для нейтрализации кислоты), либо 2%-ным раствором борной кислоты (для нейтрализации щёлочи). Легче промывать глаз, пользуясь специальной глазной ванночкой.

5. При ожоге бромом поражённое место обрабатывают 10–20%-ным раствором тиосульфата натрия, пока не исчезнет бурая окраска от брома, затем промывают большим количеством воды, и накладывают тампон из ваты или марли, смоченный 5%-ным раствором мочевины. Можно поражённое место промыть спиртом.

6. При ожоге жидким фенолом побелевший участок кожи растирают глицерином до тех пор, пока не восстановится нормальный цвет кожи. Промывают поражённый участок водой и накладывают тампон из ваты или марли, смоченный глицерином.

7. При порезах удаляют пинцетом из ранки осколки стекла, смазывают края раны спиртовым раствором йода, положив на рану стерильную повязку, забинтовывают. При сильном кровотечении немедленно перетягивают руку пластичным жгутом из резиновой трубки, лак только остановит кровотечение, жгут надо немедленно снять.

8. О любом самом незначительном несчастном случае немедленно сообщить преподавателю и лаборанту, не ограничиваться самостоятельным принятием мер.

Меры по обеспечению электробезопасности в химической лаборатории

Особенностью действия электрического тока на человека является его невидимость.

Во время работы в химической лаборатории следует строго выполнять следующие правила электробезопасности:

- включение электрооборудования производить вставкой исправной вилки в исправную розетку;
- если во время работы обнаруживается неисправность электрооборудования или работающий почувствует действие тока, работа должна быть немедленно прекращена и неисправное оборудование должно быть сдано для проверки или ремонта;
- отключать электрооборудование при перерыве в работе и по окончании рабочего процесса.

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПОДГОТОВКЕ К ВЫПОЛНЕНИЮ И ЗАЩИТЕ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Описание каждой лабораторной работы включает теоретический материал, касающийся строения и реакционной способности соответствующих классов биологически активных соединений, подробное описание лабораторной работы (перечень необходимых реактивов и ход выполнения опытов), вопросы для подготовки к защите лабораторной работы и учебную литературу.

Лабораторная работа № 1

Тема « α -Аминокислоты, пептиды, белки»

Изучение физико-химических свойств глобулярных белков, влияние на них различных химических и физических факторов

Цель работы – изучить особенности структурных различий белков, растворимости белков куриного яйца в воде, в присутствии нейтральных солей в малой и большой концентрациях; научиться проводить реакции осаждения белков при нагревании до 100⁰ С, изучить влияние рН, нейтральных солей в больших концентрациях на это процесс; научиться высаливать белки куриного яйца.

Теоретический материал, необходимый для выполнения лабораторной работы

Многообразные пептиды и белки состоят из остатков α -аминокислот. Известны 20 наиболее важных α -аминокислот, постоянно встречающихся во всех белках. Пептиды представляют собой соединения, построенные из остатков α -аминокислот. В группе пептидов принято различать олигопептиды (низкомолекулярные пептиды), содержащие в цепи не более 10 аминокислотных остатков, и полипептиды, в состав цепи входят до 100 аминокислотных остатков. Для макромолекул с числом аминокислотных остатков приближающимся или немного превышающим 100, понятие полипептидов и практически не разграничиваются часто являются синонимами. По строению белки делятся на две основные группы – фибриллярные (нитевидные) и глобулярные (овальной или округлой формы). Белковые молекулы в биологических объектах всегда находятся в состоянии сборки или разборки, что объясняет присутствие в клетках как свободных аминокислот, так и большого числа пептидных молекул различного размера в разных концентрациях.

Процесс растворения белка связан с гидратацией частиц – связыванием воды ионогенными и полярными группами. При этом ионогенные группы в диссоциированном состоянии притягивают диполи воды за счёт ион-

дипольных взаимодействий, а неионогенные полярные группы и пептидные связи белков образуют с водой водородные связи. Вокруг белка образуется гидратная оболочка.

Растворимость белков в воде определяется природой и количеством функциональных групп, которые оказываются на поверхности молекулы белка при её пространственной укладке в нативную конформацию.

подавляющее большинство белков является гидрофильными веществами, хорошо растворимыми в воде.

Факторами устойчивости белка в растворе являются наличие заряда и гидратной оболочки. Их нарушение по каким-либо причинам будет понижать устойчивость белка в растворе в воде и способствовать выпадению белка в осадок (коагуляции).

Коагуляция – сближение и склеивание частиц белка, вследствие чего увеличивается их размер, и они выпадают в осадок. Различают обратимую коагуляцию, когда при устранении факторов, её вызвавших белок может снова вернуться в прежнее состояние и необратимую коагуляцию, при которой происходят глубокие нарушения структуры молекулы белка и белок не может вернуться в прежнее состояние.

Растворимость белков в воде возрастает при добавлении нейтральных солей в небольших концентрациях. Это явление называют солевым растворением. Оно объясняется тем, что нейтральные соли в малых концентрациях, увеличивая диэлектрическую постоянную среды, увеличивают степень диссоциации белка, при этом на поверхности белка в результате адсорбции и диффузии образуется слой ионов, который обеспечивает стабилизацию раствора белка.

Высокие концентрации нейтральных солей обратимо осаждают (высаливают) белки из водных растворов. Физико-химическая природа высаливания до конца не выяснена. Предполагают, что белок адсорбирует ионы соли с противоположным зарядом, снимая с белка заряд; нейтральные соли в высоких концентрациях оттягивают на себя диполи воды от заряженных групп белка и тем самым лишают белок гидратной оболочки.

Осадок белка после высаливания можно снова растворить в воде, при этом наблюдается восстановление его свойств, например ферментативной активности, антигенных свойств и т.д.).

Для изучения растворимости и реакций осаждения белка в работе применяются белки куриного яйца, которые имея разный заряд на поверхности, имеют разную растворимость в воде, и им требуются разные концентрации соли для высаливания.

С повышением температуры до 40 °С растворимость большинства белков возрастает, а при температурах выше 40–50 °С большинство белков

утрачивает стабильность, начинается их денатурация, сопровождающаяся резким снижением растворимости в области нейтральных значений рН.

Денатурация – частичное или полное разрушение пространственной структуры белковой молекулы за счёт разрыва слабых связей при сохранении первичной структуры, сопровождающееся потерей биологической активности (разрушается активный центр) и изменением ряда физико-химических свойств.

Механизм денатурации состоит в развёртывании полипептидной цепи. денатурированные белки приобретают вид случайных хаотических петель и клубков.

Дополнительные воздействия при изучении осаждения белков при нагревании (изменение рН раствора, высаливающие реагенты) будут препятствовать или способствовать им.

Белки, являясь природными полимерами, из-за больших размеров молекул не могут проходить через полупроницаемую мембрану. На этом основан метод их очистки от низкомолекулярных примесей.

Соли тяжелых металлов вызывают денатурацию белков, образуют нерастворимые комплексные соли с белками.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

До проведения лабораторной работы:

- а) сформулируйте цель каждого опыта;
- б) оформите проект отчета по лабораторной работе;
- в) напишите уравнения соответствующих реакций;
- г) предусмотрите место в проекте отчета для наблюдений и выводов.

В ходе выполнения лабораторной работы:

- а) проведите опыты:

Опыт 1. Растворимость белков

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки.

Материалы и реактивы: яичный белок, хлористый натрий, 5%-ный раствор.

Ход работы

В пробирки поместите по 2 капли яичного белка. В первую пробирку добавьте 1–2 мл воды, содержимое перемешайте и оставьте на 5 мин. Яичный альбумин растворяется, яичный глобулин выпадает в виде небольшого осадка. Во вторую пробирку добавьте 1–2 мл раствора хлористого натрия. Содержимое перемешайте. Полученный раствор содержит альбумин и глобулин. Солевой раствор используйте для диализа.

Опыт 2. Осаждение белков при нагревании

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки.

Материалы и реактивы: белок яичный, 10%-ный раствор без соли (приготовление раствора белка: белок куриного яйца отделить от желтка, смешайте с 10-кратным объемом воды и отфильтруйте через несколько слоев марли). Уксусная кислота, 10%-ный раствор; уксусная кислота, 1%-ный раствор; едкий натр, 10%-ный раствор; хлористый натрий, насыщенный раствор.

Ход работы

В шесть пронумерованных пробирок налейте 5 капель раствора белка. В пробирки № 2 и 3 добавьте по 1 капле 1%-ного раствора уксусной кислоты. В пробирки № 4 и 5 добавьте по 5 капель 10%-ного раствора уксусной кислоты. В пробирку № 6 добавьте 1 каплю раствора едкого натра. В пробирки № 3 и 5 добавьте по 2 капли насыщенного раствора хлористого натрия. Все пробирки нагрейте до кипения. Отметьте, в каких пробирках появился осадок. Интенсивность образования осадка обозначьте несколькими плюсами. Результаты опыта представить в виде таблицы 2.

Таблица 2 – Результаты опыта

Номер пробирки	Содержимое пробирки	Наблюдения	Выводы
1			
2			
3			
4			
5			
6			

Опыт 3. Высаливание белков

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки, воронки диаметра 3–5 см, фильтровальная бумага.

Материалы и реактивы: яичный белок, солевой раствор (приготовление солевого раствора белка: белки трех куриных яиц отделить от желтков, смешайте с 700 мл дистиллированной воды и 300 мл насыщенного раствора хлористого натрия и отфильтруйте через несколько слоев марли). Серноокислый аммоний, насыщенный раствор. Серноокислый аммоний, кристаллический порошок.

Ход работы

К 15 каплям раствора белка добавьте равный объем насыщенного раствора серноокислого аммония и перемешайте. Получается полунасыщенный раствор серноокислого аммония, в котором выпадает осадок глобулинов. Через 5 мин осадок отфильтруйте. В фильтрате остаются

альбумины. К фильтрату добавьте порошок сернокислого аммония до полного насыщения. Выпадает осадок альбуминов.

Опыт 4. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Оборудование: штатив с пробирками

Материалы и реактивы: белок яичный, 10%-ный раствор без соли; уксуснокислый свинец, 5%-ный раствор; сернокислая медь, 1%-ный раствор.

Ход работы

В две пробирки налейте по 1 капле раствора белка. В первую пробирку прибавьте 1 каплю раствора уксуснокислого свинца, во вторую – 1 каплю сернокислой меди (до появления осадков).

Добавьте в обе пробирки избыток, примерно 10 капель, соответствующих солей до растворения осадков (адсорбционная пептизация). Объясните результаты опыта.

- б) Запишите ваши наблюдения для каждого опыта;
- в) Сформулируйте выводы для каждого опыта;
- г) Отчитайтесь перед преподавателем о проделанной работе: предъявите оформленный отчет по лабораторной работе и штатив с пробирками по каждому опыту.

Вопросы для самостоятельной лабораторной работы

1. Охарактеризуйте процесс растворения белков в воде.
2. Какие факторы влияют на растворимость белков?
3. Какие связи и взаимодействия лежат в основе образования гидратной оболочки?
4. Приведите факторы устойчивости белка в растворе.
5. Охарактеризуйте коагуляцию белков.
6. Какой процесс называется диализом? На чем он основан? В каких целях он применяется?
7. Какой процесс называют высаливанием белков? Каков его механизм?
8. Охарактеризуйте влияние нейтральных солей в малых концентрациях на растворимость белков в воде.
9. Почему белки могут высаливаться при разных концентрациях солей?
10. Какой процесс называют денатурацией белка? Какие факторы могут его вызывать?

Учебная литература: [1, 4, 5, 12]

Тема «Витамины»

Витамины в составе пищевого сырья и продуктов питания. Проведение качественных реакций, количественное определение витаминов

Цель работы – Научиться открывать строение отдельных витаминов с помощью качественных реакций, применять полученные навыки для обнаружения водо- и жирорастворимых витаминов, научиться количественному определению витамина С в биологических объектах.

Теоретический материал, необходимый для выполнения лабораторной работы

Витамины – низкомолекулярные органические вещества, имеющие разнообразную химическую природу. Классификация витаминов основана на их растворимости. В зависимости от растворимости различают жирорастворимые (А, Д, К, Е) и водорастворимые витамины (В₁, В₂, В₃, В₅, В₆, В₁₂, В_с, Н, С, Р), кроме того, выделена отдельная группа так называемых витаминоподобных веществ (В₄, N, В₈, В₁₀, В₁₁, В₁₃, В₁₅, U, F, коэнзим Q).

Биологическая функция большинства растворимых в воде витаминов обусловлена их структурно-функциональной связью с белками, особенно с ферментами. Их действие основано на том, что, поступая в организм, они превращаются в свои активные формы, которые, как правило, являются коферментами или простетическими группами, входящими в состав важнейших ферментов и ферментных систем.

Витамины относятся к незаменимым факторам питания, поскольку в организме человека и животных не синтезируются. Большинство витаминов содержится в достаточных количествах в обычных продуктах питания животного и растительного происхождения - овощах, фруктах, подсолнечном масле, мясе, печени, почках, молоке, сливочном масле, яйцах, хлебе, крупе и др. Некоторые витамины синтезируются микрофлорой кишечника.

Полное отсутствие витаминов в пище приводит к развитию ряда тяжелых заболеваний (цинга, рахит, пеллагра и др.). Такое состояние называют авитаминозом. Недостаточное содержание витаминов в пище приводит к гиповитаминозам. Суточная потребность организма в витаминах резко возрастает при тиреотоксикозе, беременности, лактации, при интенсивной мышечной деятельности, при нарушении процесса всасывания витаминов в желудочно-кишечном тракте.

Витамины отличаются от других органических пищевых веществ следующими признаками: они не входят в состав структуры органов и тканей и не используются организмом в качестве источника энергии.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

До проведения лабораторной работы:

а) сформулируйте цель каждого опыта;

- б) оформите проект отчета по лабораторной работе;
- в) напишите уравнения соответствующих реакций;
- г) предусмотрите место в проекте отчета для наблюдений и выводов.

В ходе выполнения лабораторной работы:

- а) проведите опыты.

Опыт № 1. Взаимодействие витамина В₁ с диазореактивом

Оборудование: штатив с пробирками; колба мерная на 200 мл; пипетки для прямого слива с одной меткой на 1 мл (2 шт.).

Материалы и реактивы: тиаминхлорид, порошок; основной раствор сульфаниловой кислоты (0,9 г сульфаниловой кислоты поместить в мерную колбу на 200 мл и добавить 9 мл концентрированной соляной кислоты, затем дистиллированной водой довести до метки); нитрит натрия, 5%-ный раствор; карбонат натрия, 10%-ный раствор.

Качественная реакция основана на том, что при взаимодействии сульфаниловой кислоты, нитрита натрия и тиаминхлорида образуется азокраситель оранжево-красного цвета.

Ход работы

К 5 каплям основного раствора сульфаниловой кислоты прибавить 5 капель 5%-ного раствора нитрита натрия. К полученному раствору диазореактива добавить небольшое количество (на кончике скальпеля) тиаминхлорида и 5–7 капель 10%-ного раствора карбоната натрия. Жидкость в пробирке окрашивается в оранжево-красный цвет.

Опыт № 2. Реакция окисления тиамин в тиохром

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Реактивы: тиаминхлорид, порошок; гексациано-(III) феррат калия, 5%-ный раствор.

В щелочной среде под влиянием сильных окислителей тиамин окисляется, образуя тиохром, обладающий в ультрафиолетовых лучах сине-голубой флуоресценцией. Метод используется и для количественного определения тиамин.

Ход работы

2–3 мг тиаминхлорида поместить в пробирку, добавить 5–10 капель 5%-ного раствора гексациано-(III) феррата калия, содержимое тщательно перемешать и нагреть на водяной бане.

Жидкость в пробирке окрашивается в желто-зеленоватый цвет.

Опыт 3. Реакция Преблуба-Мак-Колдума. Ход анализа

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки

Материалы и реактивы: тиаминхлорид, порошок; этиловый спирт; 4н. раствора соляной кислоты.

Поместить в пробирку 1 мл 0,01%-ного раствора тиаминхлорида и 2 мл 50%-ного этанола; нагреть на водяной бане при температуре 50–70 °С в течение 2 мин. Затем добавить одну каплю 4н. раствора соляной кислоты и 10 мл этилового спирта, тщательно перемешать.

Жидкость в пробирке окрашивается в розовый цвет.

Опыт 4. Реакция витамина С с гексациано-(Ш) ферратом калия

Оборудование: штатив с пробирками; термостат на 40 °С; пипетки для прямого слива с одной меткой на 1 мл.

Материалы и реактивы: раствор; сок капусты, или картофеля, или 0,002%-ный раствор витамина С; 0,01%-ный раствор; гексациано-(Ш) феррат калия, 5%-ный соляная кислота, 10%-ный раствор; хлорид железа, 1%-ный раствор.

Качественная реакция основана на способности $K_3\{Fe(CN)_6\}$ восстанавливаться аскорбиновой кислотой до $K_4[Fe(CN)_6]$, который с ионом железа в степени окисления +3 образует в кислой среде гексациано-(II)феррат железа (берлинскую лазурь).

Ход работы

В пробирку налить 1 мл сока капусты, прибавить 2 капли раствора гидроксида калия и 2 капли раствора гексациано-(Ш) феррата калия, энергично встряхнуть содержимое пробирки. Затем в пробирку добавить 6–8 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и 1–2 капли раствора хлорида железа (Ш).

Выпадает синий (или зеленовато-синий) осадок берлинской лазури.

Опыт 5. Реакция витамина С с метиленовой синью

Оборудование: штатив с пробирками; термостат на 40 °С; пипетки для прямого слива с одной меткой на 1 мл;

Материалы и реактивы: сок капусты, или картофеля, или 0,002%-ный раствор витамина С; метиленовый синий.

Качественная реакция основана на том, что аскорбиновая кислота восстанавливает метиленовую синь в бесцветную лейкоформу, а сама окисляется с образованием дегидроаскорбиновой кислоты

Ход работы

В пробирку налить 1 мл капустного сока, прибавить 1 мл 0,01%-ного раствора метиленовой сини, затем перемешать. Закрыв пробкой, пробирку поместить в термостат при 37–40 °С. Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается.

После термостатирования пробирку с бесцветным раствором метиленовой сини энергично встряхнуть, не препятствуя поступлению воздуха в пробирку. Раствор вновь приобретет синий цвет.

Опыт 6. Реакция на витамин А с концентрированной серной кислотой (реакция Друммонда)

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: витамин А (ретинол), масляный раствор или рыбный жир; серная кислота, концентрированная.

Качественная реакция основана на способности концентрированной серной кислоты дегидратировать ретинол с образованием окрашенных продуктов. При смешивании раствора рыбного жира, содержащего витамин А, с концентрированной серной кислотой происходит окрашивание смеси в красно-бурый цвет.

Ход работы

В сухую пробирку по стенке опустите 2–3 капли масляного раствора витамина А, затем осторожно опустите 1 каплю серной кислоты. В месте соприкосновения витамина А с серной кислотой появляется синее, затем фиолетовое окрашивание, переходящее в красно-бурое.

Опыт 7. Реакция витамина А с сульфатом железа (II)

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: витамин А (ретинол), масляный раствор или рыбный жир; уксусная кислота, ледяная; сульфат железа, насыщенный раствор; серная кислота, концентрированная.

Продукты реакции витамина А с сульфатом железа окрашены в голубой цвет. Каротины дают при этой реакции зеленое окрашивание.

Ход работы

К 1–2 каплям 0,05%-ного раствора витамина А в хлороформе добавьте 5–10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа, и 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Каротины дают при этой реакции зеленоватое окрашивание.

Опыт 8. Реакции витамин Е с концентрированной азотной кислотой

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки.

Материалы и реактивы: - α -токоферол, 0,1%-ный раствор в 96%-ном спирте; азотная кислота, концентрированная.

Витамин Е при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой окисляется с образованием α -токоферилхинона, окрашенного в красный или желтовато-красный цвет. Метод используется для количественного определения витамина Е.

Ход работы

В сухую пробирку налейте 2–3 капли масляного раствора витамина Е или 4–5 капли 0,1 %-ного спиртового раствора витамина Е, прибавьте 10 капель концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирки перемешайте. Пробирку поместите на водяную баню при 70 °С (не выше); образуется эмульсия, которая постепенно расслаивается и верхний маслянистый слой приобретает красную окраску.

Опыт 9. Реакция витамина Е с хлоридом железа (III)

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки.

Материалы и реактивы: - α -токоферол, 0,1%-ный раствор в 96%-ном спирте; хлорид железа (III).

Спиртовой раствор витамина Е окисляется хлоридом железа (III) в α -токоферилхинон, в результате этого раствор витамина Е окрашивается в красный цвет.

Ход работы

В сухую пробирку налейте 4–5 капель 0,1%-ного спиртового раствора витамина Е, прибавьте 5 капель хлорида железа (III) и содержимое пробирки тщательно перемешайте. Пробирку поместите в водяную баню при 70 °С до появления красного окрашивания.

Опыт 10. Количественное определение аскорбиновой кислоты методом титра

Оборудование: ступка фарфоровая с пестиком; колбы мерные на 25, 50 и 1000 мл; градуированная пипетка на 10 мл; колбы конические на 50 мл (4 шт.); воронки для фильтрования стеклянные; фильтровальная бумага; весы аналитические и технические.

Материалы и реактивы: исследуемый материал (сухие ягоды шиповника, хвоя, капуста, картофель); аскорбиновая кислота, кристаллическая; соляная кислота, 2%-ный раствор; серная кислота, 2%-ный раствор; КJ, кристаллический; крахмал, 1%-ный раствор; КЮ₃, точно 0,001 н. раствор (0,03568 г КЮ₃ растворить в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе на 1000 мл и при тщательном перемешивании объем довести дистиллированной водой до метки), 2,6-дихлорфенолиндофенол, 0,001 н. раствор (к 0,25 г 2,6-дихлорфенолиндофенола прилить 700 мл дистиллированной воды, взболтать и добавить 300 мл буферной смеси; на следующий день раствор отфильтровать и тщательно перемешать; определить титр приготовленного раствора); буферная фосфатная смесь (1/15M), приготовленная по Серенсену (раствор 1: 9,078 г КН₂РО₄ растворить в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе на 1000 мл и при тщательном перемешивании довести объем дистиллированной водой до метки; раствор 2: 11, 867 г Na₂НРО₄·2Н₂О растворить в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе на 1000 мл и, тщательно перемешивая, объем довести дистиллированной водой до метки).

Растворы 1 и 2 хранить отдельно, перед началом анализа их смешать в соотношении 2:3, тогда рН=6,9-7,0); битое стекло или кварцевый песок.

Принцип метода количественного определения витамина С основан на его способности восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в щелочной среде имеет синюю окраску, а в восстановленном состоянии – бесцветный.

Количество витамина С определяют методом титрования раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. Пока в титруемом растворе содержится витамин С, приливаемый щелочной раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола будет обесцвечиваться за счет образования восстановленной формы аскорбиновой кислоты. Как только все количество витамина С, имеющееся в исследуемом растворе, окислится, 2,6-дихлорфенолиндофенол не будет восстанавливаться и титруемый раствор приобретет розовую окраску за счет перехода щелочного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола синего цвета в 2,6-дихлорфенолиндофенол красного цвета в кислой среде.

Зная количество 2,6-дихлорфенолиндофенола (краска Тильманса), израсходованное на титрование, и его титр, установленный по аскорбиновой кислоте, вычисляют содержание аскорбиновой кислоты в исследуемом растворе.

При воздействии ряда технологических факторов (тепловой обработки, облучения, присутствия некоторых металлов, хранения) дегидроаскорбиновая кислота превращается в дикетогулоновую, при этом с потерей витаминных свойств.

Ход работы

1. Точную навеску исследуемого материала (сухих ягод шиповника – 1, хвой – 1, капусты – 5, картофеля – 5 г) тщательно растереть в фарфоровой ступке с 4 мл 2%-ной соляной кислоты, добавив немного измельченного стекла.

2. Содержимое ступки количественно перенести в мерную колбу на 25 мл (4–5 раз ступку сполоснуть водой, сливая ее по стеклянной палочке в ту же колбу), довести объем раствора дистиллированной водой до метки. Полученную смесь оставить на 5–10 мин.

3. Содержимое колбы тщательно перемешать, отфильтровать через бумажный фильтр, фильтрат использовать для определения витамина С. Экстракт, полученный из картофеля, не фильтруется.

4. В коническую колбочку на 50 мл отмерить пипеткой определенный объем полученного экстракта (шиповника – 1, хвой – 5, капусты – 5 мл, картофеля – всю полученную смесь без фильтрации), добавить 4 мл 2%-ного раствора соляной кислоты и титровать из бюретки 0,001н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, не исчезающего около 30 с.

5. В контрольной пробе вместо вытяжки берется соответствующий объем смеси: 4 мл 2%-ной соляной кислоты и 21 мл воды.

6. Содержание аскорбиновой кислоты в пробе определить по формуле:

$$X = \frac{T \cdot A \cdot B \cdot 100 \cdot K}{B \cdot m},$$

где X – содержание аскорбиновой кислоты, мг %; T = K · 0,088 – количество аскорбиновой кислоты (мг), соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола; K – поправочный коэффициент нормальности 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфено-линдофенола = 1; A – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованное на титрование, за вычетом контроля, мл; B – объем фильтрата, взятый для титрования, мл; B – общий объем приготовленного экстракта, мл; m – количество вещества, взятое для анализа, г; 100 – количество граммов исследуемого материала, взятое для вычисления процентного содержания.

б) Определение титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола: в мерную колбу на 50 мл поместить несколько кристалликов (1–1,5 мг) аскорбиновой кислоты и растворить в небольшом количестве 2%-ной серной кислот, затем при тщательном перемешивании объем довести этой же кислотой до метки. В две конические колбочки налить по 5 мл приготовленного раствора аскорбиновой кислоты, при перемешивании добавить кристаллики КJ (около 5–10 мг) и 5 капель 1%-ного раствора крахмала и оттитровать содержимое одной колбочки 2,6-дихлорфенолиндофенолом, другой – точно 0,001 н. раствором КJОз.

Расчет титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте провести по формуле:

$$T = \frac{0,088 \cdot a}{b},$$

где T – количество мг аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола; 0,088 – количество мг аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора йодата калия; a – количество 0,001н. раствора йодата калия, израсходованного на титрование раствора аскорбиновой кислоты, мл; б – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованное на титрование, мл.

б) Запишите ваши наблюдения для каждого опыта.

в) Сформулируйте выводы для каждого опыта.

г) Отчитайтесь перед преподавателем о проделанной работе: предъявите оформленный отчет по лабораторной работе и штатив с пробирками по каждому опыту.

Вопросы для самостоятельной работы

1. Какие органические вещества называются витаминами?
2. Что лежит в основе классификации витаминов?

3. Какую физиологическую роль выполняют витамины в организме животных и человека?
4. Какие жирорастворимые витамины знаете?
5. Какие важнейшие водорастворимые витамины знаете?
6. На чем основаны качественные реакции на отдельные витамины?
7. Какие методы определения витаминов вам известны?
8. Какое строение и свойства присуще витамину С?
9. В каких растительных продуктах высокое содержание витаминов группы В?
10. Какие витамины наименее стойки к тепловой обработке продукта?

Учебная литература: [1, 5, 10, 12]

Лабораторная работа № 2

Тема «Ферменты»

Ферментные препараты различного происхождения. Открытие наличия их в биологическом материале

Цель работы: научиться открывать присутствие различных классов ферментов в биологическом материале, определять активность трипсина,

Теоретический материал, необходимый для выполнения лабораторной работы.

Ферменты - специфические белки, которые играют роль биологических катализаторов, обеспечивающих многообразные превращения в организме. Они входят в состав всех клеток и тканей живых организмов. Благодаря ферментам, химические реакции в живом организме протекают с большой скоростью при обычной температуре тела и без участия сильнодействующих химических реагентов. Ферменты характеризуются высокой специфичностью как в отношении субстратов, так и катализируемых ими реакций.

В основе действия ферментов лежит их способность взаимодействовать с субстратами с образованием фермент-субстратного комплекса. В результате этого происходит активация субстрата, который в дальнейшем вступает в реакции при значительно сниженной энергии активации с высокой скоростью.

Для ферментов характерна специфичность действия, которая заключается в избирательности по отношению к субстрату или пути превращения.

Активность ферментов зависит от температуры, что объясняется их белковой природой. Воздействие высокой температуры приводит к денатурации молекулы фермента и утрате её возможности ускорять гидролиз

1,4- α -гликозидных связей в полисахаридах крахмала. Низкая температура обратимо инактивирует фермент.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

До проведения лабораторной работы:

- а) сформулируйте цель каждого опыта;
- б) оформите проект отчета по лабораторной работе;
- в) напишите уравнения соответствующих реакций;
- г) предусмотрите место в проекте отчета для наблюдений и выводов.

В ходе выполнения лабораторной работы:

- а) проведите опыты:

Опыт 1. Ферментативный гидролиз крахмала

С помощью реакции гидролиза изучают состав веществ. Гидролиз может быть кислотным, щелочным или ферментативным. В первых двух случаях процесс идет при повышенной температуре, а в последнем - при температуре тела человека.

В качестве фермента, гидролизующего крахмал на составные части (декстрины, мальтозу, глюкозу), выступает амилаза. Оценку результатов опыта проводят с помощью цветных реакций: Троммера и Люголя. Негидролизованный крахмал дает синее окрашивание с J_2 (положительная реакция Люголя) и отрицательную реакцию Троммера, так как он не обладает восстанавливающей способностью. Продукты же гидролиза крахмала (мальтоза и глюкоза) не дают реакции Люголя, но вступают в реакцию Троммера.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки, термостат.

Материалы и реактивы: раствор амилазы (перед началом работы ферментный препарат амилазу растворяют, добавляя дистиллированную воду в соотношении 1:100); крахмала 1 %-ный раствор; реактив Люголя (J_2 в KJ); реактив Троммера (свежеприготовленная смесь 5%-ного раствора сульфата меди и 10%-ного раствора гидроксида натрия в соотношении 1:4).

Ход работы

В две пробирки налить по 10 капель 1%-ного раствора крахмала. В одну из них внести 4 капли воды (контроль), а во вторую – 4 капли раствора амилазы (опыт). Содержимое пробирок перемешать и поставить в термостат на 15 мин при 37°C. Затем из первой пробирки (контроль) дважды отобрать по 4 капли исследуемого вещества, которые поместить в две разные пробирки. В одну из них добавить 1 каплю 1%-ного раствора Люголя, а в другую – предварительно налить реактив Троммера (1 каплю 5%-ного раствора сульфата меди и 4 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия), затем осторожно нагреть до кипения. Результаты контрольной пробы записать в таблицу.

Аналогичную процедуру выполнить с содержимым второй пробирки (контроль) и записать результаты в таблицу 3.

Таблица 3 – Результаты опыта

Номер пробирки	Фермент	Субстрат	Реакция с реактивом Люголя	Реакция с реактивом Троммера	Наблюдения
1 (контроль)	Вода	Крахмал			
2 (опыт)	Амилаза	Крахмал			

Опыт 2. Ферментативный гидролиз белков

Опыт служит моделью переваривания белков пищи. Для опыта необходимы растворы яичного белка – пища, раствор фермента пептидазы (можно использовать лекарственные препараты – фестал, панзинорм, панкреатин), насыщенный раствор сульфата аммония – высаливающий агент вещество, вызывающее выпадение белков в осадок.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки с одним делением для прямого слива на 1 и 2 мл; термостат.

Материалы и реактивы: раствор яичного белка, 10%-ный; раствор фермента; насыщенный раствор сульфата аммония (NH⁺SO₄⁻).

Ход работы

В одну пробирку налить 1 мл 10%-ного раствора яичного белка, добавить 1 мл дистиллированной воды (контроль). В другую пробирку налить 1 мл раствора белка, добавить 1 мл раствора фермента (опыт). Поставить обе пробирки на 20–30 мин в термостат при температуре 30–37 °С (идет процесс гидролиза – переваривания). Затем в обе пробирки прилить по 2 мл насыщенного раствора сульфата аммония и добавить несколько кристаллов этой же соли. В первой пробирке наблюдается обильное выпадение осадка (белка). Во второй пробирке – осадок или вообще не образуется, или выпадает в незначительном количестве.

Опыт 3. Белки как противоядие для ионов тяжелых металлов

Взаимодействие ионов металлов с белками лежит в основе использования молока как противоядия при отравлении тяжелыми металлами.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки с одним делением для прямого слива на 1 мл; термостат.

Материалы и реактивы: раствор слюны; раствор амилазы; молоко; крахмал, 1%-ный раствор; ацетат свинца (II), 1%-ный раствор; реактив Люголя.

Ход работы

В одну пробирку налить по 1 мл раствора амилазы, 1%-ного раствора крахмала, 1%-ного раствора ацетата свинца (II) и молока (опыт). В другую пробирку налить по 1 мл растворов амилазы, крахмала, ацетата свинца (II) и воды (контроль). Пробирки встряхнуть и поместить в термостат на 20 мин при температуре 30 °С. Затем добавить в обе пробирки по 1 капле реактива Люголя. В обеих пробирках есть ионы Pb^{2+} инактивирующие амилазу. Но в присутствии молока, если активность амилазы сохраняется, при добавлении реактива Люголя не появляется синего окрашивания раствора.

Опыт 4. Влияние формальдегида на активность амилазы

Формальдегид – высоко реакционноспособное карбонильное соединение, способное реагировать с белками, разрушая их структуру. В этом заключается его токсическое действие на организм человека.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки с одним делением для прямого слива на 1 мл, термостат.

Материалы и реактивы: крахмал, 1%-ный раствор; раствор амилазы; формальдегид, 5%-ный раствор; реактив Люголя.

Ход работы

В одну пробирку прилить по 1 мл растворов крахмала, амилазы и формальдегида (опыт). В другую пробирку добавить 1 мл раствора крахмала, амилазы и воды (контроль). Содержимое пробирок перемешать и поставить в термостат при 30 °С на 20 мин. Затем в обе пробирки прилить по 1 капле реактива Люголя. Синее окрашивание в пробирке свидетельствует об инактивации амилазы.

Опыт 5. Обнаружение каталазы в пищевых продуктах

Фермент каталаза содержится в некоторых сырых продуктах – молоке, картофеле и др. Каталазу обнаруживают, используя ее способность разлагать перекись водорода с выделением газа кислорода.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки, термостат.

Материалы и реактивы: молоко сырое и кипяченое; кусочки сырого и вареного мяса; кусочки сырого и вареного картофеля; пероксид водорода (H_2O_2), 3%-ный раствор.

Ход работы

В две пробирки налить по 5 капель пероксида водорода. В первую пробирку добавить 5 капель сырого молока, во вторую – 5 капель кипяченого. В первой пробирке наблюдают выделение газа, который испытывают тлеющей лучинкой. Вместо молока можно взять кусочки сырого и вареного мяса или сырого и вареного картофеля.

Опыт 6. Обнаружение оксидоредуктазы в молоке

Опыт основан на способности оксидоредуктазы восстанавливать метиленовую синь (при этом раствор обесцвечивается).

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки, водяная баня.

Материалы и реактивы: молоко сырое и кипяченое; формальдегид, 5%-ный раствор; метиленовая синь, 0,1%-ный спиртовой раствор.

Ход работы

В первую пробирку налить 5 капель свежего молока, во вторую – столько же кипяченого. Затем в обе пробирки добавить по 3 капли формальдегида и по 3 капли 0,1%-ного спиртового раствора метиленовой сини. Обе пробирки нагреть на водяной бане при 70 °С. Отметить обесцвечивание раствора метиленовой сини в одной из пробирок

Опыт 7. Обнаружение тирозиназы в картофеле

Тирозиназа (катехолоксидаза) относится к группе ферментов, окисляющих фенолы и родственные им соединения, в частности тирозин. По химической структуре тирозиназа является металлопротеидом, содержащим медь в количестве 0,20–0,25 %. Медь служит переносчиком электронов от субстрата на кислород воздуха. Тирозиназа содержится во многих растениях, грибах, а также в отдельных органах и тканях животных.

Под влиянием тирозиназы тирозин окисляется до красного пигмента, а при дальнейшем окислении переходит в черный пигмент меланин. Превращение красного пигмента в меланин может протекать и в отсутствие тирозиназы, достаточно действия кислорода воздуха.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки с одним делением для прямого слива на 1 мл, термостат, баня водяная.

Материалы и реактивы: картофель сырой; тирозин, 0,1%-ный раствор.

Ход работы

Для получения ферментного препарата тирозиназы сырой картофель очистить от кожуры, верхние слои клубня в количестве 2–4 г порезать кусочками и растереть в ступке с 10 мл дистиллированной воды до однородной массы, затем отфильтровать через два слоя марли.

В две пробирки отмерить по 1 мл полученного фильтрата. Одну пробирку поместить в кипящую водяную баню и содержимое прокипятить 1–2 мин, затем охладить водопроводной водой. Далее в обе пробирки добавить по 1 мл 0,1%-ного раствора тирозина, содержимое пробирок перемешать и поместить на водяную баню при 37–40 °С. Нагревать, периодически энергично встряхивая пробирки для лучшего соприкосновения содержимого с воздухом, до образования продуктов окисления черного цвета.

Опыт 8. Открытие пероксидазы в картофеле

Окислительно-восстановительный фермент пероксидаза широко распространен в природе. Особенно в больших количествах этот фермент встречается в растительных тканях (хрене, картофеле и др.). В животных организмах он встречается преимущественно в крови, мышцах, молоке (реакцией на пероксидазу в молочной промышленности контролируют эффективность пастеризации молока). Пероксидаза катализирует окисление многих фенолов в присутствии перекисей, например гидрохинона, пирогаллола, гваякола, парафенилендиамида и др. Так, при окислении гваякола пероксидазой картофеля образуется продукт коричневого цвета

Материалы и реактивы: сырой и вареный картофель; гваякол, 5%-ный спиртовой раствор; пероксид водорода, 1%-ный раствор.

Ход работы

На тонкий срез картофеля сырого и вареного нанести 1–2 капли спиртового раствора гваякола и 1–2 капли раствора пероксида водорода.

На сыром картофеле сразу же образуется пятно коричневого цвета, обусловленное образованием продукта окисления гваякола. На вареном картофеле пятно не образуется.

Опыт 9. Открытие амилазы в слюне

Гидролитический фермент слюны α -амилаза катализирует гидролиз α -глюкозидной связи крахмала до дисахарида мальтозы. Расщепление крахмала идет через стадии образования промежуточных продуктов, называемых декстринами, дающими с раствором йода различное окрашивание: крахмал, амилодекстрины, эритродекстрины, ахродекстрины.

Декстрины, близкие к крахмалу (амилодекстрины), дают синевато-фиолетовое окрашивание с йодом, эритродекстрины – красно-бурое, ахродекстрины и мальтоза не окрашиваются.

Оборудование: пробирка на 10–20 мл; палочка стеклянная; стекла часовые; цилиндр мерный на 10 мл.

Материалы и реактивы: слюна, разбавленная в 10–20 раз; крахмал, 1%-ный раствор; реактив Люголя.

Ход работы

В пробирку налить 5–10 мл 1%-ного раствора крахмала и около 2 мл разбавленной в 10–20 раз слюны. Содержимое пробирки перемешать и поставить в водяную баню с температурой 37–40 °С. Затем через 2, 4, 6 и 8 мин стеклянной палочкой отобрать 1–2 капли раствора крахмала из пробирки и смешать на часовом стекле с одной каплей реактива Люголя. Вначале жидкость будет давать с йодом синее окрашивание, затем капли постепенно будут окрашиваться в темно-коричневый, красный цвет и, наконец, окажутся бесцветными (желтыми). Наличие слабого желтого окрашивания обусловлено цветом прибавляемого раствора Люголя.

Опыт 10. Открытие уреазы в соевой муке

Уреаза – фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз мочевины на углекислый газ и аммиак. Уреаза содержится в соевых бобах, вырабатывается некоторыми микроскопическими грибами и бактериями.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетка с одной меткой для прямого слива на 5 мл; баня водяная.

Материалы и реактивы: соевая мука; мочевины, 2%-ный раствор; фенолфталеин, 1%-ный раствор.

Ход анализа

В две пробирки налить по 5 мл раствора мочевины и внести по 0,5 г соевой муки. Во вторую пробирку добавить 2 капли фенолфталеина. Содержимое обеих пробирок встряхнуть и пробирки поставить в водяную баню с температурой 37–40 °С на 5–10 мин. Выделяющийся аммиак в первой пробирке определить по запаху или по окрашиванию влажной лакмусовой бумажки в синий цвет у отверстия пробирки. Содержимое второй пробирки приобретает малиновую окраску вследствие смещения реакции среды в щелочную сторону за счет образования аммиака

Опыт 11. Открытие каталазы в крови

Каталаза – окислительно-восстановительный фермент, широко встречающийся в животных и растительных тканях. Биологическая функция каталазы заключается в освобождении клеток от пероксида водорода, образующегося при окислительно-восстановительных процессах.

Оборудование: штатив с пробирками; пипетки.

Материалы и реактивы: кровь дефибрированная; пероксид водорода, 1%-ный раствор.

Ход работы

В пробирку налить около 1 мл крови (8–10 капель) и добавить 10–20 капель раствора пероксида водорода. Происходит бурное выделение кислорода, жидкость в пробирке вспенивается. Повторить пробу с прокипяченной кровью.

Опыт 12. Определение активности трипсина

Трипсин относится к протеиназам (протеолитическим ферментам). Он катализирует реакцию разрыва пептидных связей в белках и полипептидах. Об активности трипсина можно судить по нарастанию аминного азота в казеине, который инкубируют с данным ферментом.

Оборудование: колбы конические на 100 мл; пипетка с одной меткой для прямого слива на 10 мл; баня водяная; термостат.

Материалы и реактивы: раствор казеина; раствор трипсина; гидроксид натрия, 0,1 н.; раствор формалина; фенолфталеин, 1%-ный раствор.

Ход работы

1) В колбу отмерить 50 мл раствора казеина, подогреть на водяной бане до 35–37 °С и прилить 2 мл трипсина.

2) Сразу из колбы отобрать 10 мл раствора и определить в нем аминный азот методом формольного титрования.

3) Колбу с казеином и трипсином поставить в термостат при 37 °С, затем через 30, 60 и 90 мин отобрать по 10 мл раствора и в каждой пробе определить содержание аминного азота.

4) Прирост аминного азота выражают графически, откладывая по вертикали количество аминного азота (в миллиграммах), а по горизонтали – время (в минутах).

5) Определение аминного азота методом формольного титрования. К 10 мл исследуемого раствора прибавить 5–6 капель фенолфталеина и оттитровать 0,1 н. раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания. Затем к раствору прилить 2 мл формалина и вновь титровать 0,1 н. раствором гидроксида натрия до слабо-розового окрашивания. Количество израсходованной щелочи после добавления формалина умножают на 1,4 и получают количество аминного азота в миллиграммах (1 мл 0,1 н. раствора NaOH соответствует 1,4 мг аминного азота):

б) запишите ваши наблюдения для каждого опыта;

в) сформулируйте выводы для каждого опыта;

г) отчитайтесь перед преподавателем о проделанной работе: предъявите оформленный отчет по лабораторной работе и штатив с пробирками по каждому опыту.

Лабораторная работа по ферментам предусматривает письменный ответ студентов на некоторые теоретические вопросы по теме.

Вопросы для самостоятельной работы

Общая характеристика и значение ферментов. Физико-химические свойства ферментов, обусловленные их белковой природой (молекулярная масса, растворимость, коллоидное состояние, осаждение, адсорбция, амфотерный характер, изоэлектрическая точка, электрофорез, диализ, кристаллизация).

Скорость химических реакций. Энергия активации химических реакций и ее снижение при катализе. Сходство и различия ферментов с неорганическими катализаторами. Высокая каталитическая способность ферментов. Единицы ферментативного действия.

Состав и структура ферментной молекулы. Однокомпонентные ферменты (протеины) и двухкомпонентные (протеиды). Коферменты и простетические группы. Витамины в составе ферментов. Атомы и ионы металлов в составе ферментов. Структурно-функциональная организация

ферментов. Активные, аллостерические центры ферментов. Проферменты. Изоферменты. Мультиферментные комплексы. Взаимосвязь ферментных систем и локализация ферментов в живой клетке.

Основные положения теории ферментативного катализа. Представления о механизме действия ферментов. Образование промежуточных ферментсубстратных комплексов. Молекулярные механизмы действия ферментов: эффект ориентации реагентов (сближение), эффект деформации связей в субстрате (напряжение, изгиб, натяжение), кислотно-основной и ковалентный катализ. Стереохимическая, абсолютная, абсолютная групповая и относительная субстратная специфичность действия ферментов. Кинетика ферментативных реакций. Влияние концентрации субстрата и фермента на скорость ферментативной реакции. Влияние температуры, концентрации водородных ионов, минеральных веществ и других физико-химических факторов на активность ферментов. Понятие о механизме регуляции активности ферментов. Активаторы и ингибиторы. Механизмы ингибирования ферментов – конкурентное, неконкурентное, бесконкурентное и субстратное ингибирование. Номенклатура и классификация ферментов. Подразделение ферментов на классы, подклассы. Характеристика отдельных классов и их роли в обмене веществ: 1. Оксидоредуктазы. 2.Трансферазы. 3.Гидролазы. 4.Лиазы. 5.Изомеразы.

Учебная литература: [1, 2, 6, 8, 9, 11]

Лабораторная работа № 3

Тема «Нуклеопротеиды, нуклеиновые кислоты»

Получение гидролизата нуклеопротеидов из гонад гидробионтов и установление его состава с помощью качественных реакций

Цель работы – провести гидролиз нуклеопротеидов из гонад рыб, научиться открывать продукты гидролиза, количественно определять содержание нуклеиновых кислот в исследуемом материале.

Теоретический материал, необходимый для выполнения лабораторной работы

Нуклеопротеиды – это сложные белки, состоящие из простых белков (протамины, гистоны) и нуклеиновых кислот.

Нуклеопротеиды играют важную биологическую роль, являясь структурными элементами клетки (ее ядра и цитоплазмы) и выполняя важнейшие специфические функции в живом организме. Деление клеток, биосинтез белков, передача наследственной информации тесно связаны с нуклеопротеидами, в частности с входящими в их состав нуклеиновыми кислотами (ДНК и РНК).

Нуклеиновые кислоты являются высокомолекулярными соединениями, построенными из большого числа нуклеопротеидов, которые состоят из гетероциклического основания (пуринового или пиримидинового) и углеводной компоненты (рибозы или 2-дезоксирибозы), а также фосфорной кислоты.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

До проведения лабораторной работы:

- а) сформулируйте цель каждого опыта;
- б) оформите проект отчета по лабораторной работе;
- в) напишите уравнения соответствующих реакций;
- г) предусмотрите место в проекте отчета для наблюдений и выводов.

В ходе выполнения лабораторной работы:

- а) проведите опыты.

Опыт 1. Выделение нуклеопротеидов из исследуемого материала

При проведении частичного гидролиза нуклеопротеиды распадаются на составные части: белки, преимущественно основного характера (протамины и гистоны), и нуклеиновые кислоты. Более полный гидролиз приводит к распаду белков и нуклеиновых кислот.

Исследование химического состава нуклеопротеидов проводят на примере молок рыб, которые подвергают гидролизу с последующим изучением его продуктов (полипептидов, пуриновых оснований, углеводных компонентов и фосфорной кислоты).

Нуклеопротеид можно извлечь из тщательно измельченных молок рыб (зобной железы, семенников, сперматозоидов и др.) при щелочной реакции раствора и осадить при его подкислении.

Оборудование: ступка с пестиком; стакан или колба на 50–100 мл; цилиндр на 100 мл; центрифуга с большими пробирками; весы для уравнивания центрифужных пробирок с гильзами; пипетка; стеклянная палочка.

Материал и реактивы: молоки рыб; диэтиловый эфир; песок промытый и прокаленный или измельченное стекло; гидроксид натрия, 0,4%-ный раствор; уксусная кислота, 5%-ный раствор.

Ход работы

1) 5–10 г исследуемого материала поместить в ступку и смешать с 10–15 каплями эфира (для разрушения клеток) и таким же количеством воды. Добавить щепотку песка и тщательно растереть содержимое ступки, затем прилить 30–50 мл раствора гидроксида натрия и продолжить растирание в течение 15–20 мин.

2) Перелить содержимое ступки в центрифужные пробирки, уравновесить их и провести центрифугирование.

3) Центрифугат слить в стакан и при непрерывном помешивании палочкой прилить из пипетки 0,4%-ный раствор уксусной кислоты (12–15 мл) до полного осаждения нуклеопротеида.

4) Содержимое стакана перенести в центрифужные пробирки и провести центрифугирование (центрифугирование можно заменить фильтрованием через складчатый фильтр). Осадок нуклеопротеида использовать для гидролиза.

5) Осадок нуклеопротеида поместить в круглодонную колбу на 100 мл, прилить 20 мл 10%-ного раствора серной кислоты и 20 мл дистиллированной воды. Колбу закрыть пробкой с воздушным холодильником, закрепить с небольшим наклоном и кипятить под тягой 1 ч.

6) Содержимое колбы охладить, довести объем до первоначального дистиллированной водой, отфильтровать через складчатый фильтр.

С фильтратом нуклеопротеидов провести качественные реакции.

Опыт 2. Биуретовая реакция на полипептиды

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; сульфат меди, 1%-ный раствор.

Ход работы

К 5 каплям фильтрата нуклеопротеидов добавить 10 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1–2 капли 1%-ного раствора сульфата меди до появления сине-фиолетового или красно-фиолетового окрашивания.

Опыт 3. Серебряная проба на пуриновые основания

Метод основан на способности пуриновых оснований с аммиачным раствором серебра образовывать осадок серебряных солей пуриновых оснований (аденина, гуанина), окрашенных в светло-коричневый цвет.

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; гидроксид аммония, концентрированный раствор; азотнокислое серебро, 2–3%-ный раствор; аммиачный раствор серебра (к 2–3%-ному раствору азотнокислого серебра добавить концентрированный раствор гидроксида аммония до растворения осадка).

Ход работы

В пробирку поместить 10 капель фильтрата нуклеопротеидов, добавить по каплям концентрированный раствор гидроксида аммония до щелочной реакции по универсальной индикаторной бумаге (1–10 капель) и 10 капель аммиачного раствора серебра. Через 3–5 мин образуется рыхлый бурый осадок серебряных соединений пуриновых оснований.

Опыт 4. Дифениламинная проба (реакция Дише)

Метод основан на способности дезоксирибозы ДНК вступать в реакцию с дифениламином с образованием соединения синего цвета при нагревании в среде, содержащей смесь ледяной уксусной и концентрированной серной кислот. С рибозой РНК аналогичная реакция дает зеленое окрашивание.

Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; дифениламинный реактив (1 г дифениланилина растворить в 100 мл ледяной уксусной кислоты и к раствору добавить 2,75 мл концентрированной серной кислоты).

Ход работы

В пробирку поместить 10 капель фильтрата нуклеопротеидов, прилить 0,5–1 мл дифениламинного реактива. Содержимое пробирки перемешать и нагреть на водяной бане течение 30 мин. Появляется характерное окрашивание.

Опыт. 5. Проба Троммера

Эта проба, как и две последующие, основана на способности альдегидной группы рибозы и дезоксирибозы восстанавливать в щелочной среде окисные формы металлов (Сu, Fe, Bi) до закисных, а закисные – до свободного состояния. Сахара же в этих условиях дают различные продукты окисления.

Избыток сульфата меди мешает реакции, так как ведет к образованию большого количества гидроксида меди (II), который при нагревании распадается с образованием черного осадка окиси меди (II).

Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; гидроксид натрия, 30%-ный раствор; сульфат меди, 7%-ный раствор.

Ход работы

В пробирку поместить 5 капель фильтрата нуклеопротеидов, добавить 5 капель 30%-ного раствора гидроксида натрия и несколько капель 7%-ного раствора сульфата меди до появления исчезающей мути гидроксида меди (II). Нагреть до кипения – выпадает осадок с характерным окрашиванием.

Опыт 6. Проба Фелинга

Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; реактив Фелинга (смешать 5 капель 7%-ного раствора сульфата меди и 5 капель раствора сегнетовой соли); раствор сегнетовой соли (345 г натрия, калия виннокислого поместить в мерную колбу на 1000 мл, растворить в небольшом количестве дистиллированной воды, добавить 140 г гидроксида натрия и дистиллированной водой довести до метки).

Ход работы

В пробирку поместить 5 капель фильтрата нуклеопротеидов, добавить 3–5 капель реактива Фелинга, перемешать и нагреть до кипения. Отметить выпадение окрашенного осадка.

Опыт 7. Реакция Толленса

В отличие от двух предыдущих, реакция Толленса является специфичной для пентоз. Она обусловлена взаимодействием флороглюцина с фурфуролом, образующегося из пентозы при нагревании с соляной кислотой, при этом в результате их конденсации появляется красное окрашивание.

Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; флороглюцин, 0,5%-ный раствор; соляная кислота, концентрированная.

Ход работы

В пробирку внести 5 капель фильтрата нуклеопротеида, добавить 2–3 капли 0,5%-ного раствора флороглюцина в концентрированной соляной кислоте и кипятить в течение 1 мин. Наблюдается изменение окраски.

Опыт 8. Реакция Молиша

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; тимол, 1%-ный раствор; серная кислота, концентрированная.

Ход работы

В пробирку внести 5 капель фильтрата нуклеопротеидов, добавить 1–2 капли 1%-ного раствора тимола и по стенке пробирки (осторожно!) прилить 10 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки появляется красное окрашивание.

Опыт 9. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

Оборудование: штатив с пробирками; колба с притертой пробкой на 250 мл; водяная баня.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; молибденовый реактив (в колбу поместить 100 мл дистиллированной воды, добавить 7,5 г молибдата аммония и при перемешивании влить 100 мл 32%-ного раствора азотной кислоты плотностью 1,2 г/см³).

Ход работы

В пробирку внести 5 капель фильтрата нуклеопротеидов, добавить 10–20 капель молибденового реактива и кипятить в течение нескольких минут.

При охлаждении пробирки под струей воды выпадает кристаллический осадок лимонно-желтого цвета.

Опыт 10. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот.

Методы количественного определения нуклеиновых кислот, основанные на спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра,

отличаются высокой чувствительностью и простотой проведения анализа. Необходимым этапом различных методов спектрофотометрического определения нуклеиновых кислот является их экстракция из биологического материала, сопряженная с гидролизом полинуклеотидов. В связи с этим из исследуемого материала предварительно необходимо удалить свободные нуклеотиды.

В основе модификации спектрофотометрического метода определения суммарного содержания нуклеиновых кислот, разработанной А. С. Спириным, лежит экстракция их из биологического материала горячей хлорной кислотой с последующим определением поглощения экстрактов в ультрафиолетовой области спектра при 270 и 290 нм. Автор предложил также формулу для расчета содержания нуклеиновых кислот.

Оборудование: ступка с пестиком; пробирки большие; пробки с воздушными холодильниками; конические колбы с притертыми пробками на 100 мл; спектрофотометр; центрифуга (3000 g); водяная баня.

Материалы и реактивы: исследуемый материал (гонады рыб, зубная железа, селезенка и др.); хлорная кислота, 0,2 н. и 0,5 н. растворы.

Ход работы

1) Навеску ткани тщательно измельчить в ступке на льду, затем 100–200 мг измельченной ткани поместить в центрифужную пробирку и добавить 5–10 мл охлажденного 0,2 н. раствора хлорной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешать и осадок отделить центрифугированием на холоде (10 мин).

2) Центрифугат отбросить, осадок повторно обработать хлорной кислотой. Такая предварительная обработка материала необходима для удаления кислоторастворимых нуклеотидов.

3) После удаления центрифугата к осадку добавить 5–10 мл 0,5 н. раствора хлорной кислоты и, закрыв пробирки пробками с воздушным холодильником, нагревать их в кипящей водяной бане в течение 30 мин. Эта процедура обеспечивает количественную экстракцию нуклеиновых кислот из исследуемого материала и их кислотный гидролиз до растворимых фрагментов.

4) Гидролизаты охладить, провести центрифугирование.

5) После центрифугирования надосадочную жидкость слить в колбу с притертой пробкой.

6) К осадку добавить 5–10 мл 0,5 н. раствора хлорной кислоты и повторить операцию, описанную в п. 3, 4 и 5.

7) Гидролизаты объединить и определить поглощение на спектрофотометре при 270 и 290 нм против контрольного раствора – 0,5 н. раствора хлорной кислоты.

При необходимости гидролизаты развести раствором 0,5 н. хлорной кислоты.

Гидролизат используются для количественного определения ДНК по пентозе.

8) Содержание фосфора в нуклеиновых кислотах исследуемого раствора определить по формуле:

$$C_{\text{мкг ФН}} = \frac{A_{270} - A_{290}}{0,19}, \text{ мкг/мл,}$$

где 0,19 – значение ΔA ($A_{270} - A_{290}$), которое имеет гидролизат нуклеиновых кислот, содержащий 1 мкг нуклеинового фосфора в 1 мл раствора.

При дальнейших расчетах учитывать общий объем гидролизата и разведения. Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество нуклеиновых кислот использовать средний пересчетный коэффициент 10,3:

$$C_{\text{мкг ФН}} = C_{\text{мкг ФН}} \cdot 10,3.$$

Рекомендуется проводить дополнительное определение оптической плотности при 260 нм; оптическая плотность при 260 и 270 нм не должна различаться более чем на $\pm 15\%$.

Опыт 11. Количественное определение содержания ДНК по пентозе с дифениламином по Дише

Метод основан на реакции между дифениламином и дезоксирибозой, отщепляющейся от пуриновых нуклеотидов в результате кислотного гидролиза. При этом N, β -гликозидная связь в пиримидиновых нуклеотидах не разрушается и вследствие этого определяется лишь около половины углевода, входящего в состав ДНК; поэтому рекомендуется в качестве стандарта использовать гидролизат ДНК, концентрацию которого предварительно определяют спектрофотометрическим методом.

Оборудование: фотоколориметр или спектрофотометр; водяная баня.

Материалы и реактивы: гидролизат исследуемого материала; хлорная кислота, 0,5 н. раствор; реактив Дише (1 г дифениламина, перекристаллизованного из 70%-ного этилового спирта, растворить в 100 мл ледяной уксусной кислоты, х.ч., добавить 2,75 мл концентрированной серной кислоты); стандартный раствор ДНК, 0,5 мг/мл (навеску коммерческого препарата ДНК растворить в 0,5 н. хлорной кислоте и нагревать 15 мин при 70 °С; для определения точной концентрации гидролизат развести в 50 раз 0,5 н. раствором хлорной кислоты, затем измерить поглощение на спектрофотометре так, как это описано в предыдущем опыте).

Ход работы

1) 1–2 мл кислотного гидролизата ткани поместить в пробирку, добавить двойной объем реактива Дише. Смесь нагревать в течение 10 мин на водяной бане при 90°С и охладить.

2) Одновременно провести реакцию со стандартным раствором ДНК, содержащим от 50 до 500 мкг ДНК в пробе. При нагревании развивается устойчивая синяя окраска.

3) Измерить поглощение опытного и стандартного растворов на фотоколориметре при 590 нм.

4) Содержание ДНК в ткани определить по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору ДНК, с учетом всех разведений.

Опыт 12. Количественное определение содержания РНК с орцином по Мейбаум

Метод основан на реакции рибозы, входящей в состав РНК, с орцином. В результате гидролиза РНК в присутствии соляной кислоты образуется производное фурфурола, дающее при нагревании с орцином продукт зеленого цвета. Реакция не является высокоспецифичной: окрашенные продукты образуют дезоксирибозу, гексозы, полисахариды, а также некоторые другие соединения, однако чувствительность реакции орцина с рибозой намного выше.

Оборудование: штатив с пробирками; фотоколориметр; спектрофотометр; водяная баня.

Материалы и реактивы: стандартный раствор РНК, 0,1 мг/мл (навеску коммерческого препарата РНК растворить в 0,5 н. хлорной кислоты, прокипятить в течение 15 мин и измерить поглощение на спектрофотометре, как указано в лабораторной работе 1.5); хлорная кислота, 0,5 н. раствор; хлорное железо, 0,1%-ный раствор, приготовленный на концентрированной соляной кислоте; орцин, 0,5%-ный раствор (готовится на растворе хлорного железа, указанного выше, и непосредственно перед употреблением).

Ход работы

1) В пробирку поместить 2 мл исследуемого раствора, содержащего от 10 до 80 мкг РНК, прилить 2 мл раствора орцина, перемешать и нагревать 20 мин на кипящей водяной бане.

2) Пробы охладить и провести колориметрирование при 670 нм.

3) Содержание РНК определить по калибровочному графику, построенному по стандартному раствору РНК, с учетом всех разведений.

Опыт 13. Количественное определение ДНК колориметрическим методом

Метод основан на способности дезоксирибозы, входящей в состав ДНК, давать синее окрашивание с дифениламиновым реактивом. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации ДНК.

Оборудование: фотоколориметр, кюветы с толщиной слоя 0,5 см; пробирки; пипетки с одной меткой для прямого слива на 1 и 2 мл.

Материалы и реактивы: водный раствор ДНК; дифениламинный реактив (1 г дифениламина растворить в 100 мл ледяной уксусной кислоты и добавить 2,75 мл концентрированной серной кислоты).

Ход работы

1) В одну пробирку отмерить 1 мл водного раствора ДНК и 2 мл дифениламинного реактива (опыт), в другую – 1 мл дистиллированной воды и 2 мл дифениламинного реактив (контроль).

2) Обе пробы поместить в кипящую водяную баню на 10 мин.

3) Пробы охладить и измерить интенсивность окраски на фотоколориметре против контроля (светофильтр красный).

4) Содержание ДНК определить по калибровочному графику.

5) Построение калибровочного графика: в три пробирки налить по 1 мл раствора ДНК с различной концентрацией (50, 100, 200 мкг/мл) и по 2 мл дифениламинного реактива, пробирки поместить на 10 мин в кипящую водяную баню, затем измерить оптическую плотность каждого из растворов.

Калибровочный график построить, откладывая на оси абсцисс концентрации использованных растворов ДНК, а на оси ординат – соответствующие им значения оптической плотности.

б) Запишите ваши наблюдения для каждого опыта.

в) Сформулируйте выводы для каждого опыта.

г) Отчитайтесь перед преподавателем о проделанной работе: предъявите оформленный отчет по лабораторной работе и штатив с пробирками по каждому опыту.

Вопросы для самостоятельной работы

1. Какие белки относят к нуклеопроотеидам?
2. Охарактеризуйте их строение.
3. Какие простые белки входят в состав нуклеопроотеидов?
4. Какие виды нуклеиновых кислот существуют в природе?
5. Приведите отличия в строении ДНК и РНК.
6. Какие пентозы входят в состав нуклеиновых кислот? Приведите их формулы и названия.
7. Каково строение нуклеозида, нуклеотида?
8. Напишите формулы рибо- и дезоксирибонуклеотидов. Назовите их.
9. В каких условиях можно провести гидролиз нуклеопроотеидов?
10. Каким качественными реакциями можно открыть продукты гидролиза? Приведите соответствующие уравнения реакций.

Учебная литература: [1, 2, 4, 5, 12]

Лабораторная работа № 4

Тема «Фосфолипиды»

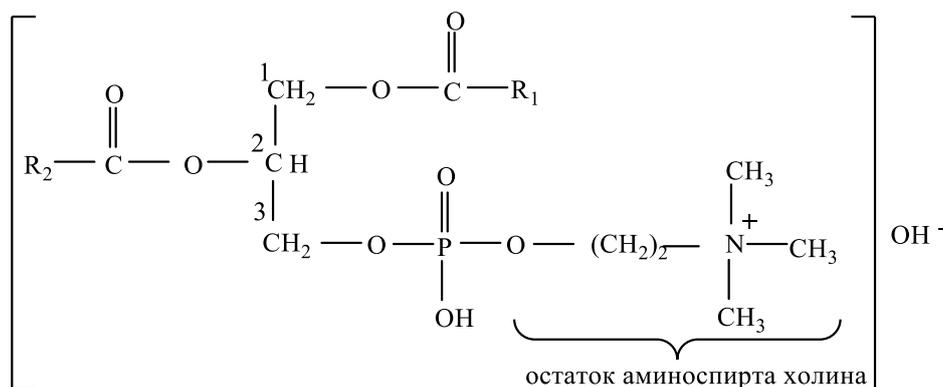
Выделение фосфолипидов из биологических объектов и установление их состава с помощью качественных реакций.

Цель работы – научиться проводить реакцию гидролиза фосфолипидов и открывать продукты гидролиза.

Теоретический материал, необходимый для выполнения лабораторной работы.

Лецитин (фосфатидилхолин), входящий в состав липидов, относится к группе глицерофосфолипидов.

Молекулы глицерофосфолипидов построены из остатков трехатомного спирта глицерина, насыщенных и ненасыщенных высших жирных кислот и гидросилсодержащей полярной молекулы (холина, этаноламина, серина и др.). Например, α-лецитин (фосфатидилхолин):



Их наличие можно открыть с помощью соответствующих качественных реакций с продуктами щелочного гидролиза.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

До проведения лабораторной работы:

- а) сформулируйте цель каждого опыта;
- б) оформите проект отчета по лабораторной работе;
- в) напишите уравнения соответствующих реакций;
- г) предусмотрите место в проекте отчета для наблюдений и выводов.

В ходе выполнения лабораторной работы:

- а) проведите опыт;

Опыт 1. Выделение липидов из биологического объекта.

Оборудование: фарфоровая ступка, фильтровальная бумага, коническая колба на 500мл, воронка диаметром 5-10 см.

Материалы и реактивы: гонады (икра), сульфат аммония безв. порошок, хлороформ.

Ход работы

Навеску икры 25–50 г измельчить и перетереть в фарфоровой ступке с 2,5-кратным количеством сульфата аммония, перенести в коническую колбу и залить хлороформом, закрыв колбу пробкой.

Дать настояться в течение суток. Затем жидкость отфильтровать и оставить для испарения хлороформа. Выделенные таким образом липиды использовать для следующих опытов.

Опыт 2. Обнаружение глицерина в липидах икры

В основе реакции лежит способность глицерина к дегидратации при нагревании с образованием акролеина, обладающего специфическим, резким запахом: с помощью этой реакции обнаруживают глицерин, входящий в состав нейтральных жиров и фосфолипидов.

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: исследуемый материал, гидросульфат калия (порошок).

Ход работы

В сухую пробирку вносят 1–2 капли липидов икры и на кончике шпателя порошок гидросульфата калия. Нагревают до появления белых паров акролеина с резким запахом. Прodelьывают эту же работу с кусочком воска. Наблюдается ли выделение акролеина.

Опыт 3. Обнаружение высших жирных кислот в липидах икры

Степень неопределенности жиров, обусловленную присутствием неопределенных жирных кислот, количественно определяют по присоединению галогенов по месту двойной связи (йода, брома).

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: исследуемый материал, бромная вода.

Ход работы

В пробирку вносят 8–10 капель бромной воды и 2–3 капли липидов икры (содержат большое количество неопределенных жирных кислот). Содержимое пробирки взбалтывают. Происходит обесцвечивание бромной воды.

Опыт 4. Обнаружение лецитина в биологическом материале

Оборудование: штатив с сухими пробирками, стакан на 50 мл, водяная баня, воронка диаметром 3–5 см, фарфоровая ступка, фильтровальная бумага.

Материалы и реактивы: липиды икры (или вареный желток куриного яйца), этиловый спирт, ацетон, едкий натр (10 %), уксусная кислота, молибденовый реактив (раствор молибденовокислого аммония в азотной кислоте), универсальный индикатор, безводный гидросульфат калия, глицерин, фуксинсернистая кислота.

Ход работы

В ступке растереть 2–5 г липидов икры или 1/5 часть куриного желтка и при перемешивании добавьте 15 мл горячего спирта. Смесь отфильтруйте в

сухую пробирку. Фильтрацию повторить до получения прозрачного фильтрата. Далее работу ведите с полученным фильтратом.

1. Обнаружение лецитинов.

В сухую пробирку налейте 2–3 мл ацетона и по каплям добавляйте фильтрат до появления мути. Объясните результат опыта

В сухую пробирку вносят 10 капель ацетона и 1–2 капли фильтрата. Выпадает белый осадок.

В другую пробирку прибавляют к 20 каплям фильтрата несколько капель дистиллированной воды до образования устойчивой эмульсии.

В третью пробирку вносят 10 капель фильтрата и добавляют 2–4 капли насыщенного раствора CdCl_2 . Наблюдают выпадение осадка белого цвета. Сделайте заключение о наличии лецитина в икре или желтке куриного яйца.

2. Гидролиз лецитинов. В широкую пробирку поместите около 3 мл полученного фильтрата, добавьте 3 мл щелочи и кипятите в течение 5 мин на водяной бане. После кипячения гидролизат слабо подкислите уксусной кислотой (проверить индикаторной бумагой). На поверхность жидкости всплывают жирные кислоты, в растворе остаются глицерин, фосфорная кислота и холин. Отделите раствор от жирных кислот фильтрованием.

3. Проба на холин. При кипячении ощущается запах селедочного рассола, характерный для триметиламина, который образуется из холина. Триметиламин обнаруживают также по окрашиванию влажной красной лакмусовой бумажки в синий цвет.

4. Проба на фосфорную кислоту. К 2–3 мл отфильтрованного гидролизата в пробирке прилейте 1–2 мл молибденового реактива и нагрейте на водяной бане до 50–60 °С. Выпадает желтый осадок.

5. Открытие глицерина. К фильтрату добавьте по каплям 10%-ный раствор гидроксида натрия до нейтральной по лакмусу реакции и выпарьте досуха на водяной бане. К сухому остатку прибавьте несколько капель воды и пятикратное количество безводного гидросульфата калия. Нагревайте пробирку осторожно, но сильно (*в вытяжном шкафу*) до проявления белых густых паров. Отметьте (*осторожно!*) резкий раздражающий запах акролеина. У отверстия пробирки подержите фильтровальную бумагу, смоченную раствором фуксинсернистой кислоты. Появляется ярко розовое пятно. Реакция с фуксинсернистой кислотой является качественной реакцией на альдегиды, в данном случае на акролеин.

Опыт 5. Растворение и эмульгирование липидов икры

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; ацетон; бензол; хлороформ; диэтиловый эфир; этиловый спирт; яичный белок, 10%-ный раствор; гидроксид натрия, 10%-ный раствор; гидрокарбонат натрия, 10%-ный раствор; мыльный раствор, 10%; желчь.

Ход работы

В пять пробирок вносят по 3 капли растительного масла и затем добавляют по 10 капель: ацетона в первую пробирку, бензола во вторую пробирку, хлороформа в третью, диэтилового эфира в четвертую и этанола в пятую. Пробирки встряхивают и наблюдают за растворением жира в различных растворителях.

В шесть пробирок вносят по 2 капли растительного масла и по 3 капли дистиллированной воды. Затем добавляют по 4 капли: 1%-го раствора яичного белка в первую пробирку, 10 5-ного раствора КОН во вторую пробирку, 10%-го раствора NaHCO_3 в третью, 1%-го мыльного раствора в четвертую и желчи в пятую пробирку. Шестая пробирка служит для контроля. Пробирки встряхивают и наблюдается образование устойчивой эмульсии или расслоение.

В отчете результаты опыта оформляют в виде таблицы 4.

Таблица 4 –результаты опыта

Эмульгирование жиров						
Степень эмульгирования	Вода	Желчь	Белок	Мыло	Сода	Щелочь
Растворение жиров						
Степень растворения	Бензин	Бензол	Хлороформ	Диэтиловый эфир	Этанол	

б) Запишите ваши наблюдения для опыта.

в) Сформулируйте вывод.

г) Отчитайтесь перед преподавателем о проделанной работе: предъявите оформленный отчет по лабораторной работе и штатив с пробирками по каждому опыту.

Вопросы для подготовки к защите лабораторной работы

1. Приведите классификацию липидов.
2. Охарактеризуйте строение и биологическое значение фосфолипидов.
3. Напишите формулу и реакцию гидролиза α -лецитина.
4. В каких условиях можно провести его гидролиз?
5. Какими качественными реакциями можно открыть продукты гидролиза?

Учебная литература: [1, 2, 4, 7]

Тема «Изопреноиды»

Каротиноиды растительного и животного происхождения.

Выделение каротиноидов из растительного сырья, проведение качественных реакций, количественное определение каротиноидов

Цель работы – научиться выделять каротиноиды из растительного сырья, открывать особенности строения, количественно определять содержание каротиноидов в растительных и животных жирах.

Теоретический материал, необходимый для выполнения лабораторной работы.

Изопреноиды – соединения, углеродный скелет которых построен из изопреновых (изопентановых) фрагментов. К ним относится огромная группа природных соединений, чрезвычайно распространенных как в животном, так и в растительном мире. Изопреноиды обычно подразделяются на терпены (в том числе, терпеноиды), стероиды (стеролы и стериды) и каротиноиды. Одним из наиболее распространенных стеролов является холестерол, открытый впервые при исследовании желчных камней.

Из всех классов природных пигментов каротиноиды наиболее широко распространены и относятся к числу важнейших соединений живой природы. По современным представлениям все каротиноиды относятся к группе тетратерпенов и их производных. Тетратерпены представляют собой соединения, углеродный скелет которых состоит из изопреновых фрагментов. Присутствие большого количества (11 и более) двойных сопряженных связей придает каротиноидам высокую биологическую активность.

По современным представлениям каротиноиды относятся к наиболее сильным природным антиоксидантам, действующим в липидной фазе мембран. Они в большей мере, чем другие антиоксиданты, способны подавлять развитие перекисного окисления липидов, усиливающееся под влиянием различных стрессовых факторов. Их активность зависит от локализации и близости к субстрату, который они защищают. Встраиваясь в фосфолипиднобелковые структуры, в липопротеидные системы, они стабилизируют их, осуществляя антиоксидантную защиту одновременно с α -токоферолами. Интенсивность подавления свободнорадикального окисления липидов зависит также и от особенностей структуры разных видов каротиноидов. Помимо длины полиеновой цепочки, обладающей большим числом двойных связей, существенное значение имеют и кольцевые группы. По мере появления в структуре пигментов гидроксильных групп (лютеин, зеаксантин) и кетогрупп (кантаксантин) происходит увеличение антиоксидантной активности. Наибольшей активностью обладает астаксантин, в составе колец которого есть две группы: гидроксильная и кетогруппа.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

До проведения лабораторной работы:

а) сформулируйте цель каждого опыта;

- б) оформите проект отчета по лабораторной работе;
- в) напишите уравнения соответствующих реакций;
- г) предусмотрите место в проекте отчета для наблюдений и выводов.

В ходе выполнения лабораторной работы:

- а) проведите опыты.

Опыт 1. Выделение каротиноидов из цитрусовых

Оборудование: ступка с пестиком; штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: исследуемый материал; бромная вода; перманганат калия, 2%-ный раствор.

Ход анализа

1. Кусочек лимонной или апельсиновой корки размером 1 см² измельчить в ступке до однородной массы, перенести в пробирку 1 и добавить 3 мл дистиллированной воды.

2. Пробирку 1 закрыть пробкой с газоотводной трубкой, конец которой опустить в пробирку 2, помещенную в стакан с холодной водой. Жидкость в пробирке 1 осторожно кипятить, пока в пробирке 2 не соберется 1–2 мл бесцветного конденсата; отметить его характерный запах.

3. Половину конденсата поместить в пробирку 3 и добавить 1–2 капли раствора перманганата калия, в пробирку 2, к оставшейся части конденсата, прилить 1–2 капли бромной воды.

Опыт 2. Выделение каротиноидов из моркови

Оборудование: ступка с пестиком, штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: исследуемый материал, тетрахлорметан, 5%-ный раствор брома в тетрахлорометане.

Ход работы

1. Кусочек моркови размером с горошину измельчить в ступке до однородной массы, перенести в пробирку и добавить 10 капель тетрахлорометана. Для ускорения экстракции пробирку энергично встряхивать в течение 20–30 с, отметить изменение окраски экстрагента.

2. Полученный экстракт слить в другую пробирку и добавить в нее 1 каплю 5%-ного раствора брома в тетрахлорометане.

Опыт 3. Количественное определение каротиноидов в жирах и маслах

Метод основан на сравнении интенсивности окраски исследуемого и стандартного образцов.

Оборудование: фотоколориметр; спектрофотометр; мерные колбы.

Материалы и реактивы: кальмаровый жир или облепиховое масло; петролейный эфир; бензин; бихромат калия.

Приготовление раствора стандартного образца бихромата калия

0,3600 г (точная навеска) бихромата калия растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 1000 мл и доводят объем раствора дистиллированной водой до метки. Раствор по окраске соответствует раствору, содержащему 0,00208 мг Р-каротина в 1 мл.

Ход анализа

1) Навеску исследуемого образца 0,1 г растворить в петролейном эфире или бензине в мерной колбе на 100 мл и довести объем раствора тем же растворителем до метки.

2) Оптическую плотность полученного раствора измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 450 нм против контроля. В качестве контроля (раствора сравнения) используют растворитель.

3) Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца.

4) Содержание суммы каротиноидов в препарате (в пересчете на β-каротин) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 0,00208 \cdot 100}{D_1 \cdot a},$$

где X – содержание суммы каротиноидов в препарате, мг % (мг на 100 г); D – оптическая плотность испытуемого раствора; D₁ – оптическая плотность раствора стандартного образца; 0,00208 – количество β-каротина, в миллиграммах в растворе, соответствующем по окраске раствору стандартного образца бихромата калия; a – навеска препарата, г.

Тема «Стерины и стероиды животного происхождения»

Обнаружение холестерина в медицинской желче

Цель работы – научиться открывать холестерол в биологическом материале животного происхождения, провести качественные реакции.

Теоретический материал, необходимый для выполнения лабораторной работы

Стероиды и стериды широко распространены в растительных и животных организмах.

Одним из наиболее распространенных стеролов является холестерол, открытый при исследовании желчных камней. Желчные камни на 90% состоят из холестерина. Больше всего холестерина содержится в нервной ткани, особенно в белом веществе головного мозга. Высоким содержанием стеридов отличается ланолин – очищенный жир овечьей шерсти.

Особое же внимание к холестерину было привлечено, когда обнаружилось, что большая часть населения в той или иной степени больна атеросклерозом (поражением сосудов в результате отложения в них холестерина).

В чистом виде представляет собой мягкое белое вещество (жирные на ощупь жемчужные кристаллы в виде игл) без запаха и вкуса.

Это соединение обнаруживается в организме, как в виде свободного стерина, так и в форме сложного эфира с одной из длинноцепочечных жирных кислот. Сложные эфиры холестерина – стериды, в которых жирная кислота чаще всего представлена стеариновой, пальмитиновой или олеиновой. Свободный холестерол – компонент всех клеточных мембран и та основная форма, в которой он присутствует в большинстве тканей. Исключения представляют кора надпочечников, плазма и атероматозные бляшки, где преобладают эфиры холестерина.

Холестерол не растворим в воде, поэтому в организме его нельзя встретить в одиночестве, он передвигается с помощью различных белков. Комплексы, получающиеся в результате такого соединения, называются липопротеинами. Они имеют сферическую форму – внутри находится холестериновый эфир и триглицериды, а оболочка состоит из белка.

Около 80 % холестерина вырабатывается самим организмом (печенью, кишечником, почками, надпочечниками, половыми железами), 20 % поступает с пищей.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

До проведения лабораторной работы:

- а) сформулируйте цель каждого опыта;
- б) оформите проект отчета по лабораторной работе;
- в) напишите уравнения соответствующих реакций;
- г) предусмотрите место в проекте отчета для наблюдений и выводов.

В ходе выполнения лабораторной работы:

- а) проведите опыты.

Опыт 4. Качественные реакции на холестерол

Реакции сходны друг с другом по природе химических превращений. Под действием серной кислоты происходит дегидратация и окисление холестерина. В результате этого две молекулы холестерина, потерявшие две молекулы воды, соединяются между собой по третьему атому углерода, образуя вещества, соответствующие суммарным формулам $C_{54}H_{86}$ и $C_{54}H_{88}$

1. Реакция Шиффа

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: желчь медицинская, хлороформ, концентрированная серная кислота.

Ход работы

В пробирку внести 5 капель желчи и такое же количество хлороформа перемешать и осторожно добавить (подслоить) 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей появится кольцо красного цвета.

2. Реакция Сальковского

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: желчь медицинская, хлороформ, ледяная уксусная кислота.

Ход работы

После проведения реакции Шиффа жидкость осторожно встряхнуть, перемешивая содержимое пробирки. После отслаивания верхний слой жидкости окрасится в красный цвет, нижний будет иметь желто-оранжевую окраску с зеленой флуоресценцией (жидкость в проходящем свете прозрачна и желто-красного цвета, в отраженном свете кажется мутной с зеленым оттенком). Если к нижнему слою добавить ледяной уксусной кислоты, то жидкость станет розово-красной, флуоресценция сохраняется.

б) Запишите ваши наблюдения для каждого опыта;

в) Сформулируйте выводы для каждого опыта;

г) Отчитайтесь перед преподавателем о проделанной работе: предъявите оформленный отчет по лабораторной работе и штатив с пробирками по каждому опыту.

Вопросы для самостоятельной работы

1. На какие группы подразделяются изопреноиды?
2. Какой углевод положен в основу строения изопреноидов?
3. Тетратерпены, классификация, строение, нахождение в природе, роль в обмене.
4. Стероиды, строение, важнейшие представители.
5. Строение эфирных масел и методы их получения.
6. Горечи, классификация, строение, нахождение в природе.
7. Из какого соединения синтезируются различные классы изопреноидов в живых организмах?

Учебная литература: [1, 4, 5, 10]

Лабораторная работа № 5

Тема «Флавоноиды»

Выделение флавоноидов из цитрусовых, изучения строения с помощью качественных реакций. Количественное определение флавоноидов в напитках.

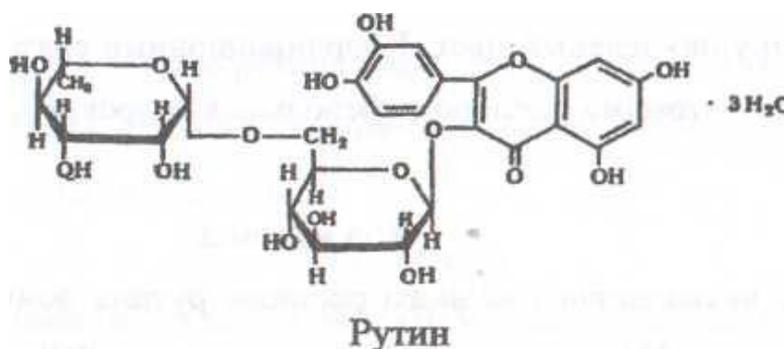
Цель работы – научиться выделять флавоноиды из растительного материала, с помощью качественных реакций открыть строения, количественно определить содержание флавоноидов в чае.

Теоретический материал, необходимый для выполнения лабораторной работы

К флавоноидам или биофлавоноидам относятся вещества Р-витаминного действия, которые уменьшают проницаемость и повышают прочность стенок кровеносных сосудов. Они угнетают активность холинэстеразы, сукцинатдегидрогеназы и некоторых других ферментов, а также задерживают окисление адреналина.

В основе строения веществ Р-витаминного действия лежит ядро флавонона. К ним относятся: рутин, эриодиктин, гесперидин, кверцетин и др.

Одним из наиболее активных соединений является рутин – гликозид флавонола кверцетина и дисахарида – рутинозы.



К группе Р-витаминного действия относят также антоцианидины, например, цианидин-агликон цианина, пигмента, широко распространенного в цветах и плодах некоторых высших растений. Витамины группы Р, выделенные из лимонов в кристаллическом виде, названы цитрином. Физиологически активными являются также катехины, содержащиеся в чае.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

До проведения лабораторной работы:

- а) сформулируйте цель каждого опыта;
- б) оформите проект отчета по лабораторной работе;
- в) напишите уравнения соответствующих реакций;
- г) предусмотрите место в проекте отчета для наблюдений и выводов.

В ходе выполнения лабораторной работы:

- а) проведите опыты.

Опыт 1. Выделение флавоноидов из растительного сырья

Оборудование: колбы на 25–30 мл с пробками; штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы: экстракт из цедры лимона, спиртовой, водный раствор рутина, этиловый спирт, 95%-ный.

Ход работы

Экстракт из цедры лимона, спиртовой (1 г сухого измельченного сырья цедры лимона поместить в колбу на 25–30 мл, добавить 10 мл 95%-ного раствора спирта, тщательно перемешать и нагреть на водяной бане до кипения. Затем колбу закрыть пробкой, содержимое колбы встряхнуть несколько раз и оставить на 3–4 ч, периодически перемешивая содержимое. Спиртовой экстракт слить в другую колбу и поставить в кипящую водяную баню, чтобы сконцентрировать его до 2 мл.

С концентрированным спиртовым и раствором рутина провести качественные реакции.

Опыт 2. Реакция с хлоридом железа (III)

Хлорид железа (III) образует с рутином комплексное соединение, окрашенное в изумрудно-зеленый цвет. Координационные связи возникают между ионами железа и атомами кислорода фенольных гидроксильных групп молекулы рутина.

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: экстракт из цедры лимона, спиртовой, водный раствор рутина, хлорид железа (III),

Ход работы

5 капель насыщенного водного раствора рутина поместить в пробирку, прибавить 2–3 капли 1%-ного раствора хлорида железа (III), проделать тоже со спиртовым раствором цедры лимона.

Возникает характерное окрашивание в образцах.

Опыт 3. Реакция с борной кислотой

Борная кислота взаимодействует со свободным гидроксильным в молекуле рутина с образованием соединения, окрашенного в желтый цвет. Подобную реакцию дают все флаванолы, содержащие в своей молекуле свободный гидроксил в 5-м положении.

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: экстракт из цедры лимона, спиртовой, водный раствор рутина, борная кислота.

Ход работы

5 капель раствора рутина поместить в пробирку, затем по каплям добавить борную кислоту до появления характерного окрашивания. Провести тоже со спиртовым раствором цедры лимона.

Опыт 4. Реакция с концентрированной серной кислотой

Концентрированная серная кислота с флавонами и флавонолами образует оксониевые (флавилиевые) соли, растворы которых характеризуются желтой окраской.

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: экстракт из цедры лимона, спиртовой, водный раствор рутина, серная кислота, концентрированная.

Ход работы

5–7 капель насыщенного водного раствора рутина поместить в пробирку, осторожно по стенке пробирки добавить 5 капель концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей возникает окрашенное кольцо. Прodelать тоже со спиртовым раствором цедры лимона.

Опыт 5. Реакция с Фелинговой жидкостью

При кислотном гидролизе рутина вначале отщепляется молекула рутинозы, которая далее распадается на глюкозу и рамнозу, обладающие свойством восстанавливать медь (II) в медь (I).

Оборудование: колба на 25–30 мл, штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы: рутин порошок, 0,5%-ный раствор соляной кислоты, 10%-ный раствор гидроксида натрия, реактив Фелинга.

Ход работы

0,5 г рутина поместить в колбу на 25–30 мл, добавить 5 мл 0,5%-ного раствора соляной кислоты. Смесь довести до кипения, кипятить в течение 1 мин, а затем профильтровать. 5 капель полученного фильтрата налить в пробирку, добавить 3 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия и 3 капли реактива Фелинга и снова нагреть до кипения. Выпадает осадок закиси меди (I).

Опыт 6. Восстановление рутина

При взаимодействии магния с концентрированной соляной кислотой выделяется водород, который восстанавливает хиноновую структуру молекулы рутина, при этом раствор окрашивается в красный цвет.

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: экстракт из цедры лимона, магниевый порошок, концентрированная соляная кислота.

Ход работы

2 капли насыщенного спиртового раствора рутина налить в пробирку, добавить кусочек магния (или в виде порошка на кончике скальпеля) и 1–2 капли концентрированной соляной кислоты; появляется характерное окрашивание.

Опыт 7. Количественное определение флавоноидных соединений с Р-витаминной активностью

Количественное определение рутина основано на его способности окисляться перманганатом калия. В качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом после того, как окислится весь рутин. Экспериментально установлено, что 1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия окисляет 6,4 мкг рутина.

Оборудование: конические колбы на 50 мл (2 шт.), пипетка градуированная на 10 мл, цилиндр мерный на 50 мл, бюретка на 25 мл, колба мерная на 1000 мл, ступка фарфоровая с пестиком.

Материалы и реактивы: чай, листовой; перманганат калия, 0,01н. раствор; индигокармин, раствор (1г индигокармина растереть в фарфоровой ступке, перенести в мерную колбу на 1000 мл, добавить 50 мл концентрированной серной кислоты и осторожно довести объем дистиллированной водой до метки, отфильтровать и хранить в темной склянке; срок годности 7–10 дней).

Ход анализа

1. 0,1 г чая поместить в колбу, прилить 50 мл горячей дистиллированной воды и провести экстракцию в течение 5 мин.

2. 10 мл экстракта чая отмерить в коническую колбу, добавить 10 мл дистиллированной воды и 10 капель индигокармина.

3. Титровать 0,05н. раствором перманганата калия до появления устойчивой желтой окраски.

4. Содержание рутина в чае определить по формуле:

$$X = \frac{3,2 \cdot A \cdot 50 \cdot 100}{10 \cdot 0,1 \cdot 1000},$$

где X – содержание витамина Р, мг%; А – количество 0,01 н. раствора перманганата калия, пошедшее на титрование, мл; 0,1 – количество сухого вещества, взятого для анализа, г; 10 – количество экстракта, взятое для титрования, мл; 50 – количество воды, добавленное к сухому веществу для экстракции, т.е. общее количество вытяжки, мл; 100 – для перевода расчета процентного содержания; 1000 – для перевода мкг в мг.

б) Запишите ваши наблюдения для каждого опыта.

в) Сформулируйте выводы для каждого опыта.

г) Отчитайтесь перед преподавателем о проделанной работе: предъявите оформленный отчет по лабораторной работе и штатив с пробирками по каждому опыту.

Вопросы для самостоятельной работы

1. На какие группы подразделяются флавоноиды?
2. Какие группы ответственны за изменение цвета плодов при консервировании?
3. Какие антоцианы относят к группе полимерных соединений?
4. Какие химические свойства флавоноидов обуславливают пирановый и пирановый циклы?
5. Объясните участие флавоноидов в окислительно-восстановительных реакциях гомолитического типа?
6. Пути биосинтеза флавоноидов в растениях?
7. Место локализации флавоноидов в клетке?

Учебная литература: [4, 5, 10, 11]

Лабораторная работа № 6

Тема «Алкалоиды»

Выделение никотина из табака открытие его состава с помощью качественных реакций.

Цель работы – научиться получать раствор никотина из табака, убедиться в основных свойствах никотина с помощью качественных реакций.

Теоретический материал, необходимый для выполнения лабораторной работы.

В переводе термин «алкалоид» (от араб. "alkali" – щелочь и греч. "eidos" – подобный) означает щелочноподобный. Одной из общих черт, присущих почти всем алкалоидам, является наличие в их структуре третичного атома азота, обуславливающего основные свойства, что нашло отражение в их групповом названии (от араб. alqali – щелочь). К настоящему времени выделено свыше 10000 алкалоидов разнообразных структурных типов, что превышает число известных соединений любого другого класса природных веществ.

Две обычно используемые системы классифицируют алкалоиды по родам растений (ботаническая классификация), в которых они встречаются, или на основании сходства молекулярной структуры (химическая классификация). Классы алкалоидов, члены которых объединены по источнику выделения – это алкалоиды аконита, аспидоспермы, хинного дерева, спорыньи, эфедры, ибоги, ипекакуаны, люпина, опийного мака, раувольфии, крестовника, картофеля, стрихноса и иохимбе.

Химическая классификация основана на особенностях молекулярного азотно-углеродного скелета, общих для членов данной группы алкалоидов. Важнейшим структурным фрагментом большинства алкалоидов служит какой-либо **азотсодержащий гетероцикл**. Именно этот признак положен в основу химической классификации алкалоидов, по которой они подразделяются на группы в соответствии с типом азотсодержащего гетероцикла в их структуре, например пиридина, хинолина и т. д. Такие алкалоиды имеют единство в своем биогенетическом происхождении от аминокислот, и их называют истинными алкалоидами.

Наряду с этим имеются алкалоиды, у которых атом азота не включен в какую-либо гетероциклическую структуру. Эти алкалоиды представляют собой растительные амины и их относят к протоалкалоидам.

Главные структурные классы включают пиридиновые (никотин), пиперидиновые (лобелин), тропановые (гиосциамин), хинолиновые (хинин), изохинолиновые (морфин), индольные (псилоцибин, активное начало мексиканских галлюциногенных грибов, резерпин и стрихнин), имидазольные (пилокарпин), стероидные (томатидин из томатов),

дитерпеноидные (аконитин), пуриновые (кофеин из чая и кофе, теофиллин из чая и теобромин из чая и какао) алкалоиды.

Задание и этапы проведения лабораторной работы

До проведения лабораторной работы:

- а) сформулируйте цель каждого опыта;
- б) оформите проект отчета по лабораторной работе;
- в) напишите уравнения соответствующих реакций;
- г) предусмотрите место в проекте отчета для наблюдений и выводов.

В ходе выполнения лабораторной работы:

- а) проведите опыты.

Опыт № 1. Получение раствора никотина из табака

Содержание в листьях табака никотина в виде соли с лимонной кислотой достигает 8 %.

Оборудование: штатив с пробирками; колба Вюрца на 100 мл; термометр; холодильник воздушный; аллонж; колба-приемник на 100 мл; баня песчаная; ступка фарфоровая с пестиком; предметное стекло.

Материалы и реактивы: табак, махорка, известь.

Ход работы

1. Собрать прибор для отгонки никотина и проверить его на герметичность.

2. В фарфоровую ступку поместить 5 г табака или махорки, добавить 1 г извести и 2 мл воды, затем тщательно растереть до однородной кашицы.

3. Полученную кашицу перенести в колбу Вюрца, добавить 35–40 мл воды и отогнать в приемник 15–20 мл жидкости. Отметьте характерный запах отогнанного раствора (запах никотина).

4. Раствор никотина из приемной колбы использовать для проведения опытов 2 и 3.

Опыт 2. Открытие основных свойств никотина

Оборудование: штатив с пробирками; колба Вюрца на 100 мл; термометр; холодильник воздушный; аллонж; колба-приемник на 100 мл; баня песчаная; ступка фарфоровая с пестиком; предметное стекло.

Материалы и реактивы: раствор никотина, фенолфталеин, 1%-ный спиртовой раствор.

Ход работы

В пробирку налить 2–3 капли раствора никотина, полученного в опыте 1, добавить 1 каплю 1%-ного спиртового раствора фенолфталеина. Происходит изменение окраски индикатора.

Объясните результат.

Опыт 3. Качественные реакции на никотин

Оборудование: штатив с пробирками; колба Вюрца на 100 мл; термометр; холодильник воздушный; аллонж; колба-приемник на 100 мл; баня песчаная; ступка фарфоровая с пестиком; предметное стекло.

Материалы и реактивы: табак, махорка; известь; фенолфталеин, 1%-ный спиртовой раствор; раствор йода в йодиде калия; пикриновая кислота, насыщенный раствор; таннин, 5%-ный раствор.

Ход работы

1. На предметное стекло нанести с помощью пипетки трижды по 1 капле водного раствора никотина, полученного в опыте 1.

2. Добавить к первой капле – 1 каплю раствора йода в йодиде калия, ко второй капле – 1 каплю 5%-ного раствора танина, к третьей – 1 каплю насыщенного раствора пикриновой кислоты. В местах соприкосновения капель появляются кристаллы, имеющие характерную окраску.

3. Рассмотреть кристаллы под микроскопом и объяснить результаты опыта:

б) Запишите ваши наблюдения для каждого опыта.

в) Сформулируйте выводы для каждого опыта.

г) Отчитайтесь перед преподавателем о проделанной работе: предъявите оформленный отчет по лабораторной работе и штатив с пробирками по каждому опыту.

Вопросы для самостоятельной работы

1. На какие группы подразделяют алкалоиды?

2. Какие отличия существуют между истинными алкалоидами, протоалкалоидами и псевдоалкалоидами?

3. Производным какого гетероцикла является морфин?

4. Какие алкалоиды находят применение в пищевой технологии и сельском хозяйстве?

Учебная литература: [4, 5, 10, 11]

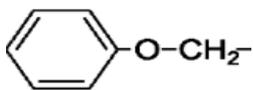
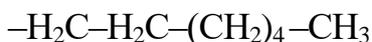
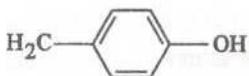
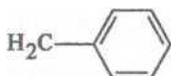
Тема «Антибиотики»

Изучение строения, физико-химических свойств

Цель работы – научиться определять строение и физико-химические свойства некоторых групп антибиотиков.

Теоретический материал, необходимый для выполнения лабораторной работы

Антибиотики (от лат. «анти» – против, «биос» – жизнь) – биологически активные вещества, продуцируемые микроорганизмами и обладающие антимикробным действием, или специфические продукты жизнедеятельности некоторых микробов, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (вирусам, бактериям, актиномицетам, грибам, водорослям и т.д.), избирательно задерживая их рост или полностью подавляя их развитие.



пентдиенилпенициллин - пенициллин F

бензилпенициллин - пенициллин Δ^2

p-оксибензилпенициллин - пенициллин X

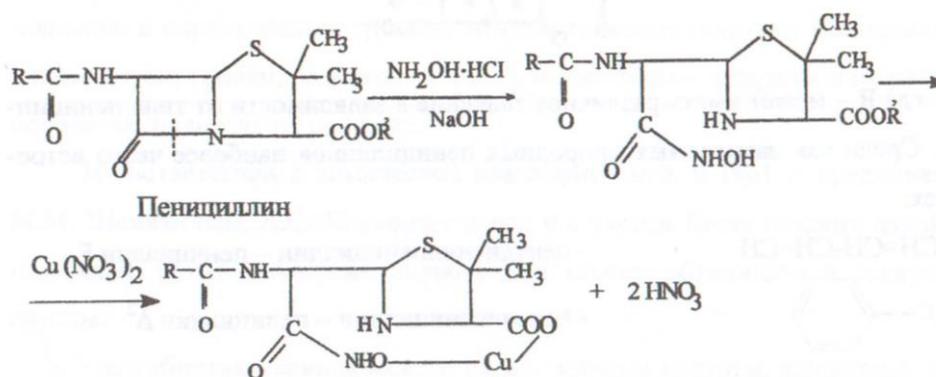
гептилпенициллин - пенициллин K

феноксиметилпенициллин - пенициллин V

По физическим свойствам препараты пенициллина представляют собой белые мелкокристаллические вещества горького вкуса. Они легко разрушаются под действием щелочей и окислителей, при нагревании в водных растворах, а также при действии фермента пенициллиназы.

Кроме природных пенициллинов существуют и синтетические (полусинтетические) антибиотики этого ряда. Они обладают высокой устойчивостью к действию кислот, пенициллиназы, и действуют на более широкий круг микроорганизмов, чем природные. К ним относятся метициллин (R - остаток диметоксифенилкарбоновой кислоты), оксациллин (R - остаток 5-метил-3-фенилизоксазол-4-карбоновой кислоты) и ампициллин (R - остаток аминофенилуксусной кислоты).

Реакция основана на способности пенициллинов образовывать окрашенные гидроксаматы с солями тяжелых металлов, после щелочного гидролиза лактамного кольца.



Опыт 1. Реакция пенициллинов с солями тяжелых металлов

Реакция основана на способности пенициллинов образовывать окрашенные гидроксаматы с солями тяжелых металлов, после щелочного гидролиза лактамного кольца.

Оборудование: штатив с пробирками, фарфоровая чашка.

Материалы и реактивы: препарат пенициллина, кристаллический (калиевая соль бензилпенициллина, феноксиметилпенициллин и др.); реактив I (1 мл 1н. раствора гидросиламин гидрохлорида поместить в пробирку,

добавить 0,3 мл 1 н. раствора гидроксида натрия и перемешать); уксусная кислота, 1н. раствор; нитрат меди, 1%-ный раствор; хлорид железа (III), 1%-ный раствор.

Ход работы

1. Несколько кристаллов препарата пенициллина поместить в две пробирки.

2. В каждую из пробирок прибавить одну каплю реактива I.

3. Через 2–3 мин к смеси в обеих пробирках прибавить одну каплю 1н. раствора уксусной кислоты. Растворы тщательно перемешать.

4. В первую пробирку прибавить одну каплю раствора нитрата меди. Выпадает осадок зеленого цвета.

5. Во вторую пробирку прибавить одну каплю раствора хлорида железа. Выпадает красный осадок.

Опыт 2. Качественная реакция на бензилпенициллин

Оборудование: штатив с пробирками, фарфоровая чашка.

Материалы и реактивы: препарат бензилпенициллина; гидроксид натрия, 1 н. раствор; нитропруссид натрия, 5%-ный раствор.

Ход работы

1. 0,5 мл раствора бензилпенициллина (калиевая или натриевая соль) поместить в фарфоровую чашку, прибавить 3–4 капли раствора едкого натра и выпарить раствор над пламенем горелки.

2. Сухой остаток осторожно нагреть до появления красноватого окрашивания.

3. Чашку охладить и к полученному сухому остатку прибавить 1–2 капли 5%-ного раствора нитропруссида натрия. Появляется быстро исчезающее красно-фиолетовое окрашивание.

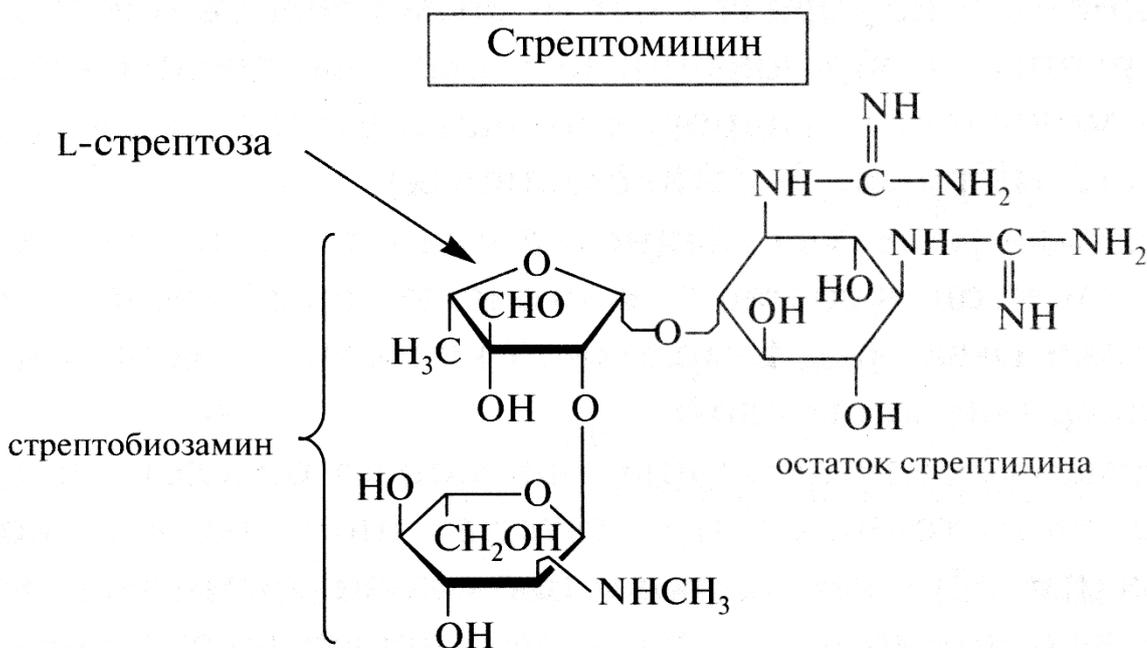
Качественные реакции на антибиотики, производные аминогликозидов

Эта группа антибиотиков объединяет биологически активные соединения, содержащие в молекулах гликозидные связи. К ним относятся стрептомицины, неомицины, канамицины и др.

Наиболее важной группой веществ из этого класса являются стрептомицины – группа химических соединений, близких по своему строению.

Стрептомицин представляет собой сильное органическое основание, что обусловлено наличием в молекуле трех группировок: двух гуанидиновых остатков и N-метильной n-группы сахарного компонента молекулы. Растворы стрептомицина характеризуются сильнощелочной реакцией среды (pH 12,0).

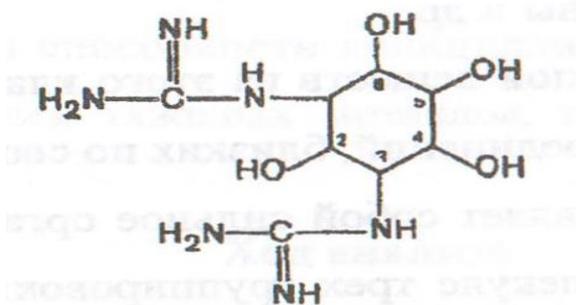
Отличаются они только характером сахарного компонента молекулы. Так, в стрептомицине стрептидин связан гликозидной связью с дисахаридом – стрептобиозамином, состоящим из L-стрептозы и N-метил-L-глюкозамина.



Наличие в молекуле стрептомицина большого количества гидроксильных и аминных групп обуславливают его высокую гидрофильность (растворимость в воде) и способность образовывать с солями некоторых двухвалентных металлов комплексные соединения.

Являясь основанием, стрептомицин легко образует соли с минеральными и органическими кислотами. Эти соли гигроскопичны и легко растворяются в органических растворителях.

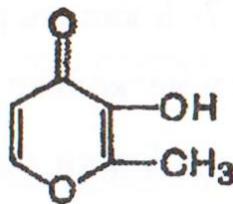
Все стрептомицины при кислотном и щелочном гидролизе выделяют соответствующий сахарный компонент и стрептидин, представляющий 1,3-дигуанидино-2,4,5,6-тетраоксициклогексан:



Стрептидин является общей частью молекулы для всех стрептомицинов.

Опыт 3. Реакция образования мальтола

При щелочном гидролизе стрептомицина образуется мальтол (α -метил- β -окси- γ -пирон), который с солями железа (III) дает окрашивание от красного до фиолетового цвета, являющееся качественной реакцией на стрептомицин.



Мальтол

Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы, стрептомицин сульфат, раствор; гидроксид натрия, 2 н. раствор; серная кислота, 2 н. раствор; хлорид железа (III), 1%-ный раствор; жидкость Фелинга.

Ход работы

В пробирку поместить 5–6 капель раствора стрептомицина, добавить 2–3 капли раствора едкого натра и нагревать на водяной бане в течение 3 мин. Затем пробирку охладить под струей воды и добавить 2–3 капли раствора серной кислоты и 2–3 капли раствора хлорида железа.

Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Опыт 4. Реакция с реактивом Фелинга

Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы, стрептомицин сульфат, раствор; реактив Фелинга.

Ход работы

В пробирку поместить 5–6 капель раствора стрептомицина, добавить 1 каплю реактива Фелинга. Пробирку нагреть на водяной бане.

Образуется осадок закиси меди.

Опыт 5. Реакция Сакагучи

Качественная реакция основана на том, что при взаимодействии α -нафтола в присутствии окислителя с гуанидиновыми группировками стрептидина молекулы стрептомицина появляется фиолетово-красное окрашивание.

Оборудование: штатив с пробирками; водяная баня.

Материалы и реактивы, стрептомицин сульфат, раствор; гидроксид натрия, 2 н. раствор; спиртовой раствор α -нафтола, 0,2% ный раствор.

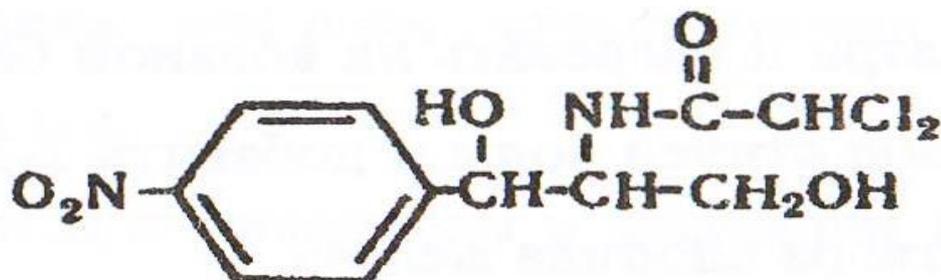
Ход работы

В пробирку поместить 7–8 капель раствора стрептомицина, добавить 2–3 капли раствора едкого натра и несколько капель 0,2%-ного спиртового раствора α -нафтола. Содержимое пробирки перемешать, затем прилить 5–6 капель раствора гипобромита натрия. Раствор вновь перемешать.

Развивается фиолетово-красное окрашивание.

Качественные реакции на антибиотики, производные ароматического ряда

Антибиотики, относящиеся к этой группе, являются производными бензола. Одним из представителей таких антибиотиков является хлорамфеникол - природный антибиотик и его синтетический аналог левомицетин (D-(-)-Трео-1-п-уитрофенил-2-дихлорацетиламинопропандиол-1,3):

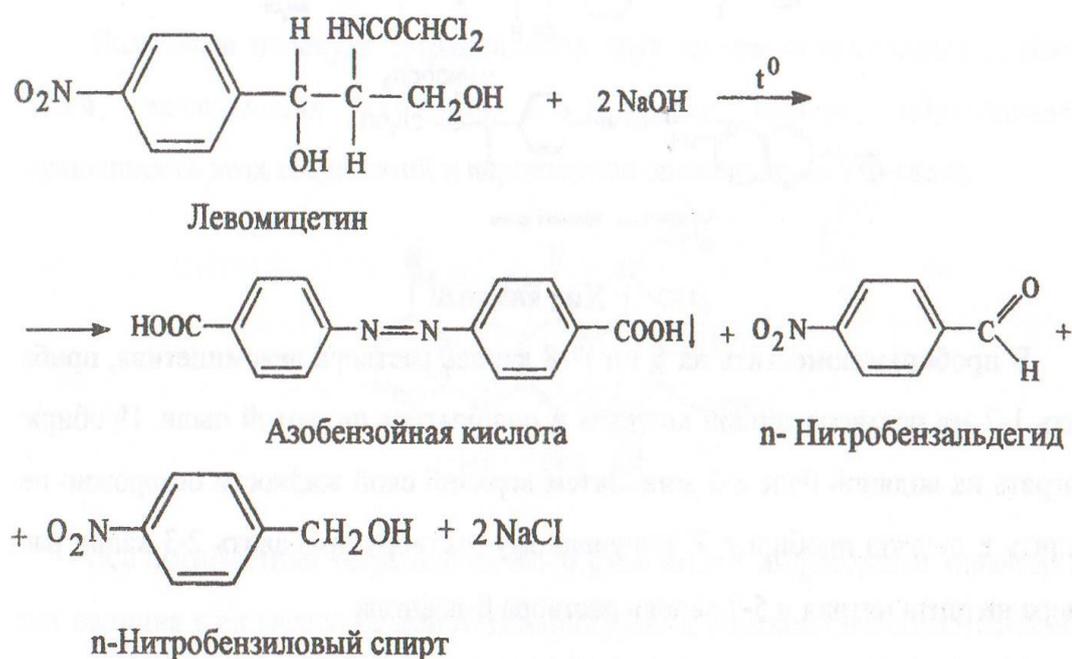


Левомецетин является производным п-замещенного нитробензола, а при его гидролизе образуется соединение, содержащее аминогруппу – основание хлорамфеникола (I) и дихлоруксусная кислота (II).

Левомецетин представляет собой белый или белый со слабым желтовато-зеленоватым оттенком кристаллический порошок без запаха, горького вкуса. Он мало растворим в воде, легко растворим в 95%-ном спирте, растворим в этилацетате, практически не растворим в хлороформе.

Опыт 6. Реакция азосочетания

Качественная реакция основана на том, что при нагревании левомецетина с гидроксидом натрия образуется азобензойная кислота, при дальнейшем нагревании - п-нитробензиловый спирт:



Оборудование: штатив с пробирками; баня водяная.

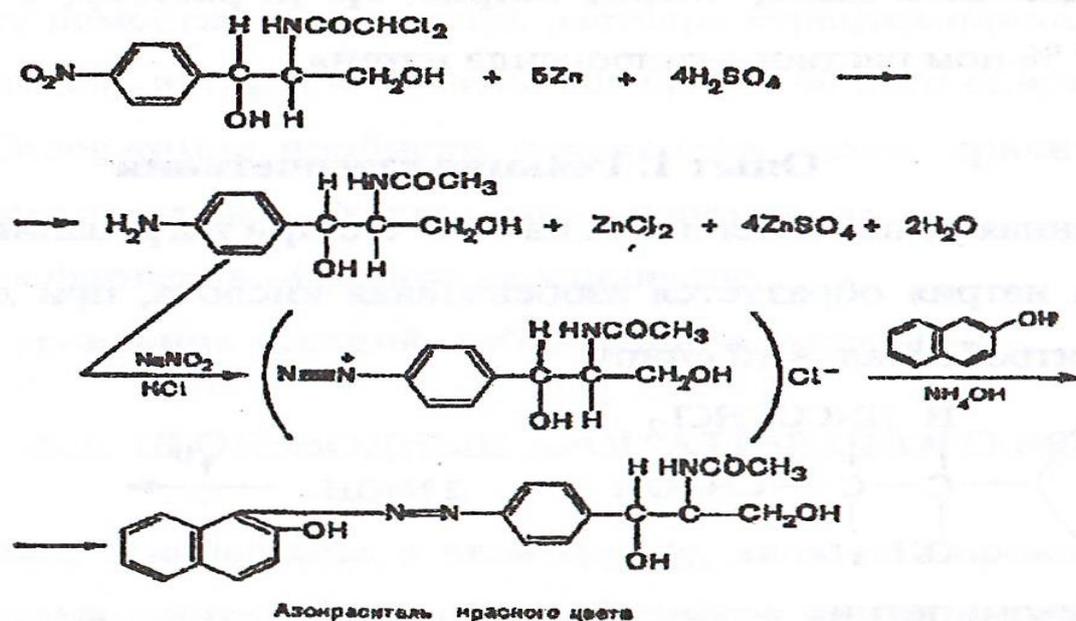
Материалы и реактивы: левомецетин (препарат в таблетках или порошке); натрий гидроксид, 2 н. раствор.

Ход работы

В пробирку насыпать пол шпателя препарата левомецетина, прибавить 5-8 капель раствора едкого натра и нагреть на водяной бане. Появляется желтое окрашивание, переходящее при дальнейшем нагревании в красно-оранжевое. При кипячении этого раствора окраска усиливается, выделяется кирпично-красный осадок азобензойной кислоты и появляется запах п-нитробензальдегида.

Опыт 7. Восстановление левомецетина до аминапроизводного

Качественная реакция основана на том, что при реакции цинковой пыли серной кислотой выделяющийся атомарный водород восстанавливает нитрогруппу в левомецетине до аминогруппы. Полученное соединение, вступая в реакцию с нитритом натрия и β-нафтолом, образует азокраситель красного цвета:



Оборудование: штатив с пробирками; баня водяная.

Материалы и реактивы: раствор левомецетина; серная кислота, 2 н. раствор; цинковая пыль; нитрит натрия, 0,1 н. раствор; 1%-ный раствор β-нафтола в 10%-ном растворе гидроксида натрия.

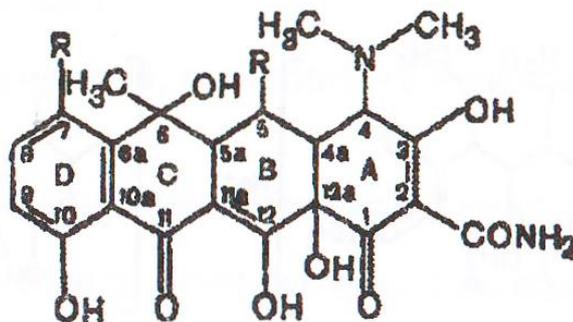
Ход работы

В пробирку поместить на 5 мл 7-8 капель раствора левомецетина, прибавить 1-2 мл раствора серной кислоты и полшпателя цинковой пыли. Пробирку нагреть на водяной бане 2-3 мин. Затем верхний слой жидкости осторожно перелить в другую пробирку. К полученному раствору прибавить 2-3 капли раствора нитрита натрия и 5-7 капель раствора β-нафтола. Мгновенно развивается розово-красное окрашивание.

Качественные реакции на тетрациклины

Антибиотики тетрациклинового ряда имеют близкое химическое строение и занимают ведущее место среди антибиотиков широкого спектра действия, имеющих относительно низкую токсичность.

В основе химической структуры тетрациклиновых антибиотиков лежит гидронафтацен – конденсированная система из четырех частично гидрированных бензольных колец. Различаются эти антибиотики лишь характером заместителя в положениях 5 и 7:

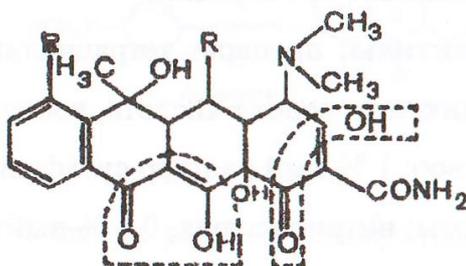


$R = Cl$ $R' = H$ Хлортетрациклин (биомицин, ауреомицин)

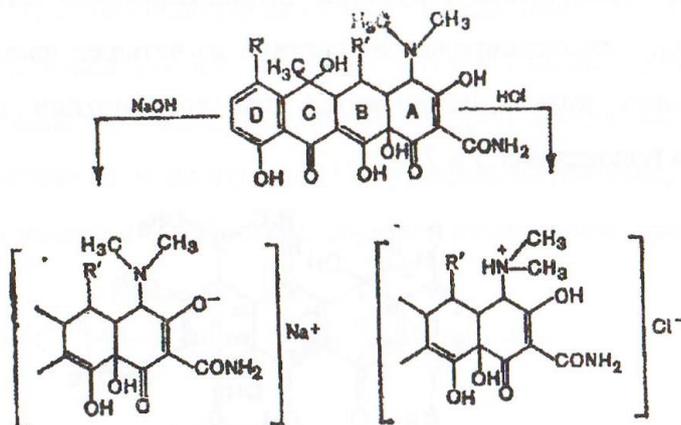
$R = H$ $R' = OH$ Окситетрациклин (террамицин)

$R = H$ $R' = H$ Тетрациклин

Наличие в молекуле тетрациклинов двух систем сопряженных двойных связей, включающих кетонные и енольные группы, обуславливает окрашенность этих соединений и характерное поглощение в УФ-свете.



Все антибиотики тетрациклинового ряда имеют амфотерный характер за счет наличия в их молекуле диметиламиногруппы, обуславливающей основные свойства, и фенольного гидроксила в кольце Д и енольных групп, обуславливающих кислотные свойства. При этом наиболее сильные кислотные свойства проявляет енольная группа в положении 3. Являясь амфотерными веществами, тетрациклины растворяются как в кислотах, так и в щелочах с образованием солей.



Препараты тетрациклинов представляют собой кристаллические желтые вещества без запаха, с горьким вкусом, которые мало растворимы в воде и спирте.

Опыт 8. Образование ангидротетрациклинов

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: препарат тетрациклина (в порошке или в таблетках); раствор тетрациклина; серная кислота, концентрированная.

Ход работы

В пробирку насыпать полшпателя препарата тетрациклина, прибавить 8–10 капель концентрированной серной кислоты. Появляется фиолетовое (в случае тетрациклина) или красное (в случае окситетрациклина) окрашивание. Затем прибавить 5 капель воды; окраска становится темно-желтой.

Опыт 9. Открытие фенольного гидроксила в молекуле тетрациклина

Оборудование: штатив с пробирками.

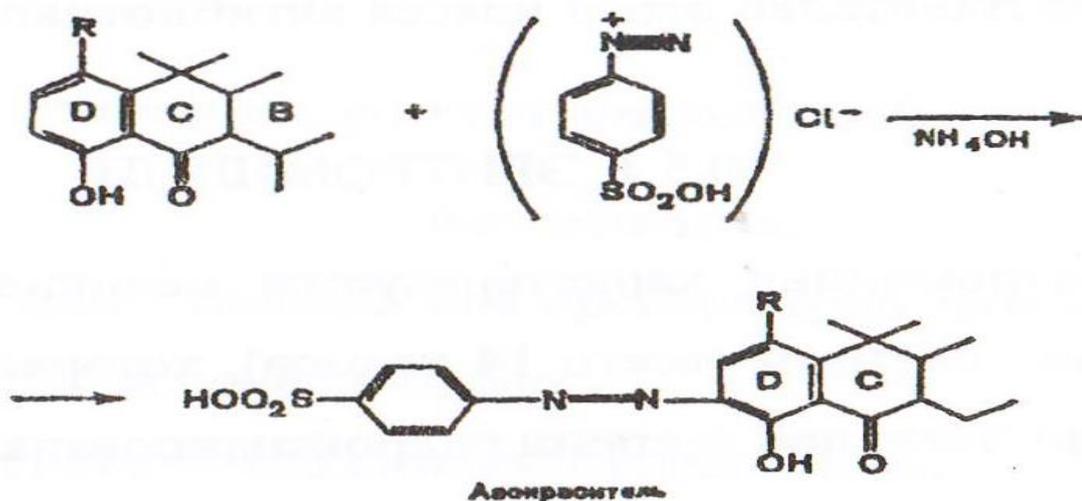
Материалы и реактивы: препарат тетрациклина (в порошке или в таблетках); раствор тетрациклина; хлорид железа (III), 1%-ный раствор.

Ход работы

В пробирку налить 5–6 капель раствора тетрациклина и прибавить 1 каплю раствора хлорида железа (III). Раствор немедленно окрашивается в коричневый или красно-коричневый цвет.

Опыт 10. Реакция азосочетания с солями диазония

Качественная реакция основана на том, что тетрациклин вступает в реакцию азосочетания с солями диазония с образованием азокрасителя интенсивно-красной окраски:



Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: препарат тетрациклина (в порошке или в таблетках); раствор тетрациклина; 1%-ный раствор сульфаниловой кислоты в 5%-ном растворе соляной кислоты; нитрит натрия, 0,5%-ный раствор; карбонат натрия, 10%-ный раствор.

Ход работы

В пробирку налить 5–6 капель раствора сульфаниловой кислоты и 10 капель раствора нитрита натрия. Содержимое пробирки тщательно перемешать и прибавить 5 капель раствора тетрациклина. После перемешивания добавить к раствору 3–4 капли раствора карбоната натрия.

Развивается интенсивно-красная окраска.

Качественные реакции на макролидные антибиотики

Антибиотики этой группы представлены природными соединениями, имеющими структуру макроцикла с обязательным сложноэфирным фрагментом (т.е. макроциклические лактоны). Размер цикла может колебаться от 8 до 38 атомов в цикле. Как правило, цикл связан с остатками моно- и дисахаридов.

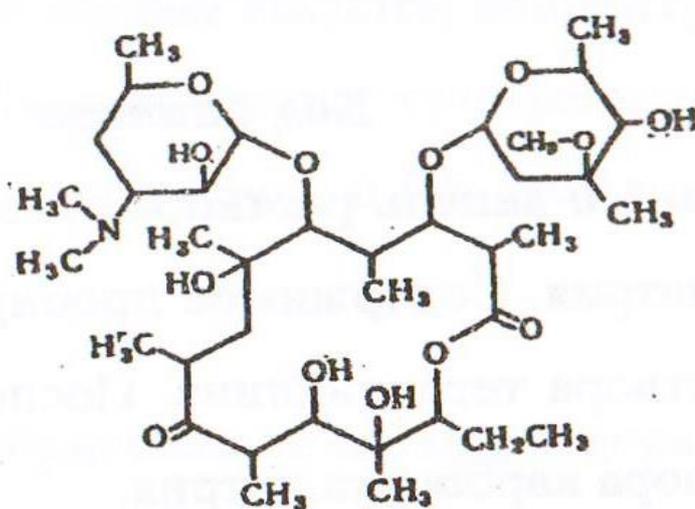
Особенностью химических свойств макролидных антибиотиков можно считать высокую стабильность к щелочному гидролизу, не свойственному для обычных лактонов.

Продуцируются антибиотики этой группы, как правило, актиномицетами и стрептомицетами. Ввиду сложности их химической структуры синтетически эти вещества не получают, вместо этого химически модифицируют природные субстанции, образующие таким образом полусинтетические макролиды.

Активность макролидных антибиотиков определяется механизмом ингибирования белкового синтеза в микроорганизмах. При этом они характеризуются достаточно низкой токсичностью.

Одним из представителей этого класса антибиотиков является эритромицин.

Молекула эритромицина характеризуется наличием сравнительно небольшой циклической системы (всего 14 атомов), которая не содержит олефиновых связей, но в достаточной степени гидроксильрована:



Эритромицин является органическим основанием, продуцируемым *Streptomyces erythreus* или другими родственными организмами и обладающим антимикробным действием.

Известно несколько природных эритромицинов: А, В, С, которые различаются характером заместителей в цикле, а также ряд полусинтетических производных эритромицина (кларитромицин, диритромицин).

Препарат эритромицина представляет собой гигроскопичный кристаллический порошок белого цвета без запаха, горького вкуса. Антибиотик мало растворим в воде, легко растворим в этиловом и метиловом спиртах и ацетоне, хлороформе.

Опыт 11. Реакция с концентрированной серной кислотой

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: препарат эритромицина, порошок; серная кислота, концентрированная.

Ход работы

В пробирку насыпать полшпателя препарата эритромицина и прибавить 5 капель концентрированной серной кислоты.

Появляется красновато-коричневое окрашивание.

Опыт 12. Реакция с концентрированной соляной кислотой

Оборудование: штатив с пробирками.

Материалы и реактивы: препарат эритромицина, порошок; ацетон; соляная кислота, концентрированная; хлороформ.

Ход работы

В пробирку насыпать полшпателя препарата эритромицина и добавить 5 капель ацетона. Содержимое пробирки перемешать до полного растворения

препарата антибиотика. Затем прибавить 4-5 капель концентрированной соляной кислоты. Немедленно появляется оранжевое окрашивание, переходящее в красное, а затем в интенсивно фиолетово-красное.

К полученной смеси прибавить 2-3 капли хлороформа и взболтать. Верхний слой хлороформа окрашивается в фиолетовый цвет.

Вопросы для самостоятельной работы

1. Объясните на чем основана классификация антибиотиков?
2. Каким механизмом действия обладает тетрациклин?
3. Какую стадию синтеза белков ингибирует стрептомицин?
4. На чем основан биологический эффект действия грамицидинов?
5. Продуцентами каких антибиотиков являются морские губки?

Учебная литература: [5, 10, 11]

Лабораторная работа № 7 **Тема «Методы исследований БАВ»**

Выделение терпенов из янтаря и идентификация их. Очистка янтарной кислоты

Цель работы – Научиться выделять терпены из янтаря и идентифицировать их с помощью качественных реакций, а также очищать янтарную кислоту, выделенную из янтаря, методом кристаллизации.

Теоретический материал, необходимый для выполнения лабораторной работы.

Янтарь – это затвердевшая ископаемая смола хвойных деревьев, образовался, в основном, в палеогене 40 млн. лет назад. Стеклообразное вещество с широким диапазоном окрасок: желтый, оранжевый, красный, коричневый, зеленоватый, голубоватый, и черный цвета. Преимущественно варьируют в пределах от зеленовато-желтой, желто-оранжевой, оранжево-красной до красно-коричневой. Чаще всего имеет форму уплощенных и удлиненных выделений, не поддающихся генетической интерпретации, встречаются в виде капель, сосулков, натеков, куски янтаря с поперечным сечением серповидной, линзовидной и клиновидной формы, несущие на себе более или менее четкие отпечатки древесины.

Температура размягчения приблизительно 150 °С, температура плавления лежит в диапазоне 250–450 °С, плотность 1,05–1,10 г/см³, твердость по шкале Мооса 2–2,5, излом раковистый; не растворяется в воде, растворяется в ароматических углеводородах, скипидаре. При трении электризуется. Иногда содержит включения насекомых или остатки растений. Находит применение при изготовлении колец, серег, бус, в камнерезном искусстве. Химические продукты из янтаря применяются для

изготовления лаков, эмалей, красителей, медикаментов, реактивов и для других целей. Янтарь встречается во многих странах, таких как Румыния, Сицилия, Бирма, но наиболее значительные места распространения находятся России в прибрежной части Балтийского моря.

На территории Калининградской области расположены залежи янтаря, имеющие всемирную известность, здесь в недрах земли сконцентрировано более 90% всех мировых запасов янтаря.

Одно из таких богатых месторождений разрабатывается в поселке Янтарный – Янтарным комбинатом, который с 2013 года акционерное общество, входящее в состав Государственной корпорации РОСТЕХ

Добыча ведется открытым способом в Приморском карьере – самом большом янтарном карьере в мире. Ежегодно Янтарный комбинат добывает в среднем 500 т сырья. Суммарный объем запасов на Приморском Пальмникенском месторождениях оценивается в 116 тыс. т.

Балтийский янтарь – это высокомолекулярное соединение органических кислот, содержащее в среднем 79 % углерода, 10,5 % водорода, 10,5 % кислорода. Его формула $C_{10}H_{16}O_4$. В янтаре находится 81 г углерода, 7,3 г водорода, 6,34 г кислорода, немного серы, азота и минеральных веществ. В балтийском янтаре в виде примесей (от следов до 3 %) обнаружено 24 химических элемента.

Балтийский янтарь Приморского месторождения классифицируется. По стандартам Калининградского янтарного комбината он может быть:

натуральный – янтарь, подвергшийся только механической обработке без каких-либо изменений его природных форм;

модифицированный – янтарь, подвергшийся только термической обработке или высоким давлением, изменил свои физические свойства, в том числе степень прозрачности и цвет;

уникальный – куски янтаря весом не менее 1000 г всех цветов и оттенков, свойственных природному янтарю;

сувенирный (пейзажный) – янтарь матового и полуматового цвета с фигурными разнотонными разводами, куски янтаря цвета слоновой кости;

матовый – янтарь, не пропускающий свет из-за большого скопления пузырьков воздуха, имеет непрозрачный равномерный цвет от медового до оранжевого цвета, разной степени однородности;

прозрачный – янтарь любых желтых тонов, прозрачной, стекловидной структуры, пропускающей световые лучи;

сортированный – янтарь, разделанный на виды с определенными весовыми и качественными характеристиками;

несортированный – янтарь, очищенный от песчано-глинистой породы и других примесей, промытый, высушенный, полностью или частично покрытый окисленной корочкой;

янтарь лак черный – куски янтаря, содержащие в неограниченном количестве включения органического и неорганического происхождения;

янтарь некондиционный – отсеv янтаря крупностью менее 4 мм, получаемый в результате грохочения;

фракции янтаря – размерная или весовая характеристика янтаря;

сортность – наличие и количественное содержание включений, трещин, раковин;

слоистый (янтарь инклюд) – янтарь, состоящий из нескольких слоёв, содержащий грязевые включения, включения флоры и фауны, редкие инклюдзы, с внутренним содержанием капелек воды.

До проведения лабораторной работы:

- а) сформулируйте цель каждого опыта;
- б) оформите проект отчета по лабораторной работе;
- в) напишите уравнения соответствующих реакций;
- г) предусмотрите место в проекте отчета для наблюдений и выводов.

В ходе выполнения лабораторной работы:

- а) проведите опыты.

Опыт. 1. Обнаружение терпенов в балтийском янтаре

Качественная реакция основана на окислении непредельных связей терпенов, присутствующих в янтаре, перманганатом калия.

Оборудование: штатив с пробирками, пипетки, колба плоскодонная с двойным шлифом

Материалы и реактивы: экстракт терпенов янтаря (1 г янтарной муки суспензировать в концентрированной уксусной кислоте), уксусная кислота концентрированная, перманганат калия

Ход работы

В две пробирки налить по 1 мл перманганата калия. В первую пробирку добавить 1 каплю уксусного экстракта терпенов (янтарной муки). Во вторую пробирку добавить то же количество концентрированной уксусной. Наблюдается изменение окраски в первой пробирке.

Опыт. 2. Очистка технической янтарной кислоты методом кристаллизации

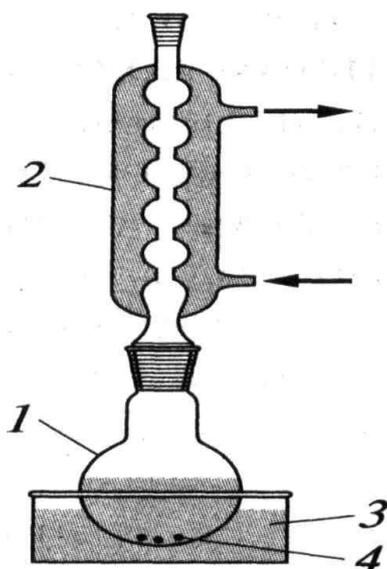
Кристаллизация – процесс образования и роста кристаллов из раствора, расплава или газовой среды. Это один из важнейших методов очистки веществ от различных загрязнений, его также часто применяют для разделения смеси твердых веществ. При кристаллизации необходимо выполнение следующих условий:

- 1) растворимость вещества должна сильно зависеть от температуры (вещество должно хорошо растворяться при нагревании и значительно хуже – при охлаждении);

2) растворимость очищаемого вещества в данном растворителе должна резко отличаться от растворимости примесей;

3) растворитель не должен химически взаимодействовать с очищаемым веществом;

4) кристаллизацию желательно проводить в небольшом объеме растворителя, иначе очищаемое вещество не будет полностью выделяться при охлаждении.



Прибор для кристаллизации: 1 – колба;
2 – обратный холодильник; 3 – баня;
4 - кипятильники

Методика кристаллизации

Твердое вещество переносят в коническую или круглодонную колбу и добавляют столько растворителя, чтобы его хватило для полного смачивания вещества, но не достаточное для его растворения при нагревании. В колбу вносят несколько кипятильников и подсоединяют обратный водяной холодильник. Колба и холодильник должны иметь хорошо подогнанные шлифы. Прибор устанавливают на водяную баню, если растворители имеют температуру кипения до 80 °С, или на электрическую плитку с закрытой спиралью в случае высококипящих растворителей. Смесь нагревают до равномерного кипения. Через обратный водяной холодильник небольшими порциями добавляют растворитель до полного растворения вещества. Не следует забывать, что при кристаллизации используют минимальный объем растворителя. Если смесь загрязнена смолистыми и окрашенными примесями, то для их удаления применяют активированный уголь в количестве 3–5 % от массы вещества. Для этого колбу снимают, дают содержимому немного остыть. Затем в него вносят рассчитанное количество измельченного активированного угля. Нельзя вносить уголь в кипящий или нагретый выше температуры кипения раствор, так как это вызовет бурное

кипение с выбрасыванием горячей жидкости их колбы, что может привести к ожогам.

Добавив уголь, раствор снова доводят до кипения, кипятят его 10–60 мин до полного обесцвечивания и сразу же фильтруют его горячим через складчатый фильтр в большую коническую колбу или стакан, пользуясь воронкой для горячего фильтрования. Если раствор не обесцветился, процедуру повторяют еще раз. Выливать раствор на фильтр надо с помощью стеклянной палочки. Фильтрование проводить, как можно быстрее: воронку заполнить почти до края фильтра раствором, который перед очередным выливанием вновь доводить до кипения. Если на фильтре все же выпадает большой осадок, его снимают и перекристаллизовывают, используя для этого маточный раствор.

Если к моменту окончания фильтрования из фильтрата выпали кристаллы, то их растворяют, нагревая колбу (стакан) с раствором. Колбу или сосуд с фильтратом закрывают и ставят в холодильник или охлаждающую смесь для более полного выделения осадка.

При образовании пересыщенных растворов для формирования центров кристаллизации добавляют несколько кристалликов очищенного вещества в качестве затравки. Кристаллизацию также легко вызвать трением стеклянной палочкой о стенку сосуда при сильном охлаждении смеси.

Выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают водой. Осадок высушивают сначала на воздухе на листе фильтровальной бумаги, затем в сушильном шкафу при 100 °С.

Оборудование: колбы конические или круглодонные, стаканы стеклянные на 100 мл, цилиндры на 50 мл, электроплитки или водяные бани, термометры, весы технические или аналитические, фильтры бумажные, сушильный шкаф, воронки для фильтрования, чашки Петри, палочки стеклянные.

Материалы и реактивы: исследуемый материал, вода дистиллированная.

Ход работы

1. Собрать прибор для кристаллизации.
2. Измельченный исследуемый материал в количестве, указанном в таблице, взвесить и поместит в колбу емкостью 50 мл, добавив необходимое количество активированного угля.

Таблица 5. Количество янтарной кислоты, необходимое для растворения в 25 мл дистиллированной воды, при различных температурах

Исследуемый материал, г	Температура, ° С						
	40	50	60	70	80	90	100
Янтарная кислота	8,8	12,3	15,9	19,4	23,0	26,5	30,1

3. В колбу внести 25 мл дистиллированной воды, хорошо перемешать содержимое стеклянной палочкой, поместить в водяную баню или на электроплитку и нагреть до соответствующей температуры и оставить при этой температуре до полного растворения технической янтарной кислоты.

4. Нагретую жидкость охладить, выпавшие кристаллы отфильтровать, промыть водой.

5. Получившийся осадок высушить сначала на воздухе на фильтре, затем в сушильном шкафу при 100 °С.

Определить проценты выхода очищенной янтарной кислоты по разнице взвешиваний:

а) Запишите ваши наблюдения для каждого опыта.

б) Сформулируйте выводы для каждого опыта.

в) Отчитайтесь перед преподавателем о проделанной работе: предъявите оформленный отчет по лабораторной работе и штатив с пробирками.

Вопросы для самостоятельной работы

1. Какие виды балтийского янтаря знаете, как его классифицируют переработчики?

2. Для чего добавляют уголь при перекристаллизации? Почему нельзя вносить его в почти кипящий раствор?

3. С какой целью при фильтровании применяют складчатый, а не гладкий фильтр?

Учебная литература: [13, 14]

Библиографический список

1. Комов, В. П. Биохимия: учеб. / В. П. Комов, В. Н. Шведова. – 2-е изд., испр. – Москва: Дрофа, 2006. – 639 с.

2. Коваленко, Л. В. Биохимические основы химии биологически активных веществ: учеб. пособие / Л. В. Коваленко. – Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 230 с.

3. Носова, Э.В. Химия гетероциклических биологически активных веществ [Электронный ресурс]: учеб. пособие / Э. В. Носова; Министерство образования и науки Российской Федерации, Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина. – Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2014. – 205 с. (ЭБС «Университетская библиотека онлайн»).

4. Органическая химия: учеб.: в 2 кн. / В. Л. Белобородов, С. Э. Зурабян, Н. А. Тюкавкина. – 2-е изд., стер. – Москва: ДРОФА, 2009. – Кн. 2: Специальный курс. – 2-е изд., стер. – 592 с.

5. Тюкавкина, Н. А. Биоорганическая химия: учеб. / Н. А. Тюкавкина, Ю. И. Бауков. – 7-е изд., стер. – Москва: ДРОФА, 2008. – 543 с.
6. Кнорре, Д. Г. Биологическая химия: учебник / Д. Г. Кнорре, С. Д. Мызина. – Изд. 3-е, испр. – Москва: Высшая школа, 2003. – 478 с.
7. Шабров, А. В. Биохимические основы действия микрокомпонентов пищи / А. В. Шабров, В. А. Дадали, В. Г. Макаров. – Москва: Авваллон, 2003. – 46 с.
8. Биотехнология морепродуктов: учеб. / Л. С. Байдалинова [и др.]; Федер. агентство по рыболовству. – Москва: Мир, 2006. – 560 с.
9. Биотехнология рационального использования гидробионтов: учеб. / О. Я. Мезенова [и др.]; под ред. О. Я. Мезеновой. – Санкт-Петербург [и др.]: Лань, 2013. – 416 с.
10. Сергеева, Н. Т. Биологически активные вещества: учеб. пособие для студ. вузов по спец. 240902.65 "Пищевая биотехнология" по курсу Химия биологически активных веществ / Н. Т. Сергеева. – Калининград: КГТУ, 2005. – 306 с.
11. Сергеева, Н. Т. Практикум по биологически активным веществам: учеб. пособие для студ. вузов по спец. 240902.65 - "Пищевая биотехнология" при изуч. дисциплины Химия биологически активных веществ / Н. Т. Сергеева, Г. Е. Степанцова, Н. В. Ломако; ФГОУ ВПО КГТУ. – Калининград: КГТУ, 2007. – 193 с.
12. Сергеева, Н. Т. Практикум по биохимии: учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений по специальности 240902.65 - Пищевая биотехнология, 260501.65 - Технология обществ. питания, 260100.62 - Технология продуктов питания при изучении дисциплины "Биохимия" (бакалавр) / Н. Т. Сергеева; Калинингр. гос. техн. ун-т. – Калининград: КГТУ, 2008. – 211 с.
13. Классификатор балтийского янтаря Приморского месторождения / М. С. Будулёв, Б. Ю. Воротников [и др.]. – Калининград: Калининградский янтарный комбинат, 2022. – 47 с.

Локальный электронный методический материал

Галина Егоровна Степанцова

ХИМИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Редактор Е. Билко

Уч.-изд. л. 6,0. Печ. л. 4,8

Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Калининградский государственный технический университет»,
236022, Калининград, Советский проспект, 1