

Министерство образования Республики Беларусь
Учреждение образования «Витебский государственный
университет имени П.М. Машерова»
Кафедра химии

Е.О. Данченко

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

*Методические рекомендации
к выполнению лабораторных работ*

*Витебск
ВГУ имени П.М. Машерова
2012*

УДК 576.3(075.8)

ББК 28.072я73

Д19

Печатается по решению научно-методического совета учреждения образования «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова». Протокол № 7 от 22.12.2011 г.

Автор: профессор кафедры химии ВГУ имени П.М. Машерова, доктор медицинских наук, доцент **Е.О. Данченко**

Рецензент:

заведующий кафедрой химии УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», кандидат биологических наук, доцент *В.П. Баран*

Данченко, Е.О.

Д19

Биологическая химия: методические рекомендации к выполнению лабораторных работ / Е.О. Данченко. – Витебск : ВГУ имени П.М. Машерова, 2012. – 48 с.

Издание подготовлено в соответствии с учебной программой по дисциплине «Биологическая химия». Приводятся методики выполнения 49 лабораторных работ.

Предназначается для студентов, обучающихся по специальностям 1-33 01 01 «Биоэкология», 1-02 04 04-01 «Биология. Химия», 1-31 01 01 «Биология (НПД)»

УДК 576.3 (075.8)

ББК 28.072я73

© Данченко Е.О., 2012

© ВГУ имени П.М. Машерова, 2012

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	5
Лабораторная работа 1. Цветные реакции на белки и аминокислоты	6
Лабораторная работа 2. Реакции осаждения белков	11
Лабораторная работа 3. Действие амилазы на крахмал	14
Лабораторная работа 4. Определение термолабильности амилазы слюны	15
Лабораторная работа 5. Определение оптимума pH для действия амилазы	16
Лабораторная работа 6. Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы	17
Лабораторная работа 7. Специфичность действия ферментов	17
Лабораторная работа 8. Исследование свойств тирозиназы из картофеля	18
Лабораторная работа 9. Ингибирующее действие хлорид-ионов на дегидрогеназный комплекс картофеля	18
Лабораторная работа 10. Кинетика действия липазы	19
Лабораторная работа 11. Сопоставление окислительно-восстановительных потенциалов рибофлавина и индикатора метиленового синего	20
Лабораторная работа 12. Количественное определение АТФ и креатинфосфата в мышце	21
Лабораторная работа 13. Обнаружение НАД в дрожжах	22
Лабораторная работа 14. Обнаружение каталазы в крови	23
Лабораторная работа 15. Обнаружение сукцинатдегидрогеназы	23
Лабораторная работа 16. Обнаружение дегидрогеназы глицеральдегид-3-фосфата в дрожжах	24
Лабораторная работа 17. Обнаружение молочной кислоты в мышечной ткани реактивом Уффельмана	24
Лабораторная работа 18. Обнаружение альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата	25
Лабораторная работа 19. Обнаружение крахмала в зеленых листьях растений	26
Лабораторная работа 20. Обнаружение редуцирующих веществ в вытяжке из моркови	26
Лабораторная работа 21. Обнаружение ненасыщенных жирных кислот в растительном масле	27
Лабораторная работа 22. Влияние желчи на активность липазы	27
Лабораторная работа 23. Качественные реакции на желчные кислоты	28
Лабораторная работа 24. Качественные реакции на кетоновые тела	28
Лабораторная работа 25. Качественные реакции на холестерол	29
Лабораторная работа 26. Рефрактометрическое определение белка	30
Лабораторная работа 27. Определение мочевины в сыворотке крови диацетилмонооксимным методом	31
Лабораторная работа 28. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот	32
Лабораторная работа 29. Изучение состава нуклеопротеинов	33
Лабораторная работа 30. Определение мочевой кислоты по методу Мюллера-Зейферта	34
Лабораторная работа 31. Качественные реакции на адреналин	35
Лабораторная работа 32. Качественные реакции на инсулин	36
Лабораторная работа 33. Обнаружение йода в тиреоидине	37
Лабораторная работа 34. Качественная реакция на фолликулин	37
Лабораторная работа 35. Качественное определение органических составных частей мочи	38

Лабораторная работа 36. Полуколичественное определение компонентов мочи с помощью тест-полосок	39
Лабораторная работа 37. Качественные реакции на кортизол	39
Лабораторная работа 38. Качественные реакции на витамин А	40
Лабораторная работа 39. Обнаружение эргостерола в дрожжах	40
Лабораторная работа 40. Качественные реакции на витамин Е	41
Лабораторная работа 41. Качественные реакции на витамин С	41
Лабораторная работа 42. Количественное определение витамина С в продуктах по методу Тильманса	42
Лабораторная работа 43. Количественное определение витамина Р (рутина) в черном и зеленом чае	43
Лабораторная работа 44. Качественные реакции на витамин В ₁	44
Лабораторная работа 45. Качественные реакции на витамин В ₂	44
Лабораторная работа 46. Качественные реакции на витамин В ₆	45
Лабораторная работа 47. Качественная реакция на витамин РР	45
Лабораторная работа 48. Выделение фолиевой кислоты из дрожжей и ее обнаружение	45
Лабораторная работа 49. Качественная реакция на витамин В ₁₂	46
Перечень лабораторных работ, включенных в практические навыки экзамена по биохимии	47

ВВЕДЕНИЕ

Издание предназначено для методического обеспечения лабораторных работ по биохимии, выполняемых студентами 4 курса биологического факультета (специальность 1-02 04 04-01 «Биология.Химия») и 2 курса биологического факультета (специальности 1-33 01 01 «Биоэкология» и 1-31 01 01 «Биология (научно-педагогическая деятельность)») по дисциплине «Биологическая химия». Каждая лабораторная работа включает описание принципа работы, необходимые реактивы, ход выполнения работы и необходимые расчеты. После описания работы имеются указания по оформлению работы и несколько контрольных вопросов. Часть из приведенных лабораторных работ включена в трехэтапный экзамен по биохимии.

По каждой лабораторной работе студент должен заполнить протокол, включающий пять подразделов: 1) название работы; 2) принцип метода исследования; 3) краткое описание хода работы; 4) результаты исследования; 5) выводы. Первые три подраздела студент заполняет заранее в процессе самоподготовки, четвертый и пятый подразделы - на занятии после выполнения опытов. Особое внимание следует обратить на последний подраздел, поскольку хорошо продуманный и сформулированный вывод с элементами обобщения свидетельствует о сознательном и глубоком усвоении учебного материала.

Выполнив указанные в плане лабораторные работы, студенты допускаются к сдаче практических навыков экзамена по биохимии.

Лабораторная работа 1

Цветные реакции на белки и аминокислоты

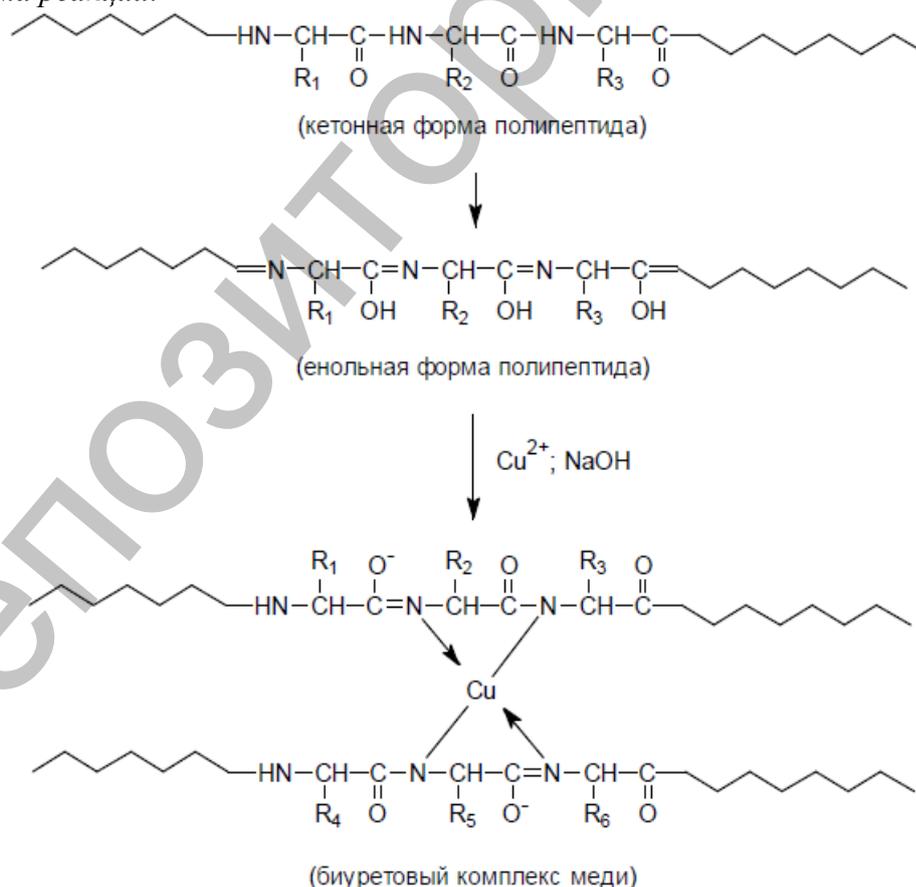
Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на белки и аминокислоты.

Ряд химических реактивов специфически взаимодействуют с функциональными группами аминокислот (как свободных, так и в составе пептидов и белков), в результате чего развивается окрашивание определенного цвета. Такие реакции называют *цветными реакциями*. Интенсивность окраски в цветных реакциях пропорциональна количеству реагирующих функциональных групп. Поэтому цветные реакции могут быть использованы для качественного и количественного определения белков, определения присутствующих в них аминокислот или анализа состава белков.

1. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского)

Принцип метода. При добавлении сульфата меди к сильнощелочному раствору белка или полипептида образуются соединения меди с пептидной группировкой, окрашенные в красно-фиолетовый или сине-фиолетовый цвет в зависимости от длины полипептидной цепи. Раствор белка дает сине-фиолетовое окрашивание, а продукты неполного его гидролиза (пептоны) - розовое или красное окрашивание. Биуретовая реакция открывает пептидную связь в белке.

Схема реакции:



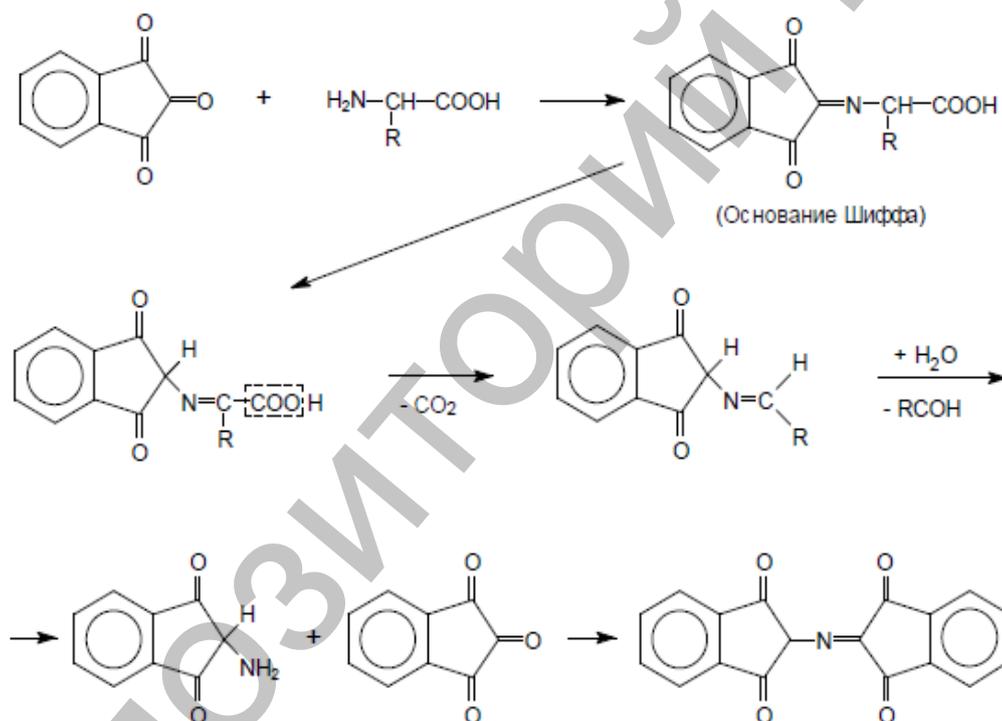
Реактивы, исследуемый материал: 1) 10% раствор гидроксида натрия; 2) 1% раствор сульфата меди; 3) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям раствора белка прибавить 5 капель 10% раствора гидроксида натрия, 2 капли 1% раствора сульфата меди и перемешать. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовый цвет.

2. Нингидриновая реакция (реакция Рузмана)

Принцип метода. Растворы белка, α -аминокислот и пептидов при нагревании с нингидрином дают синее или фиолетовое окрашивание. Реакция обусловлена наличием аминогрупп в α -положении. В этой реакции α -аминокислоты и пептиды окисляются нингидрином и подвергаются окислительному дезаминированию и декарбоксилированию с образованием аммиака, альдегида и CO_2 . Нингидрин восстанавливается и связывается со второй молекулой нингидрина посредством молекулы аммиака, образуя продукты конденсации, окрашенные в синий, фиолетовый, красный, а в случае пролина – в желтый цвет.

Схема реакции:



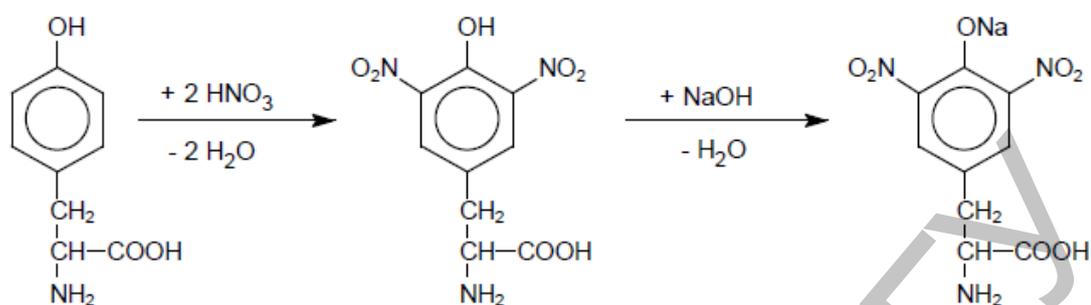
Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,1% раствор нингидрина; 2) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям раствора белка прибавить 5 капель раствора 0,1% раствора нингидрина и прокипятить 1-2 минуты. Появляется розово-фиолетовое или сине-фиолетовое окрашивание.

3. Ксантопротеиновая реакция

Принцип метода. При нагревании белков с концентрированной азотной кислотой образуется желтое окрашивание, переходящее при подщелачивании в оранжевое окрашивание. Ксантопротеиновая реакция открывает наличие в белках циклических аминокислот – триптофана, фенилаланина, тирозина, содержащих в своем составе бензольное ядро. Реакция обусловлена нитрованием бензольного кольца этих аминокислот с образованием нитросоединений желтого цвета.

Схема реакции:



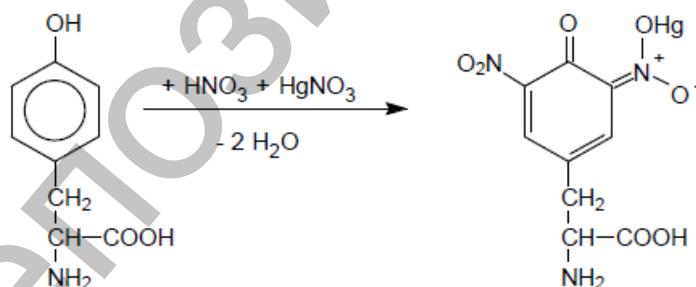
Реактивы, исследуемый материал: 1) концентрированная азотная кислота; 2) 10% раствор гидроксида натрия; 3) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям раствора белка добавить 3 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятить. Вначале образуется осадок свернувшегося белка (под влиянием кислоты), который при нагревании окрашивается в желтый цвет. После охлаждения в пробирку налить по каплям 10% раствор гидроксида натрия до появления оранжевого окрашивания вследствие образования натриевой соли динитротирозина.

4. Реакция Миллона

Принцип метода. При добавлении к раствору белка реактива Миллона (смесь азотнокислых и азотистокислых солей закиси и окиси ртути, растворенных в концентрированной азотной кислоте) образуется белый осадок (действие соли тяжелого металла), окрашивающийся при нагревании в красный цвет. Следует избегать прибавления избытка реактива Миллона, поскольку он содержит азотную кислоту, которая при взаимодействии с белком может дать желтое окрашивание (ксантопротеиновую реакцию), маскирующее реакцию Миллона. Реакция Миллона открывает в белке циклическую аминокислоту тирозин.

Схема реакции:



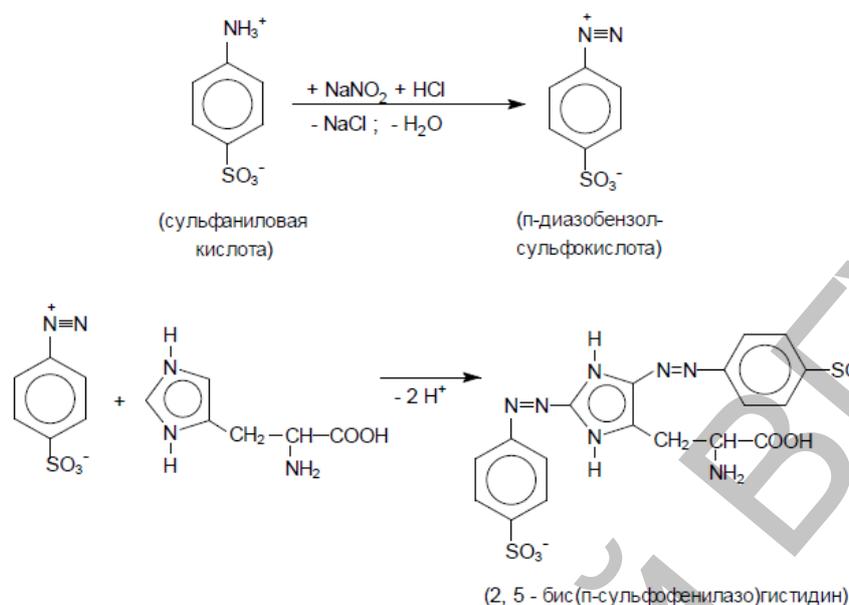
Реактивы, исследуемый материал: 1) реактив Миллона; 2) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям раствора белка прилить 3 капли реактива Миллона. Появляется белый осадок белка. Содержимое пробирки осторожно нагреть. Осадок белка окрашивается в кирпично-красный цвет.

5. Реакция Фоля

Принцип метода. При кипячении белка с реактивом Фоля под действием щелочи от цистеина или цистина легко отщепляется сера в виде сернистого натрия, который с плюмбитом дает черный или бурый осадок сернистого свинца. Реакция Фоля указывает на присутствие в белке аминокислот цистина и цистеина,

Схема реакции:



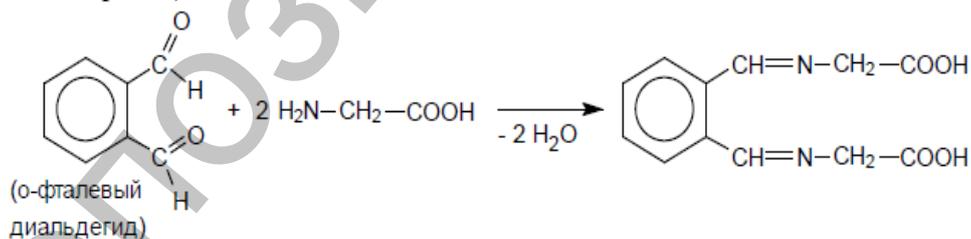
Реактивы, исследуемый материал: 1) 1% раствор сульфаниловой кислоты в 5% растворе хлористоводородной кислоты; 2) 0,5% раствор нитрита натрия; 3) 10% раствор карбоната натрия; 4) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям 1%-го раствора сульфаниловой кислоты в 5% растворе хлористоводородной кислоты добавить 10 капель 0,5% раствора нитрита натрия. Содержимое пробирки встряхнуть и быстро добавить сначала 10 капель раствора белка, а затем, после перемешивания, 10 капель 10% раствора гидрокарбоната натрия.

8. Реакция на глицин (реакция Циммермана)

Принцип метода. Глицин дает ярко-зеленое окрашивание раствора при взаимодействии с о-фталевым диальдегидом в щелочном растворе.

Схема реакции:



Реактивы, исследуемый материал: 1) 10% раствор гидроксида натрия; 2) раствор о-фталового диальдегида; 3) раствор белка (или 0,1% раствор глицина)

Ход работы. К 10 каплям исследуемого раствора прибавить 10%-ный раствор гидроксида натрия до pH=8 (по лакмусу). Затем прилить 2-3 капли водного раствора о-фталового диальдегида.

Указания к оформлению лабораторной работы

Протокол лабораторной работы оформите в виде таблицы.

Название реакции	Принцип	Ход реакции	Наблюдаемый результат	Что открывает
------------------	---------	-------------	-----------------------	---------------

Сделайте вывод о специфичности цветных реакций на белки и аминокислоты.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Объясните принципы цветных реакций на белки и аминокислоты.
2. Какова специфичность цветных реакций на белки и аминокислоты?

Лабораторная работа 2

Реакции осаждения белков

Цель работы. Ознакомится с реакциями осаждения белков.

Реакции осаждения белков, в зависимости от применяемого осадителя, могут быть обратимыми и необратимыми. В случае обратимых реакций белки не подвергаются глубоким изменениям, и получаемые осадки могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе, обычно в воде. Белки при этом сохраняют свои начальные естественные свойства. При необратимых реакциях осажденные белки подвергаются глубоким изменениям. Получаемые осадки не могут быть вновь растворены в первоначальном растворителе, обычно в воде, т.е. наступает денатурация белков. Обратимые реакции осаждения белков можно получить путем высаливания при помощи нейтральных солей: NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , спиртом (в случае непродолжительного действия его на белок при низкой температуре) и др. Значение реакций осаждения белков в том, что они дают возможность: 1) изучить свойства белков; 2) освободить жидкость от присутствия белка, что бывает необходимо при некоторых исследованиях; 3) установить наличие белка, например, в моче, при различных заболеваниях; 4) с помощью различных концентраций нейтральных солей или спиртом методом высаливания выделить отдельные белковые фракции.

1. Осаждение белков кипячением

Принцип метода. Существуют белки растворимые и нерастворимые в воде. Коллоидные растворы белков относительно устойчивы. Эта устойчивость обусловлена тем, что белковые молекулы имеют одинаковый электрический заряд и упакованы так, что на их поверхности находится большое количество гидрофильных полярных групп. Вследствие этого вокруг белковой молекулы формируется плотная многослойная водная оболочка, называемая *гидратной оболочкой*. Гидрофобные радикалы аминокислот упрятаны внутрь глобулы.

Изменение зарядов белковых молекул и/или снятие гидратной оболочки приводит к агрегации белковых молекул и выпадению их в осадок. При нагревании молекулы белков денатурируют, теряют свою нативную структуру, разворачиваются, но остаются во взвешенном состоянии, что проявляется в помутнении разбавленного белкового раствора.

Почти все белки осаждаются при нагревании в нейтральной или слабокислой среде. Более полное и быстрое осаждение белков происходит при достижении изоэлектрической точки.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 1% раствор уксусной кислоты; 2) насыщенный раствор хлорида натрия; 3) 10% раствор гидроксида натрия; 4) раствор яичного белка.

Ход работы. В 5 пробирок налить по 5 капель раствора яичного белка.

В 1-й пробирке нейтральный раствор белка нагреть до кипения. Жидкость мутнеет (возникает опалесценция), поскольку разрушаются водные оболочки вокруг молекул белка и происходит укрупнение его частиц. Мицеллы белка несут заряд и удерживаются во взвешенном состоянии.

Во 2-й пробирке раствор белка нагреть до кипения и прибавить 1 каплю 1% раствора уксусной кислоты до слабого подкисления. При стоянии выпадает хлопьевидный осадок белка. Частицы белка теряют заряд и приближаются к изоэлектрическому состоянию.

В 3-ю пробирку добавить 5 капель раствора уксусной кислоты для получения сильнокислой реакции среды. При кипячении жидкости осадка не образуется, поскольку белковые мицеллы перезаряжаются и несут положительный заряд, что повышает их устойчивость.

В 4-ю пробирку прилить 5 капель раствора уксусной кислоты и 2 капли насыщенного раствора хлорида натрия и нагреть. Выпадает хлопьевидный осадок белка, так как частицы белка теряют заряд вследствие взаимодействия белка с разноименно заряженными ионами хлористого натрия.

В 5-ю пробирку добавить 2 капли раствора гидроксида натрия, создавая щелочную среду. При кипячении жидкости осадка не образуется, поскольку в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка увеличивается.

2. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Принцип метода. Осаждение белков солями тяжелых металлов, в отличие от высаливания, происходит при небольших концентрациях солей. Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.) адсорбируют их, образуя с ними солеобразные и комплексные соединения, растворимые в избытке этих солей (за исключением солей AgNO_3 , HgCl_2), но нерастворимые в воде. Соли тяжелых металлов вызывают необратимое осаждение белков, т.е. денатурацию. Растворение осадка в избытке солей называется адсорбционной пептизацией. Данное явление происходит вследствие возникновения одноименного положительного заряда на частицах белка.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 10% раствор сульфата меди; 2) 5% раствор ацетата свинца; 3) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям раствора яичного белка прибавить осторожно 1 каплю раствора сульфата меди. Образуется бледно-голубой осадок, нерастворимый в воде. К другой такой же порции раствора белка прилить вначале 1 каплю раствора сульфата меди, а затем еще 10 капель и наблюдать растворение осадка в избытке реактива. К 5 каплям раствора яичного белка прибавить 2 капли раствора ацетата свинца, образуется осадок, нерастворимый в воде, но легко растворяющийся в избытке осадителя.

3. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Принцип метода. Концентрированные минеральные кислоты вызывают денатурацию белка. Выпадение белка в виде осадка связано с денатурацией белковых частиц и образованием комплексных солей белка с кислотами. Ортофосфорная кислота осадка не дает. В избытке всех минеральных кислот, за исключением азотной, выпавший в осадок белок растворяется.

Реактивы, исследуемый материал: 1) концентрированная азотная кислота; 2) концентрированная серная кислота; 3) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям концентрированной азотной кислоты осторожно по стенке пробирки прилить 5 капель раствора белка так, чтобы обе жидкости не смешивались. На границе двух жидкостей образуется осадок в виде небольшого белого кольца (проба Геллера). Осторожно встряхнуть пробирку и добавить избыток азотной кислоты: осадок не исчезает, так как в избытке азотной кислоты он не растворяется. Осаждение серной кислотой проводится аналогично реакции с азотной кислотой. К 5 каплям концентрированной серной кислоты осторожно по стенке пробирки налить 5 капель раствора белка. Образуется осадок, растворимый в избытке серной кислоты (при встряхивании).

4. Осаждение белков органическими кислотами

Принцип метода. Органические кислоты вызывают необратимое осаждение белков. Большое практическое применение получили кислоты трихлоруксусная и сульфосалициловая. Сульфосалициловая кислота, помимо белков, осаждает также продукты их распада - высокомолекулярные пептоны и полипептиды. Трихлоруксусная кислота способна осаждать только белки и не осаждает продукты распада белков. В связи с этим трихлоруксусной кислотой осаждают, например, белки крови, когда хотят отделить их от высокомолекулярных пептидов.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 20% раствор сульфосалициловой кислоты; 2) 10% раствор трихлоруксусной кислоты; 3) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям раствора белка добавить 2 капли раствора сульфосалициловой кислоты. Выпадает осадок белка. К 5 каплям раствора белка добавить 2 капли раствора трихлоруксусной кислоты. Выпадает осадок белка.

5. Осаждение белков органическими растворителями

Принцип метода. В органических растворителях, таких, как спирт, ацетон и др., белки не растворяются и выпадают в осадок. В зависимости от природы белка для его осаждения требуются различные концентрации спирта. Спирт связывает воду, вызывая дегидратацию мицелл белка и неустойчивость их в растворе. При осаждении спиртом раствор белка должен быть нейтральным или слабокислым, но не щелочным. Реакция проходит лучше в присутствии электролита хлористого натрия вследствие снятия заряда с частиц белка. Реакция осаждения белка спиртом или кратковременным действием спирта на холоду обратима. Если осадок быстро отделить от спирта, то белок сохранит нативное состояние и может быть вновь растворен в воде. При длительном воздействии спирта наступает необратимая денатурация белка.

Реактивы, исследуемый материал: 1) этиловый спирт; 2) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям раствора белка прилить 15-20 капель этилового спирта. Раствор мутнеет. Добавить 1 каплю насыщенного раствора хлорида натрия. При стоянии выпадает осадок белка.

6. Осаждение белков алкалоидными реактивами

Принцип метода. Осаждение белков алкалоидными реактивами также относится к необратимым реакциям. Механизм осаждения белков алкалоидными реактивами связан с образованием нерастворимых солеобразных соединений с основными азотосодержащими группами белка. В этом соединении белок является катионом, а алкалоидный реактив – анионом.

Реактивы, исследуемый материал: 1) насыщенный раствор пикриновой кислоты; 2) 1% раствор уксусной кислоты; 3) раствор яичного белка.

Ход работы. К 5 каплям раствора белка прибавить 2 капли насыщенного раствора пикриновой кислоты и 2 капли раствора уксусной кислоты. Выпадает осадок белка.

Указания к оформлению лабораторной работы

Протокол лабораторной работы оформите в виде таблиц.

а) Осаждение белков кипячением.

№ пробирки	Ход реакции	Наблюдаемый результат	Принцип осаждения
------------	-------------	-----------------------	-------------------

б) Осаждение белков различными веществами

Название реакции	Принцип	Ход реакции	Наблюдаемый результат
------------------	---------	-------------	-----------------------

Сделайте вывод о факторах, влияющих на устойчивость белков в растворе и способах осаждения белков.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Объясните принципы реакций осаждения белков.
2. Какими реактивами вызывается обратимое осаждение белков?
3. Какими реактивами вызывается необратимое осаждение белков?
4. Объясните явление денатурации. Назовите факторы, вызывающие денатурацию белка.

Лабораторная работа 3

Действие амилазы на крахмал

Цель работы. Определить время полного расщепления крахмала амилазой слюны.

Фермент амилаза (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ: 3.2.1.1) осуществляет гидролиз крахмала через промежуточные продукты распада (декстрины) до мальтозы. Последняя под влиянием фермента мальтазы расщепляется на две молекулы глюкозы. В слюне содержатся амилаза и мальтаза, так что слюна способна расщеплять крахмал до глюкозы.

Основным источником амилазы в организме человека является поджелудочная железа, секретирующая фермент в кишечник, где происходит расщепление поступающего с пищей крахмала.

Принцип метода. Нерасщепленный крахмал с йодом дает синее окрашивание, а декстрины, в зависимости от размера молекул, дают с йодом последовательно фиолетовую, красно-бурую, оранжевую окраску, тогда как мальтоза и глюкоза окрашивания с йодом не дают. Таким образом, можно наблюдать за скоростью расщепления крахмала по реакции с йодом. Активность амилазы в слюне не имеет большого физиологического значения и может значительно отличаться у разных людей.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,5% раствор крахмала; 2) раствор йода в водном растворе йодистого калия (раствор Люголя); 3) слюна.

Ход работы. В 9 пробирок наливают по 2 мл дистиллированной воды и добавляют по 1 капле раствора Люголя. Отдельно в стаканчик наливают 5 мл 0,5% раствора крахмала. Из стаканчика берут пробу - 1 каплю, вносят в первую пробирку и перемешивают, в результате чего раствор в пробирке окрашивается в синий цвет. В стаканчик быстро вносят 5 капель слюны, энергично перемешивают и замечают по секундомеру время. Через 20 секунд берут из стаканчика пробу – 1 каплю и вносят во вторую пробирку. Если жидкость в пробирке станет фиолетовой или красной, то пробы из стаканчика нужно отбирать и вносить в пробирки через каждые 20 секунд. Если жидкость в пробирке 2 окрасится в синий цвет, то пробы следует отбирать через более длительные интервалы времени, например через 1 минуту. Когда в одной из пробирок цвет раствора йода не изменится, гидролиз крахмала считают законченным. Фиксируют время, затраченное на полное расщепление крахмала.

Указания к оформлению лабораторной работы

Результаты работы оформите в виде таблицы:

<i>№ пробирок</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
Окраска жидкости									

Сделайте вывод о времени, необходимом для полного расщепления крахмала амилазой.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Объясните принцип метода определения действия амилазы на крахмал.
2. Почему происходит изменение окраски раствора йода при добавлении крахмала после воздействия амилазы слюны?

Лабораторная работа 4

Определение термолабильности амилазы слюны

Цель работы. Доказать, что температура влияет на активность ферментов.

При повышении температуры каждые на 10°C скорость химической реакции увеличивается в 2-4 раза. В отличие от химических процессов такое увеличение скорости ферментативных реакций наблюдается в узком интервале температур. Температура, при которой на графике зависимости скорости реакции от температуры наблюдается наибольшая скорость реакции, называется температурным оптимумом и обозначается $t_{\text{опт}}$ и для ферментов теплокровных животных чаще всего лежит в пределах 37-40° С. При более высоком значении температуры становится заметным влияние на фермент термической инактивации (тепловая денатурация белковой молекулы). Существенное падение скорости большинства ферментативных процессов наблюдается после достижения 42 – 50°C.

Реактивы, исследуемый материал: 1) слюна, разведенная дистиллированной водой (1:10); 2) 1% раствор крахмала; 3) дистиллированная вода; 4) 30% раствор гидроксида натрия; 5) 7% раствор сульфата меди; 6) раствор Люголя.

Ход работы.

Вариант 1.

Реактивы, исследуемый материал	Пробирки		
	1	2	3
Слюна 1:10, капли	10	-	-
Кипяченая слюна, капли (кипятить 2 мл разведенной слюны 1-2 мин, охладить)	-	10	-
H ₂ O, капли	-	-	10
Крахмал 1%, капли	10	10	10
Поместить в термостат на 10 минут при температуре 38° С			
	Окраска		
Реакция с йодом: 5 капель раствора из пробирки + 1 капли раствора I ₂ в KI.			
Реакция Троммера			
Вывод			

Реакция Троммера

К содержимому исследуемого раствора добавляют равный объем 30% раствора NaOH и 1 каплю 7% раствора CuSO₄, следя за тем, чтобы капли не растекались по стенкам пробирки до появления в верхнем слое не исчезающей голубой мути вследствие образования гидроксида меди (II) Cu(OH)₂. Затем осторожно, не встряхивая пробирку, нагревают её на горелке. При кипячении выпадает желтый осадок гидроксида меди (I) CuOH или красный осадок Cu₂O. В случае избытка CuSO₄ образуется черный осадок CuO.

Вариант 2

Реагенты	Температура, °С			
	0	20	37	100
Крахмал, 1%, мл	0,5	0,5	0,5	0,5
Слюна, 1:10, мл	0,5	0,5	0,5	0,5
Инкубировать 10 мин и затем добавить по 1-2 капли I_2 в КИ				
Зарегистрировать окрашивание				

Указания к оформлению лабораторной работы

Ход работы оформите в виде таблицы, и сделайте вывод о влиянии температуры на активность амилазы слюны.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. При каких оптимальных условиях следует определять активность ферментов?
2. Что понимают под температурным оптимумом и чему он равен?

Лабораторная работа 5

Определение оптимума pH для действия амилазы

Цель работы. Определить оптимум pH для амилазы слюны.

Зависимость скорости ферментативной реакции от pH носит колоколообразный характер. Основное количество ферментов проявляют максимальную активность в узком диапазоне pH – оптимуме pH. При изменении pH в ту или иную сторону от оптимума скорость реакции уменьшается вследствие ионизации функциональных групп фермента и субстрата. Для большинства ферментов оптимум pH равен 7-8.

Реактивы, исследуемый материал: 1) слюна, разведенная дистиллированной водой (1:10); 2) фосфатные буферные растворы (pH 6,0-8,0); 3) 0,5% раствор крахмала; 4) раствор Люголя.

Реактивы, исследуемый материал	Пробирки (pH)					
	1 (6,0)	2 (6,4)	3 (6,8)	4 (7,2)	5 (7,6)	6 (8,0)
Буферный раствор, мл	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Крахмал 0,5%, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Слюна, 1:10, мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Поместить в термостат на 10 мин, температура 37°C						
Раствор I_2 в KI, капли	1	1	1	1	1	1
Окраска						
Вывод						

Указания к оформлению лабораторной работы

Ход работы оформите в виде таблицы, и сделайте вывод, при каком значении pH активность фермента максимальная.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Как изменяется скорость реакции при изменении pH и почему?
2. Что понимают под оптимумом pH и чему он равен?

Лабораторная работа 6

Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы

Цель работы. Изучить влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов.

Скорость ферментативной реакции увеличивается при добавлении активаторов, которыми являются катионы и некоторые анионы (например, ион хлора). Ингибиторы – вещества, замедляющие или полностью прекращающие ферментативную реакцию.

Реагенты, исследуемый материал: 1) слюна, разведенная дистиллированной водой (1:10); 2) дистиллированная вода; 3) 1% раствор хлорида натрия; 4) 1% раствор сульфата меди; 5) 1% раствор крахмала; 6) раствор Люголя.

Ход работы.

Реактивы, исследуемый материал	Пробирки		
	№ 1	№ 2	№ 3
Слюна 1:10, мл	1,0	1,0	1,0
H ₂ O, капли	5	-	-
NaCl, 1%, капли	-	5	-
CuSO ₄ , 1%, капли	-	-	5
Крахмал, 1%, капли	5	5	5
Поместить в термостат на 5 минут, температура 37°C			
Раствор I ₂ в KI, капли	1	1	1
Окраска			
Вывод:			

Указания к оформлению лабораторной работы

Ход работы оформите в виде таблицы, и сделайте вывод о влиянии активаторов и ингибиторов на активность ферментов.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Как можно воздействовать на скорость ферментативной реакции?
2. Как классифицируются ингибиторы ферментов?

Лабораторная работа 7

Специфичность действия ферментов

Цель работы. Определить тип специфичности амилазы и сахаразы.

Крахмал и сахароза – обычные углеводы пищи. Амилаза и сахароза – ферменты, участвующие в расщеплении этих углеводов. Амилаза слюны расщепляет крахмал до мальтозы и, затем, мальтаза расщепляет последнюю до свободной глюкозы. Сахараза кишечного сока расщепляет сахарозу до глюкозы и фруктозы. Источником ферментов могут быть слюна (для амилазы) и пекарские дрожжи (для сахаразы).

Реактивы, исследуемый материал: 1) слюна, разведенная дистиллированной водой в 5 раз; 2) фильтрат дрожжей; 3) 1% раствор крахмала; 4) 30% раствор гидроксида натрия; 5) 7% раствор сульфата меди.

Реагенты, исследуемый материал	Пробирки			
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4
Слюна (амилаза), капли	5	5	-	-
Фильтрат дрожжей (сахараза), капли	-	-	5	5
Крахмал 1%, капли	10	-	10	-
Сахароза, капли	-	10	-	10
Пометить на 10 мин в термостат, температура 37 °С				
Выполнить реакцию Троммера				
Окраска				
Вывод				

Указания к оформлению лабораторной работы

Ход работы оформите в виде таблицы, сделайте вывод о субстратной специфичности амилазы и сахаразы.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Как можно оценить специфичность ферментов?
2. Каким видом специфичности обладает сахараза и амилаза. Назовите виды специфичности ферментов.

Лабораторная работа 8

Исследование свойств тирозиназы из картофеля

Цель работы. Изучить свойства тирозиназы картофеля.

Принцип метода. Тирозиназа - фермент, окисляющий аминокислоту тирозин в темный пигмент за счет кислорода. Этот фермент может окислить и гваяковую смолу. При окислении гваяковой смолы образуется озонид синего цвета.

Реактивы, исследуемый материал: 1) гваяковая смола; 2) срезы сырого картофеля; 3) срезы вареного картофеля

Ход работы.

	Срез сырого картофеля	Срез вареного картофеля
Гваяковая настойка, капли	1	1
Результат		
Вывод		

Указания к оформлению лабораторной работы

Запишите ход работы и сделайте вывод о свойствах тирозиназы картофеля.

Лабораторная работа 9

Ингибирующее действие хлорид-ионов на дегидрогеназный комплекс картофеля

Цель работы. Изучить влияние хлорид-ионов на дегидрогеназный комплекс картофеля.

Принцип метода. Хлорид-ионы ингибируют дегидрогеназный комплекс и срез картофеля остается без изменений, остальные темнеют.

Реактивы, исследуемый материал: 1) хлорид натрия кристаллический; 2) йодид натрия кристаллический; 3) хлорат калия, кристаллический; 4) сырой картофель.

Ход работы. На срезы картофеля насыпать хлорид натрия, йодид натрия, хлорат калия. Через 15-20 мин отметить изменение окраски.

Лабораторная работа 10

Кинетика действия липазы

Цель работы. Изучить зависимость скорости реакции от времени и построить кинетические кривые.

Липолитические ферменты поджелудочной железы гидролизуют жиры пищи в тонком кишечнике. Изучая кинетику липазы, можно проследить в динамике активность фермента и обозначить факторы, влияющие на этот процесс.

Реактивы, исследуемый материал: 1) молоко; 2) липаза; 3) фенолфталеин; 4) 0,01 М раствор гидроксида натрия.

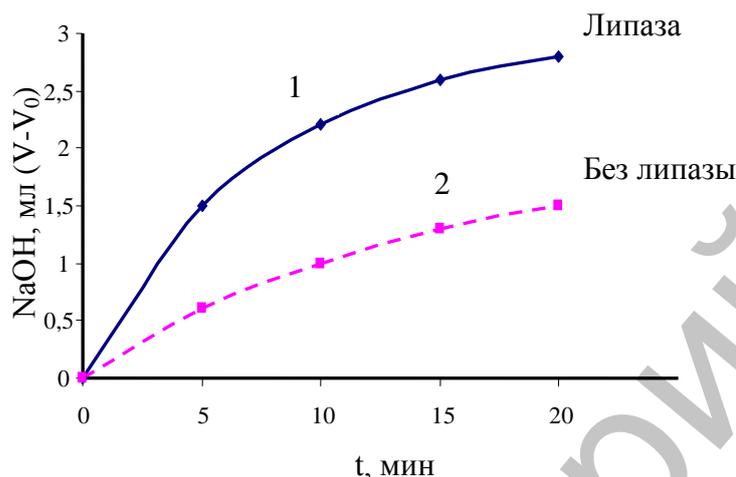
Ход работы. В два стаканчика наливают по 10 мл разбавленного водой (1:1) молока. В один из стаканчиков вносят 1 мл липазы (*опытная проба*), в другой – 1 мл H_2O (*контрольная проба*). Из каждой пробы отбирают в колбу для титрования по 2 мл образовавшейся смеси и титруют 0,01 М раствором NaOH в присутствии фенолфталеина до появления розового окрашивания. Повторные титрования проводят через каждые 10 минут. Значение первого титрования (время реакции «0») вычитают из величины последующих титрований. В этом случае полученные графики пройдут через начало координат, так как вычитается исходное количество органических кислот, присутствующих в молоке (исходная кислотность молока).

<i>I. Приготовление исходной смеси (в стаканчиках)</i>		
Реактивы и этапы	Опытная проба	Контрольная проба
1. Молоко, разбавленное водой (1:10)	10 мл	10 мл
2. Вода	-	1 мл
3. Липаза	1 мл	-
<i>II. Определение исходной кислотности молока</i>		
	Колба для титрования 1	Колба для титрования 2
1. Молоко (отбирают из стаканчика в колбу для титрования)	2 мл	2 мл
2. Фенолфталеин (добавляют в каждую колбу)	1-2 кап	1-2 кап
<i>Титруют пробы раствором NaOH (до розового цвета). Значения записывают в таблицу результатов (V_0 и V_0').</i>		
Поместить в термостат при температуре 37°C. Повторные титрования проводят через каждые 10 минут		
	Колба для титрования 1	Колба для титрования 2
1. Молоко	2 мл	2 мл
2. Фенолфталеин	1-2 кап	1-2 кап
<i>Быстро титруют раствором NaOH (до розового цвета). Значения записывают в таблицу результатов (V и V')</i>		

Оформление результатов

t, мин	Опытная проба (с липазой)		Контрольная проба (без липазы)	
	V(NaOH), мл	V-V ₀	V'(NaOH),мл	V'-V ₀ '
0	V ₀ =	0	V ₀ ' =	0
10	V =		V' =	
20				
30				

Пример графика динамики отщепления свободных ВЖК во времени в присутствии (кривая 1) и в отсутствие (кривая 2) липазы.



Указания к оформлению лабораторной работы

По полученным результатам строят кинетические кривые. Сделать вывод о зависимости скорости реакции от времени.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Как влияют ферменты на скорость реакции?
2. Как зависит скорость ферментативной реакции от времени?

Лабораторная работа 11

Сопоставление окислительно-восстановительных потенциалов рибофлавина и индикатора метиленового синего

Цель работы. Сравнить потенциал рибофлавина и метиленового синего.

Принцип метода. Для исследования окислительно-восстановительных потенциалов применяются индикаторы, меняющие свой цвет при определенном значении окислительно-восстановительного потенциала. Например, метиленовый синий (синий в окисленном состоянии) превращается в лейкометиленовый синий (бесцветный в восстановленной форме). Потенциал, возникающий в случае, если концентрация восстановленной формы равна концентрации окисленной формы, называется стандартным окислительно-восстановительным потенциалом E_0 . В физической химии его величину измеряют при pH 0, а в биохимии при pH 7 (обозначают его E_0^1). Индикатор метиленовый синий можно применять для обнаружения восстановленного НАД и восстановленных флавиновых ферментов.

Реактивы, исследуемый материал: 1) цинк гранулированный; 2) концентрированная соляная кислота; 3) 0,025% взвесь рибофлавина; 4) 0,01% раствор метиленового синего.

Ход работы. В пробирку вносят 4-6 капель воды, 1 каплю взвеси рибофлавина и по каплям метиленовый синий до синего или зеленовато-синего окрашивания раствора и затем - кусочек цинка и 2-3 капли концентрированной соляной кислоты (начинается выделение пузырьков водорода). По мере насыщения раствора водородом окислительно-восстановительный потенциал смеси постепенно снижается и происходит восстановление рибофлавина и метиленового синего. Восстановление всего имеющегося количества метиленового синего ($E_0=+0,11$ В) происходит раньше, чем восстановление значительной части внесенного в пробирку рибофлавина ($E_0= -0,20$ В), поэтому цвет жидкости переходит последовательно в зеленый, желто-зеленый, желтый, бледно-желтый или розовый и, наконец, жидкость обесцвечивается за счет восстановления рибофлавина в лейкосоединение. Бесцветную или розовую жидкость сливают в другую пробирку и наблюдают изменение окраски. Водород в жидкость больше не поступает, а растворенный в ней водород уходит в воздух и переносится через рибофлавин и метиленовый синий на кислород воздуха. В результате этого происходит постепенное повышение окислительно-восстановительного потенциала, после расходования в растворе водорода начинается окисление восстановленного рибофлавина. Он передает водород через индикатор метиленовый синий на кислород и желтеет (часть водорода поступает к кислороду, минуя индикатор). После этого начинается окисление лейкометиленового синего - раствор делается сначала зеленым (желтый и синий цвета дают в сумме зеленый) и затем синим.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе отметьте принцип работы, ход работы (кратко). Сделайте вывод о потенциалах рибофлавина и метиленового синего.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Почему восстановление водородом метиленового синего происходит раньше, чем рибофлавина?
2. Расположите переносчики дыхательной цепи в порядке возрастания их окислительно-восстановительного потенциала.

Лабораторная работа 12

Количественное определение АТФ и креатинфосфата в мышце

Цель работы. Выполнить количественное определение макроэргических соединений в мышцах.

Принцип метода. В мышечной ткани содержится два макроэргических соединения - АТФ и креатинфосфат, которые обеспечивают по мере надобности мышцу энергией.

Метод основан на том, что два последних остатка фосфорной кислоты в АТФ, богатые энергией, так же как и фосфорный остаток в креатинфосфате, легко отщепляется при непродолжительном гидролизе в кислой среде - так называемый лабильно связанный фосфор. Сравнение содержания неорганического фосфора в пробах до гидролиза и после гидролиза дает представление о количестве лабильно связанного фосфора, которое приходится на макроэргические соединения мышечной ткани. Количество фосфора определяют по цветной реакции с молибдатом аммония в присутствии аскорбиновой кислоты.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 2,5% раствор ТХУ; 2) 1 М раствор хлористоводородной кислоты; 3) 1 М раствор гидроксида натрия; 4) 1% раствор молибдата аммония; 5) 1% раствор аскорбиновой кислоты; 6) мышечная ткань животного.

Ход работы. 1. 0,5 г мышцы гомогенизируют во льду с 5 мл охлажденного 2,5% раствора ТХУ. Фильтруют в мерную пробирку. Осадок на фильтре промывают 5 мл холодной дистиллированной воды. Объем доводят до 10 мл.

2.

Реагенты	Опыт	Контроль
Безбелковый фильтрат, мл	0,5	0,5
HCl, мл	1,0	1,0
	Кипятить 10 мин (гидролиз фосфорных связей), охладить	Не кипятить
NaOH, мл	1,0	1,0
H ₂ O, мл	7,5	7,5
Перенести по 5 мл жидкости в другие пробирки		
Молибдат аммония, мл	0,5	0,5
Аскорбиновая кислота, мл	0,5	0,5
H ₂ O, мл	2,0	2,0
Смесь в пробирках перемешать, выдержать 10 мин при комнатной температуре		
Измерить оптическую плотность при длине волны 670 нм против воды		

В опытной пробе (после гидролиза) определяемый неорганический фосфор представляет собой сумму лабильно связанного фосфора и фосфатных солей, присутствующих в тканях. В контрольной пробе - только фосфатные соли.

3. Вычитают из оптической плотности, найденной для опытной пробы, оптическую плотность, полученную для контрольной пробы. Концентрацию лабильно связанного неорганического фосфора в пробе находят по калибровочному графику.

Расчет. Рассчитывают количество лабильно связанного фосфора в мг на 1 кг сырой ткани, учитывая разведение:

$$X = A \times 3,3 \times 400 \times 1000$$

где X - содержание макроэргических соединений в пересчете на 1 мг АТФ в 1 кг сырой ткани, А - содержание АТФ в пробе, мг; $3,3 \times 400$ - коэффициент пересчета на 1 г ткани с учетом разведения растворов.

Указания к оформлению лабораторной работы

Ход работы оформите в виде таблицы. Сделайте вывод о количественном содержании макроэргических соединений в мышцах.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Объясните принцип метода определения количества АТФ и креатинфосфата в биологическом материале.
2. Какое значение имеют макроэргические соединения?

Лабораторная работа 13

Обнаружение НАД в дрожжах

Цель работы. Доказать наличие НАД в дрожжах.

Принцип метода. НАД встречается во многих органах и тканях человека и животных, много его и в дрожжах. Этот кофермент легко извлекается из дрожжей горячей водой (он термостабилен) и может быть обнаружен по образованию флюоресцирующего комплекса с ацетоном. Эта реакция характерна для N-производных амида никотиновой кислоты. Она применяется для определения метилникотинамида в моче.

Реактивы, исследуемый материал: 1) ацетон; 2) 30% раствор гидроксида натрия; 3) концентрированная хлористоводородная кислота; 4) 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина; 5) дрожжи.

Ход работы. В пробирку поместить кусочек дрожжей величиной 4-5 мм, добавить 1/3 пробирки воды и кипятить 20-30 с, не допуская выбрасывания жидкости. Отфильтровать в пустую пробирку 5-10 капель полученного экстракта, добавить 3-5 капель ацетона и 1-2 капли раствора гидроксида натрия. Оставить пробирку стоять 2 мин; затем добавить 1 каплю раствора фенолфталеина и по каплям соляную кислоту до обесцвечивания фенолфталеина. Пробирку в процессе добавления кислоты встряхивать. Поместить пробирку на 2 мин в кипящую водяную баню, затем охладить и поднести к включенному флюориметру. Ацетоновый комплекс НАД флюоресцирует синим светом.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе отметьте принцип работы, ход работы (кратко). Сделайте вывод о свойствах НАД.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Какое значение в биологических системах имеет НАД⁺?
2. Дайте характеристику пиридинзависимым дегидрогеназам и объясните механизм переноса протонов и электронов.

Лабораторная работа 14

Обнаружение каталазы в крови

Цель работы. Доказать наличие каталазы в крови.

Принцип метода. При окислительных процессах может образовываться перекись водорода, которая разлагается ферментом каталазой (содержится в различных клетках, включая клетки крови) на воду и молекулярный кислород.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 3% раствор перекиси водорода; 2) кровь.

Ход работы. В пробирку внести 10-15 капель перекиси водорода и 3 капли крови. Отметить выделение пузырьков кислорода. При внесении в пробирку тлеющей лучинки она вспыхивает, так как выделяющийся кислород усиливает горение.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе отметьте принцип работы, ход работы (кратко). Сделайте вывод о наличии каталазы в крови.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Объясните принцип реакции обнаружения каталазы
2. Какое значение имеет фермент каталаза? Дайте характеристику ферменту, напишите реакцию, катализируемую каталазой.

Лабораторная работа 15

Обнаружение сукцинатдегидрогеназы

Цель работы. Доказать присутствие сукцинатдегидрогеназы в мышцах.

Принцип метода. Сукцинатдегидрогеназа – интегральный фермент внутренней мембраны митохондрий и катализирует реакцию окисления сукцината до фумарата. Обнаружение сукцинатдегидрогеназы основано на

способности продукта этой реакции ФАДН₂ восстанавливать в искусственно созданных системах метиленовую синь или 2,6-дихлорфенолиндофенол.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,001 н раствор раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола; 2) 1% раствор янтарной кислоты, нейтрализованной гидроксидом натрия, рН слабощелочная.

Ход работы: 1-2 г мышцы измельчают и растирают в ступке с небольшим количеством воды. Полученную кашицу переносят на двойной слой марли, промывают 25 мл дистиллированной воды и отжимают. В пробирку вносят 1 мл суспензии мышечной ткани, 1 мл сукцината и несколько капель метиленового синего или 2,6-дихлорфенолаиндофенола. Наблюдают за изменением окраски реакционной среды.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе записать принцип метода, уравнение реакции и сделать вывод о наличии сукцинатдегидрогеназы.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. На чем основан принцип обнаружения сукцинатдегидрогеназы?
2. В каком процессе участвует фермент сукцинатдегидрогеназа и какое он имеет строение?

Лабораторная работа 16

Обнаружение дегидрогеназы глицеральдегид-3-фосфата в дрожжах

Цель работы. Определить наличие дегидрогеназы глицеральдегид-3-фосфата в дрожжах.

Принцип метода. Глицеральдегид-3-фосфат в ходе анаэробного превращения глюкозы дегидрогеназой глицеральдегид-3-фосфата окисляется в 1,3-бисфосфоглицериновую кислоту. При этом происходит восстановление НАД⁺, который можно обнаружить по восстановлению метиленового синего в лейкосоединение.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 2% раствор глюкозы; 2) дрожжи; 3) 0,002% раствор метиленового синего.

Ход работы. В пробирку вносят кусочек дрожжей, величиной с горошину, несколько капель раствора глюкозы, растирают содержимое стеклянной палочкой до получения равномерной взвеси. Добавляют каплю раствора метиленового синего, перемешивают содержимое пробирки стеклянной палочкой. Наблюдается обесцвечивание метиленового синего, начинающееся со дна пробирки.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Какая реакция является источником образования глицеральдегид-3-фосфата?
2. Дайте характеристику гликолиза.

Лабораторная работа 17

Обнаружение молочной кислоты в мышечной ткани реактивом Уффельмана

Цель работы. Доказать наличие молочной кислоты в мышечной ткани.

Принцип метода. Молочная кислота является конечным продуктом распада глюкозы в анаэробных условиях. Молочная кислота взаимодействует с

комплексным соединением фенолята железа фиолетового цвета и образуется лактат железа желтовато-зеленого цвета.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,5% раствор молочной кислоты; 2) 1% раствор хлорного железа; 3) 1% раствор фенола; 4) мышечная ткань.

Ход работы. 1 г мышц растирают до гомогенного состояния в ступке с небольшим количеством кварцевого песка в течение 3 мин, добавив 5 капель воды. Затем приливают 3 мл дистиллированной воды и фильтруют. К 15 каплям фильтрата добавляют по каплям реактив Уффельмана (20 капель фенола + 2 капли 1% раствора хлорного железа) до появления фиолетовой окраски. В присутствии молочной кислоты фиолетовая окраска жидкости переходит в желто-зеленую, так как образуется лактат железа. Для сравнения проводят реакцию Уффельмана с раствором молочной кислоты и наблюдают развитие желто-зеленого окрашивания.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Напишите реакцию образования молочной кислоты и объясните ее значение. Рассчитайте энергетический баланс анаэробного окисления глюкозы.
2. Опишите цикл Кори и объясните его значение для организма.

Лабораторная работа 18

Обнаружение альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата

Цель работы. Выявить наличие альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата в дрожжах.

Принцип метода. Альдолаза фруктозо-1,6-бисфосфата катализирует обратимую реакцию расщепления фруктозо-1,6-бисфосфата на дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат. В щелочной среде происходит отщепление фосфатов с образованием дигидроксиацетона и глицеральдегида, которые вступают в реакцию с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов. Динитрофенилгидразоны в щелочной среде имеют коричнево-красное окрашивание с максимум поглощения 535-540 нм.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 10% раствор сахарозы; 2) 0,1% раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 2 М растворе хлористоводородной кислоты; 3) 0,75 М раствор гидроксида натрия; 4) дрожжи.

Ход работы. В пробирку вносят 20-30 капель раствора сахарозы, 0,5 г дрожжей, размешивают и ставят в водяную баню на 15-20 мин при температуре 35-40°C. Затем отмеряют 1,0 мл бродильной смеси, добавляют 1 мл 0,75М гидроксида натрия и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. При этом происходит отщепление щелочно-лабильного фосфора от фосфотриоз. Нефосфорилированные триозы дают более стойкое окрашивание, чем их фосфорные эфиры.

К содержимому пробирок добавляют 1 мл 2,4-динитрофенилгидразина и помещают в водяную баню при температуре 38°C на 10 мин, доводят раствором щелочи до 10 мл и наблюдают за окраской.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Объясните принцип обнаружения альдолазы фруктозо-1,6-бисфосфата.
2. Напишите реакцию, катализируемую альдолазой фруктозо-1,6-бисфосфата.

Лабораторная работа 19

Обнаружение крахмала в зеленых листьях растений

Цель работы. Доказать наличие крахмала в зеленых листьях растений.

Принцип метода. Крахмал может быть обнаружен только в зеленых листьях растений.

Реактивы, исследуемый материал: 1) этиловый спирт; 2) 1% раствор йода; 3) зеленый и пожелтевший листья.

Ход работы. В две пронумерованные пробирки помещают: в первую – зеленый лист растения, во вторую – желтый. В обе пробирки наливают по 1-2 мл дистиллированной воды и кипятят 2-3 мин. Горячую воду сливают и в пробирки наливают по 1 мл этилового спирта. Пробирки кипятят на водяной бане 3-5 мин при ежеминутном встряхивании. Хлорофилл зеленого листа и ксантофилл желтого листа переходят в спирт, и листья обесцвечиваются. Окрашенный спирт сливают, а листья промывают несколько раз дистиллированной водой. Затем в каждую пробирку наливают 3-4 мл дистиллированной воды и кипятят их на водяной бане для размягчения тканей листа. Через 5-10 мин воду сливают, листья помещают на фильтровальную бумагу и наносят на них несколько капель раствора йода. Наблюдают появление синих точек, а затем посинение всего листа при наличии крахмала.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе отметить принцип работы, кратко записать ход работы, полученные результаты и сделать выводы.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Как можно обнаружить крахмал в зеленых растениях?
2. В результате какого процесса образуется крахмал?

Лабораторная работа 20

Обнаружение редуцирующих веществ в вытяжке из моркови

Цель работы. Выявить редуцирующие вещества в моркови.

Принцип метода. При нагревании водной вытяжки из моркови с реактивом Фелинга появляется желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди, что обусловлено наличием глюкозы и других редуцирующих веществ, способных восстанавливать гидрат окиси меди в закись.

Реактивы, исследуемый материал: 1) реактив Фелинга; 2) морковь

Ход работы. Морковь натирают на терке, около 0,5 г полученной массы помещают в пробирку, добавляют 2 мл воды и кипятят 3-4 мин. Жидкость отфильтровывают. С фильтратом (10-20 капель) проделывают реакцию Фелинга.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе отметить принцип работы, кратко записать ход работы, полученные результаты и сделать выводы.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Что такое редуцирующие вещества?
2. Какой реакцией можно обнаружить редуцирующие вещества?

Лабораторная работа 21

Обнаружение ненасыщенных жирных кислот в растительном масле

Цель работы. Доказать присутствие ненасыщенных жирных кислот в растительном масле.

Принцип метода. При добавлении бромной воды к подсолнечному маслу желтая окраска брома исчезает, что обусловлено наличием в растительном масле ненасыщенных жирных кислот, присоединяющих бром по месту двойной связи.

Реактивы, исследуемый материал: 1) бромная вода; 2) подсолнечное масло

Ход работы. К 3 каплям подсолнечного масла добавляют 2 капли бромной воды. После встряхивания окраска брома исчезает.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе отметить принцип работы, кратко записать ход работы, полученные результаты и сделать выводы.

Лабораторная работа 22

Влияние желчи на активность липазы

Цель работы. Оценить влияние желчи на активность липазы.

Принцип метода. Липаза - фермент, который расщепляет жиры при pH 9,0. Липаза гидролитически расщепляет пищевые жиры и в первую очередь эфирную связь в α -положении. Скорость действия липазы в отдельных порциях жира молока можно узнать по количеству жирных кислот, образующихся при гидролизе жира за определенный промежуток времени. Количество жирных кислот определяют титрованием щелочью в присутствии фенолфталеина. В случае добавления в пробу желчи липаза активируется, и гидролиз жиров молока протекает с большей скоростью. Результаты определения выражают в миллилитрах титрованного раствора щелочи, и строят график, где на оси ординат откладывают количество 0,05 М раствора щелочи, пошедшей на нейтрализацию жирных кислот, в миллилитрах, а на оси абсцисс - время в минутах.

Значение первого титрования (время реакции «0») вычитают из величины последующих титрований. В этом случае полученные графики пройдут через начало координат, так как вычитается исходное количество органических кислот, присутствующих в молоке (исходная кислотность молока). Полученные результаты оформляют в виде графика, показывающего динамику отщепления свободных жирных кислот во времени под действием липазы и желчи (см. лабораторное занятие № 6).

Реактивы, исследуемый материал: 1) 5% раствор панкреатина; 2) 0,5% спиртовой раствор фенолфталеина; 3) 0,05 М раствор гидроксида натрия; 4) молоко, прокипяченное и разведенное дистиллированной водой 1:1; 5) желчь

Ход работы

Реактивы	Контроль	Опыт
Молоко, мл (колбы)	10,0	10,0
Панкреатин, мл	1,0	1,0
H ₂ O, мл	1,0	-
Желчь, мл	-	1,0

Из каждого стакана отобрать по 1 мл в колбы		
Фенолфталеин, капли	1-2	1-2
Титровать раствором гидроксида натрия до слабо-розовой окраски, исчезающей в течение 30 сек		
Оба стакана с оставшейся смесью поместить в термостат при 38°C		
Через каждые 10 мин из стакана отбирать по 1,0 мл смеси (5-6 раз), добавлять по 1-2 капли фенолфталеина и титровать раствором гидроксида натрия до слабо-розовой окраски		

Оформление результатов

t, мин	Опыт (с желчью)		Контроль (без желчи)	
	V(NaOH), мл	V-V ₀	V'(NaOH), мл	V'-V ₀ '
0	V ₀ =	0	V ₀ ' =	0
10	V =		V' =	
20				
30				

Указания к оформлению лабораторной работы

На основании полученных данных о влиянии желчи на активность липазы построить две кривые (на одном графике), отражающие процесс гидролиза жира под действием фермента липазы во времени и в зависимости от наличия или отсутствия желчи. Сделать вывод о влиянии желчи на активность липазы.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Назовите функции желчи.
2. Как влияет желчь на активность липазы?

Лабораторная работа 23

Качественные реакции на желчные кислоты

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на желчные кислоты.

Принцип метода. Присутствие желчных кислот можно открыть реакцией Петтенкофера. Желчные кислоты дают пурпурное окрашивание с оксиметилфуролом, образующимся из фруктозы, в присутствии концентрированной серной кислоты.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 20% раствор сахарозы; 2) серная кислота концентрированная; 3) желчь, разведенная водой в 2 раза.

Ход работы. На сухое часовое стекло нанести 1 каплю желчи и 1 каплю раствора сахарозы, хорошо перемешать стеклянной палочкой. Рядом нанести 3 капли концентрированной серной кислоты (стекло не сдвигать с места). Через некоторое время на месте слияния капель наблюдать развитие красной окраски, переходящей при стоянии в красно-фиолетовую.

Лабораторная работа 24

Качественные реакции на кетоновые тела

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на кетоновые тела.

1. Проба Легалья

Принцип метода. Ацетон и ацетоуксусная кислота в щелочной среде образуют с нитропруссидом оранжево-красное окрашивание. После подкисления концентрированной уксусной кислотой образуется соединение вишневого цвета.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 5% раствор нитропруссид натрия; 2) концентрированная уксусная кислота; 3) 10% раствор гидроксида натрия; 4) моча

Ход работы. В пробирку внести 10 капель мочи, 3-4 каплю раствора гидроксида натрия и 1-2 капли свежеприготовленного нитропруссид натрия. Наблюдается появление оранжево-красного окрашивания. Добавить 3 капли концентрированной уксусной кислоты - появится вишневое окрашивание.

2. Проба Ланге

Реактивы, исследуемый материал: 1) 5% раствор нитропруссид натрия; 2) концентрированная уксусная кислота; 3) концентрированный аммиак; 4) моча.

Ход работы. В пробирку внести 10 капель мочи, 2 капли концентрированной уксусной кислоты и 1-2 капли свежеприготовленного 5% раствора нитропруссид натрия. Пробирку наклонить под углом 45° и осторожно по стенке налить равный объем концентрированного аммиака. На границе образуется красно-фиолетовое или фиолетовое кольцо.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип, ход работы, результаты и сделайте вывод.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Перечислите кетоновые тела и назовите их функцию в организме.
2. К каким последствиям приводит накопление кетоновых тел?

Лабораторная работа 25

Качественные реакции на холестерол

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на холестерол.

1. Реакция Либермана-Бурхарда

Принцип метода. Раствор холестерола в хлороформе дает с уксусным ангидридом и концентрированной серной кислотой красное окрашивание, переходящее затем в синее и зеленое.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 1% хлороформный раствор холестерола; 2) концентрированная серная кислота; 3) уксусный ангидрид.

Ход работы. В пробирку внести 1 каплю хлороформного раствора холестерола, добавить 1 каплю уксусного ангидрида и каплю концентрированной серной кислоты. Развивается синяя, а затем зеленая окраска.

2. Обнаружение ненасыщенной связи в молекуле холестерола.

Принцип метода. Ненасыщенную связь в молекуле холестерола можно обнаружить по обесцвечиванию бромной воды.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 1% хлороформный раствор холестерола; 2) бромная вода.

Ход работы. В пробирку внести 10-15 капель хлороформного раствора холестерола, добавить 2 капли бромной воды. При встряхивании содержимого пробирки происходит обесцвечивание бромной воды.

3. Реакция Сальковского

Принцип метода. Под действием концентрированной серной кислоты происходит дегидратация холестерола, конденсация образовавшихся продуктов в виде непредельных углеводов, соединяющихся с образованием окрашенных продуктов.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 1% хлороформный раствор холестерина; 2) концентрированная серная кислота.

Ход работы. В пробирку внести 1 каплю хлороформного раствора холестерина и добавить 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется красное окрашивание.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип, ход работы, результаты и сделайте вывод.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Опишите функции холестерина в организме.
2. Дайте характеристику транспортных форм липидов в организме.

Лабораторная работа 26

Рефрактометрическое определение белка

Цель работы. Определить содержание белка в растворе рефрактометрическим методом.

Принцип метода: Определяется коэффициент преломления раствора. Поскольку степень рефракции раствора обусловлена количеством находящихся в нем частиц, коэффициент преломления достаточно точно свидетельствует о количественном содержании в нем белка.

Реактивы, исследуемый материал: 1) раствор белка; 2) дистиллированная вода.

Ход работы. Перед началом работы с прибором проверяют нулевую точку нанесением 1-2 капель дистиллированной воды на полированную поверхность измерительной призмы. Лупу шкалы и окуляр зрительной трубы устанавливают на резкость так, чтобы четко были видны поле зрения и визирные линии. Дисперсию в окуляре зрительной трубы устраняют вращением рукоятки дисперсионного компенсатора.

Линию лупы шкалы устанавливают на делении 1,333. Если граница светотени проходит через точку пересечения визирных линий, то прибор установлен на нуль. Если этого нет, то при помощи ключа устанавливают границу светотени на точку пересечения визирных линий.

После проверки нулевой точки приподнимают верхнюю половину камеры и вытирают обе призмы фильтровальной бумагой, а затем досуха мягкой, не ворсистой салфеткой. Затем на поверхность призмы наносят 1-2 капли раствора и быстро закрывают камеру. Зеркалом направляют свет в окно камеры и поворачивают камеру до тех пор, пока граница светотени не появится в поле зрения прибора. Вращением винта устраняют окрашенность поля и достигают резкой границы светотени, которую затем устанавливают на точке пересечения визирных линий. Затем по шкале с помощью лупы проводят отсчет показаний преломления раствора.

Расчет. По величине коэффициента преломления в таблице находят процентное содержание белка.

Таблица для вычисления процентного содержания белка по коэффициенту преломления

Показания рефрактометра	% белка	Показания рефрактометра	% белка	Показания рефрактометра	% белка
1,33705	0,63	1,34612	5,90	1,35496	11,04
1,33743	0,86	1,34650	6,12	1,35532	11,25
1,33781	1,08	1,34687	6,34	1,35568	11,46

1,33820	1,30	1,34724	6,55	1,35604	11,67
1,33858	1,52	1,34761	6,77	1,35640	11,88
1,33896	1,74	1,34798	6,98	1,35676	12,09
1,33934	1,96	1,34836	7,20	1,35712	12,30
1,33972	2,18	1,34873	7,42	1,35748	12,51
1,34010	2,40	1,34910	7,63	1,35784	12,72
1,34048	2,62	1,34947	7,85	1,35820	12,93
1,34086	2,84	1,34984	8,06	1,35856	13,14
1,34124	3,06	1,35021	8,28	1,35892	13,35
1,34162	3,28	1,35058	8,49	1,35928	13,56
1,34199	3,50	1,35095	8,71	1,35964	13,77
1,34237	3,72	1,35132	8,92	1,36000	13,98
1,34275	3,94	1,35169	9,14	1,36036	14,19
1,34313	4,16	1,35205	9,35	1,36072	14,40
1,34350	4,38	1,35242	9,57	1,36108	14,61
1,34388	4,60	1,35279	9,78	1,35144	14,82
1,34426	4,81	1,35316	9,99		
1,34463	5,03	1,35352	10,20		
1,34500	5,25	1,35388	10,41		
1,34537	5,47	1,35424	10,62		
1,34575	5,68	1,35460	10,83		

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип, показания рефрактометра и сделайте вывод о содержании белка в исследуемом растворе.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. На чем основан принцип рефрактометрического определения белков?
2. Дайте классификацию белков и назовите функции белков.

Лабораторная работа 27

Определение мочевины в сыворотке крови диацетилмонооксимным методом

Цель работы. Количественно определить содержание мочевины в сыворотке крови и сравнить результат с нормой.

Принцип метода. Мочевина образует с диацетилмонооксимом в присутствии тиосемикарбазида и ионов Fe^{3+} в сильнокислой среде красный комплекс, который фотометрируют.

Реактивы, исследуемый материал: 1) цветной реагент, содержащий диацетилмонооксим, тиосемикарбазид, соль трехвалентного железа, серную кислоту; 2) стандартный раствор мочевины; 3) сыворотка крови.

Ход работы.

Реактивы, исследуемый материал	Опыт	Стандарт	Контроль
Сыворотка, мл	0,01	-	-
Стандартный раствор, мл	-	0,01	
Цветной реагент	2,0	2,0	2,0

Реактивы, исследуемый материал	Опыт	Стандарт	Контроль
Закрывать крышками из алюминиевой фольги, нагревать 10 мин на кипящей водяной бане			
Охладить в струе холодной воды			
Измерить оптическую плотность опытной пробы (E_0) и стандартной пробы ($E_{ст.}$) против контрольной (холостой) пробы при длине волны 540 нм в кювете с длиной оптического пути 5 мм. Фотометрию проводить в течение 15 минут после охлаждения растворов.			

Расчет проводят по формуле: $C_{оп} = E_{оп} / E_{ст.} \times C_{ст.}$, где $C_{оп}$ – концентрация мочевины в сыворотке крови, ммоль/л; $C_{ст.}$ – концентрация мочевины в стандартном растворе, $E_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы; $E_{ст.}$ – оптическая плотность стандартной пробы. В норме содержание мочевины в сыворотке крови составляет 2,50-8,33 ммоль/л.

Меры предосторожности при работе. В цветном реакгенте содержится ядовитый тиосемикарбазид. При работе с ним необходимо соблюдать действующие правила обращения с ядовитыми веществами в химических лабораториях. Первая помощь: при приеме внутрь организма необходимо выпить 0,5 л воды и вызвать рвоту.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе опишите принцип работы, ход работы. Рассчитайте содержание мочевины в сыворотке крови. Сделайте вывод, соответствует ли полученный результат норме.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Назовите нормы содержания мочевины в сыворотке крови.
2. Где происходит синтез мочевины и о чем говорит увеличение содержания мочевины в сыворотке крови?

Лабораторная работа 28

Спектрофотометрическое определение суммарного содержания нуклеиновых кислот

Цель работы. Определить суммарное содержание нуклеиновых кислот спектрофотометрическим методом.

Принцип метода. В основе спектрофотометрического метода определения суммарного содержания нуклеиновых кислот, разработанного 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.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,2 М и 0,5 М растворы хлорной кислоты; 2) мышечная ткань

Ход работы. 100-200 мг измельченной на холоду ткани помещают в центрифужную пробирку с 5-10 мл охлажденного 0,2 М раствора хлорной кислоты. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и осадок отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин при охлаждении. Центрифугат отбрасывают и осадок повторно отмывают хлорной кислотой. Такая обработка необходима для удаления кислоторастворимых нуклеотидов. К осадку добавляют 5-10 мл 0,5 М раствора хлорной кислоты и, закрыв пробирку пробками

с воздушными холодильниками, нагревают их в кипящей водяной бане 30 мин. Эта процедура необходима для количественной экстракции нуклеиновых кислот из исследуемой ткани и кислотного гидролиза. Гидролизаты охлаждают и центрифугируют. Осадок подвергают повторной экстракции 0,5 М раствором хлорной кислоты. Гидролизаты объединяют, учитывают объем и определяют поглощение на спектрофотометре при 270 и 290 нм против 0,5 М раствора хлорной кислоты. При необходимости гидролизат разводят тем же раствором. Рассчитывают содержание фосфора нуклеиновых кислот в 1 мл исследуемого раствора по формуле: $C_{\text{мкг фосфора}} = A_{270} - A_{290}/0,19$, 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 учитывают общий объем гидролизата и разведения. Для пересчета количества нуклеинового фосфора на количество нуклеиновых кислот пользуются пересчетным коэффициентом 10,3: $C_{\text{мкг НК}} = C_{\text{мкг фосфора}} \cdot 10,3$.

Указания к оформлению лабораторной работы

Сделайте вывод о суммарном содержании нуклеиновых кислот в мышечной ткани.

Лабораторная работа 29

Изучение состава нуклеопротеинов

Цель работы. Доказать строение нуклеопротеидов. Ознакомиться с качественными реакциями на компоненты нуклеотидов.

Принцип метода. 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 нуклеопротеинов проводят на примере дрожжей, которые подвергают гидролизу с последующим изучением его продуктов (полипептидов, пуриновых, пиримидиновых оснований, углеводных компонентов и фосфорной кислоты).

Реактивы, исследуемый материал: 1) 10% раствор серной кислоты; 2) 10% раствор гидроксида натрия; 3) 1% раствор сульфата меди; 4) аммиак концентрированный; 5) 2% раствор нитрата серебра; 6) молибденовый реактив; 7) концентрированная серная кислота; 8) 1% раствор спиртовой раствор тимола; 9) 0,2% спиртовой раствор α -нафтола; 10) 1% дифениламинный реактив; 11) дрожжи.

Ход работы.

1. *Проведение гидролиза.* В круглодонную колбу на 100 мл помещают 1 г свежих или 0,2 г сухих пекарских дрожжей, приливают 20 мл 10% раствора серной кислоты и 20 мл дистиллированной воды. Колбу закрывают пробкой с воздушным холодильником, закрепляют с небольшим наклоном и кипятят под тягой 1 час. Охлаждают, доводят объем до первоначального значения дистиллированной водой, отфильтровывают через складчатый фильтр.

2. *Биуретовая реакция на полипептиды.* К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 10 капель 10% раствора NaOH и 1–2 капли 1%-го раствора CuSO_4 до появления сине-фиолетового или красно-фиолетового окрашивания.

3. *Серебряная проба на пуриновые основания.* К 10 каплям гидролизата добавляют по каплям крепкий раствор аммиака – приблизительно 10 капель до

щелочной реакции (по лакмусу, опущенному в пробирку), затем добавляют 10 капель 2% аммиачного раствора нитрата серебра. При стоянии через 3-5 минут образуется светло-коричневый осадок серебряных солей пуриновых оснований (содержимое пробирки перемешивать при стоянии не надо).

4. *Качественная реакция на пентозу (Молиша).* К 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют 3 капли 1% спиртового раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно приливают 20-30 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется продукт конденсации фурфурола с тимолом красного цвета.

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

6. *Реакция на дезоксирибозу и рибозу.* Дифениламин с дезоксирибозой дает синее окрашивание, а с раствором рибозы – зеленое. К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 20 капель 1% раствора дифениламина и кипятят в водяной бане в течение 15 минут; при этом образуется сине-зеленое окрашивание.

7. *Молибденовая проба на фосфорную кислоту.* К 10 каплям гидролизата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят. При этом жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет (не осадок). Пробирку сразу охлаждают в струе холодной воды. На дне пробирки появляется кристаллический лимонно-желтый осадок фосфорномолибденовокислого аммония.

Указания к оформлению лабораторной работы

Кратко оформите ход лабораторной работы. Сделайте вывод о составе нуклеопротеинов.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Как проводится гидролиз нуклеиновых кислот?
2. Какие реакции позволяют обнаружить состав нуклеопротеинов?

Лабораторная работа 30

Определение мочевой кислоты по методу Мюллера-Зейфerta

Цель работы. Количественно определить содержание мочевой кислоты в крови и сравнить полученное значение с нормой.

Принцип метода. Метод основан на колориметрировании окрашенных продуктов, образующихся при восстановлении фосфорно-вольфрамового реактива мочевой кислоты.

Реактивы, исследуемый материал: 1) фосфорновольфрамовый реактив (реактив Фолина); 2) 20% раствор трихлоруксусной кислоты; 3) стандартный раствор мочевой кислоты; 4) насыщенный раствор углекислого натрия; 5) сыворотка крови.

Ход работы.

Реактивы	Опыт	Стандарт
Сыворотка (в центрифужную пробирку)	1,5 мл	-
Стандартный рабочий раствор мочевой кислоты	-	0,5 мл
H ₂ O	1,5 мл	0,5 мл
ТХУ	1,5 мл	0,5 мл

Перемешать, экспозиция 30 мин		
Центрифугировать 5 мин		
Центрифугат	1,5 мл	-
Насыщенный раствор углекислого натрия	0,7 мл	0,7 мл
Реактив Фолина	1 кап	1
Экспозиция 10 мин		
Колориметрировать на КФК при λ 540±10, кювета 5 мм против H ₂ O		

Расчет провести по формуле:

$$C_x = \frac{C_{ст.} \cdot E_{оп.}}{E_{ст.}} \cdot 5,94$$

где – C_x – концентрация мочево́й кислоты в сыворотке (35оль/л); концентрация мочево́й кислоты в стандартной пробе (г/л); $E_{оп.}$ – оптическая плотность пробы; $E_{ст.}$ – оптическая плотность стандартной пробы. 5,94 – коэффициент перерасчета концентрации мочево́й кислоты в крови.

Указания к оформлению лабораторной работы

Протокол лабораторной работы оформите в виде таблицы. Сделайте вывод о содержании мочево́й кислоты в сыворотке крови.

Контрольные вопросы по лабораторной работе

1. Назовите нормы содержания мочево́й кислоты в сыворотке крови.
2. Что является источником образования мочево́й кислоты?

Лабораторная работа 31

Качественные реакции на адреналин

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на адреналин. Доказать наличие ядра пирокатехина в молекуле адреналина.

1. Реакция на адреналин с хлорным железом

Принцип метода. Адреналин обладает слабощелочной реакцией, легко окисляется на воздухе с образованием адренохрома, вследствие чего раствор с хлорным железом окрашивается в зеленый цвет. Реакция с хлорным железом характерна для пирокатехинового кольца, входящего в молекулу адреналина.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,1% раствор адреналина; 2) 1% раствор хлорного железа; 3) 10% раствор гидроксида натрия.

Ход работы: В пробирку налить 10 капель раствора адреналина и добавить 1 каплю хлорного железа. Наблюдается зеленое окрашивание вследствие присутствия пирокатехина в молекуле адреналина. При добавлении 1 капли раствора гидроксида натрия, наблюдается вишнево-красное окрашивание.

1. Реакция на адреналин с йодистым калием

Реактивы, исследуемый материал: 1) 1% раствор йодита калия; 2) 10% раствор уксусной кислоты; 3) 0,1% раствор адреналина.

Ход работы. К 0,5 мл раствора адреналина прибавить 1 мл 1% раствора йодита калия, 10 капель 10% раствора уксусной кислоты и смесь подогреть до температуры 60-65°C. Появляется интенсивное красно-фиолетовое окрашивание.

3. Реакция адреналина с нитритно-молибденовым реактивом

Реактивы, исследуемый материал: 1) 5% раствор хлористоводородной кислоты; 2) нитритно-молибденовый реактив (5 г нитрита натрия и 5 г молибдата натрия)

растворяют в 50 мл дистиллированной воды); 3) 10% раствор гидроксида натрия; 4) концентрированная хлористоводородная кислота; 5) 0,1% раствор адреналина.

Ход работы. В пробирку налить 1 мл водного раствора адреналина, 1 мл 5% раствора хлористоводородной кислоты, 1 мл нитритно-молибденового реактива и смесь перемешать. Развивается желто-оранжевое окрашивание. При добавлении нескольких капель 10% раствора гидроксида натрия появляется малиново-красная окраска, переходящая при внесении нескольких капель концентрированной соляной кислоты в лимонно-желтую.

1. Флюоресценция продуктов окисления адреналина

Принцип метода. Адреналин, окисляясь кислородом воздуха, при добавлении щелочи дает флюоресцирующие продукты.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,1% раствор адреналина; 2) 10% раствор гидроксида натрия.

Ход работы. К 10 каплям воды прилить 6 капель раствора гидроксида натрия и 2-4 капли раствора адреналина. Поместив пробирку перед включенным флюороскопом, наблюдают зеленую флюоресценцию продуктов окисления адреналина.

1. Доказательство наличия ядра пирокатехина в молекуле адреналина

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,05% раствор пирокатехина; 2) 3% раствор хлорида железа; 3) 0,1% раствор адреналина.

Ход работы: В одну пробирку налить 2 мл раствора адреналина, в другую – 2 мл пирокатехина. В обе пробирки добавить несколько капель раствора хлорида железа. В обеих пробирках появляется изумрудно-зеленое окрашивание.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе отметьте принцип метода, ход работы. Сделайте выводы о химическом строении изучаемого гормона.

Лабораторная работа 32

Качественные реакции на инсулин

Цель работы. Доказать белковую природу инсулина.

Инсулин дает характерные реакции на белок: биуретовую, ксантопротеиновую, Фоля, Миллона и др.

1. Биуретовая реакция

Реактивы, исследуемый материал: 1) 10% раствор гидроксида натрия; 2) 1% раствор сульфата меди; 3) раствор инсулина.

Ход работы. К 5 каплям раствора инсулина прибавить 5 капель 10% раствора гидроксида натрия, 2 капли 1% раствора сульфата меди и перемешать. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовый цвет.

2. Нингидриновая реакция

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,1% раствор нингидрина; 2) раствор инсулина.

Ход работы. К 5 каплям раствора инсулина прибавить 5 капель раствора 0,1% раствора нингидрина и прокипятить 1-2 минуты. Появляется розово-фиолетовое или сине-фиолетовое окрашивание.

3. Ксантопротеиновая реакция

Реактивы, исследуемый материал: 1) концентрированная азотная кислота; 2) 10% раствор гидроксида натрия; 3) раствор инсулина.

Ход работы. К 5 каплям раствора инсулина добавить 3 капли концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятить. Вначале образуется осадок свернувшегося белка (под влиянием кислоты), который при нагревании окрашивается в желтый цвет. После охлаждения в пробирку налить по каплям 10% раствор гидроксида натрия до появления оранжевого окрашивания вследствие образования натриевой соли динитротирозина.

4. Реакция Милона

Реактивы, исследуемый материал: 1) реактив Милона; 2) раствор инсулина.

Ход работы. К 5 каплям раствора инсулина прилить 3 капли реактива Милона. Появляется белый осадок. Содержимое пробирки осторожно нагреть. Осадок окрашивается в кирпично-красный цвет.

5. Реакция Фоля

Реактивы, исследуемый материал: 1) 30% раствор гидроксида натрия; 1) 5% раствор ацетата свинца; 3) раствор инсулина.

Ход работы. К 5 каплям раствора инсулина прибавить 5 капель 30% раствора гидроксида натрия и 1 каплю 5% раствора ацетата свинца, нагреть до кипения и дать постоять 1-2 минуты. При стоянии появляется бурый или черный осадок сернистого свинца.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе отметьте принципы качественных реакций, результаты, сделайте выводы о природе изучаемого гормона.

Лабораторная работа 33

Обнаружение йода в тиреоидине

Цель работы. Доказать наличие йода в молекуле тиреоидина.

Принцип метода. При кислотном гидролизе тиреоидина отщепляется йодистоводородная кислота, окисляемая в свободный йод. Экстрагируемый хлороформом йод окрашивает раствор в фиолетовый цвет.

Реактивы, исследуемый материал: 1) таблетки тиреоидина; 2) концентрированная азотная кислота; 3) 1% раствор йодноватокислого калия; 4) хлороформ.

Ход работы. В пробирку внести половину таблетки тиреоидина и 10 капель концентрированной азотной кислоты. Нагреть пробирку на горелке 1-2 мин. При переливании жидкости нагревание прекратить. В пробирку добавить 20 капель раствора йодноватокислого калия, перемешать, охладить. Добавить 10-15 капель хлороформа, встряхнуть. Нижний слой хлороформа окрасится в фиолетовый цвет.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе отметьте принцип качественной реакции, результаты, сделайте выводы о природе изучаемого гормона.

Лабораторная работа 34

Качественная реакция на фолликулин

Цель работы. Ознакомиться с качественной реакцией на фолликулин.

Принцип метода. Качественная реакция на фолликулин (эстрон) проводится с концентрированной серной кислотой и обусловлена образованием эфирного соединения соломенно-желтого цвета с зеленой флюоресценцией.

Реактивы, исследуемый материал: 1) масляный раствор фолликулина; 2) концентрированная серная кислота

Ход работы. С масляным раствором фолликулина реакцию проводят при комнатной температуре. К 2 каплям раствора фолликулина добавляют 30 капель концентрированной серной кислоты. Постепенно развивается соломенно-желтое окрашивание.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

Лабораторная работа 35

Качественное определение органических составных частей мочи

Цель работы. Изучить реакции, позволяющие обнаружить патологические компоненты мочи.

1. Определение белка. В норме в моче определяются следы белка.

1.1. Проба Геллера

Принцип метода. Под действием азотной кислоты белок образует нерастворимый осадок.

Реактивы, исследуемый материал: 1) концентрированная азотная кислот; 2) моча

Ход работы. В пробирку осторожно наливают около 1 мл концентрированной HNO_3 и сверху наслаивают 1 мл мочи. При наличии в моче белка на границе жидкостей появляется мутное беловатое кольцо.

1.2. Осаждение белка сульфосалициловой кислотой

Эта проба является самой чувствительной реакцией на белок.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 20% раствор сульфосалициловой кислоты; 2) моча.

Ход работы. К 20 каплям мочи добавляют 5 капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Выпадает осадок белка (помутнение раствора).

2. Определение глюкозы. В норме с мочой выделяется небольшое количество глюкозы. Для качественного определения глюкозы в моче пользуются следующими реакциями:

2.1. Реакция Троммера

Принцип метода. В щелочной среде в присутствии глюкозы при добавлении сульфата меди образуется желтый осадок гидрата закиси меди или красный осадок закиси меди.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 10% раствор гидроксида натрия; 2) 1% раствор сульфата меди; 3) моча

Ход работы. К 5 каплям исследуемой мочи прибавляют 5 капель 10% раствора гидроксида натрия и 5 капель 1 % раствора сернокислой меди. Нагревают до кипения.

2.2. Реакция Фелинга

Принцип метода. Метод основан на том же принципе, что и реакция Троммера. Преимущество этой реакции заключается в том, что сегнетова соль в

составе реактива Фелинга связывает избыток гидрата окиси меди, из которого при нагревании образуется окись меди черного цвета, мешающая реакции.

Реактивы, исследуемый материал: 1) реактив Фелинга; 2) моча

Ход работы. К 20 каплям исследуемой мочи приливают равный объем жидкости Фелинга и нагревают до кипения.

2.3. Реакция Ниландера

Принцип метода. В реактив Ниландера входит азотнокислый висмут. В щелочной среде образуется гидрат окиси висмута, который, восстанавливаясь в присутствии глюкозы до металлического висмута, окрашивает жидкость в черный цвет.

Реактивы, исследуемый материал: 1) реактив Ниландера; 2) моча

Ход работы. К 20 каплям исследуемой мочи приливают 10–20 капель реактива Ниландера и кипятят 1–2 мин. Жидкость бурлит, затем образуется черный осадок металлического висмута.

3. Определение кетоновых тел.

Принцип метода. Кетоновые тела обнаруживаются в моче при диабете, голодании и других ацидотических состояниях. Метод основан на цветной реакции, которую дают кетоновые тела с нитропруссидом натрия.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 10% раствор гидроксида натрия; 2) нитропруссид натрия; 3) концентрированная уксусная кислота.

Ход работы. К 2 каплям мочи добавляют 2 капли 10% гидроксида натрия и 2 капли нитропруссида натрия. Появляется оранжево-красное окрашивание. Добавляют 6 капель концентрированной уксусной кислоты. Появляется вишневое окрашивание.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод о наличии патологических компонентов мочи.

Лабораторная работа 36

Полуколичественное определение компонентов мочи с помощью тест-полосок

Цель работы. Определить компоненты мочи с помощью метода «сухой химии».

Диагностическая полоска позволяет определить в моче наличие лейкоцитов, нитритов, рН, белка, глюкозы, кетоновых тел.

Ход работы. Полоску опускают в образец мочи на 1–2 мин, затем извлекают, подсушивают края фильтровальной бумагой и прикладывают к стандартной шкале полуколичественных изменений на упаковке. Сравнивают окраски и делают вывод о наличии патологических примесей в моче.

Лабораторная работа 37

Качественные реакции на кортизол

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на кортизол.

1. Реакция с солянокислым фенолгидразином

Принцип метода. Благодаря наличию карбонильных групп, кортизон, реагируя с фенолгидразином, образует гидразон и озон.

Реактивы, исследуемый материал: 1) фенилгидразин солянокислый
2) 0,1% раствор преднизолона в этиловом спирте.

Ход работы. К 1 мл раствора преднизолона прибавить 5 мл раствора фенилгидразина и нагреть на водяной бане. Через несколько минут появляется желтое окрашивание.

2. Реакция с реактивом Фелинга

Кортизон способен восстанавливать закись меди из солей окиси.

Реактивы, исследуемый материал: 1) реактив Фелинга; 2) раствор преднизолона.

Ход работы. К 1 мл раствора преднизолона прибавить 1 мл жидкости Фелинга, нагреть на спиртовке. Выпадает красный осадок закиси меди.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

Лабораторная работа 38

Качественные реакции на витамин А

Цель работы. Выполнить качественные реакции на витамин А.

Принцип метода. Витамин А при взаимодействии с серной кислотой окрашивается в красно-фиолетовый или красно-бурый цвет, при взаимодействии с хлорным железом - в желто-зеленый цвет.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 3,44% масляный раствор ретинола ацетата; 2) концентрированная серная кислота; 3) хлороформ; 4) ледяная уксусная кислота, насыщенная сульфатом железа; 5) 0,05% масляный раствор витамина А в хлороформе.

Ход работы.

1. Реакция на витамин А с концентрированной серной кислотой

В сухую пробирку вносят 1 каплю раствора ретинола ацетата и 5 капель хлороформа, перемешивают и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Отмечают результат реакции.

2. Реакция на витамин А с хлорным железом.

В сухую пробирку внести 1 каплю ретинола ацетата и 5 капель хлороформа. Перемешать, добавить 3 капли хлорида железа. Отметить результат реакции.

3. Реакция на витамина А с сульфатом железа.

К 1-2 каплям хлороформного раствора витамина А добавить 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Каротины при этой реакции дают зеленоватое окрашивание.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод

Лабораторная работа 39

Обнаружение эргостерола в дрожжах

Цель работы. Доказать наличие эргостерола в дрожжах.

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

Реактивы, исследуемый материал: 1) дрожжи; 2) хлороформ; 3) уксусный ангидрид; 4) концентрированная серная кислота

Ход работы. Немного сухих дрожжей поместить в пробирку, добавить 15-20 капель хлороформа, встряхнуть. Полученный экстракт отфильтровать. К экстракту добавить 5 капель уксусного ангидрида и серной кислоты. Отметить результат реакции.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

Лабораторная работа 40

Качественные реакции на витамин Е

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на витамин Е.

1. Реакция на витамин Е с азотной кислотой

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

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,1% спиртовой раствор витамина Е; 2) концентрированная азотная кислота; 3) сахароза в порошке.

Ход работы. В сухую пробирку внести 6 капель 0,1% спиртового раствора витамина Е, добавить несколько крупинок сахарозы. Осторожно по стенке пробирки прибавить 10 капель концентрированной азотной кислоты. Пробирку слегка встряхнуть. Через 1-2 мин наблюдается красное или желтовато-красное окрашивание.

2. Реакция на витамин Е с хлоридом железа

Принцип метода. Спиртовой раствор витамина Е в присутствии хлорида железа (III) окисляется и раствор приобретает красное окрашивание.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,1% спиртовой раствор витамина Е; 2) 0,1% раствор хлорида железа.

Ход работы. К 2 каплям спиртового раствора витамина Е добавить 10 капель раствора хлорида железа, перемешать и нагреть на пламени спиртовки.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

Лабораторная работа 41

Качественные реакции на витамин С

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на витамин С.

Принцип методов. Реакции на витамин С основаны на ее способности вступать в окислительно-восстановительные реакции. Окисляясь, аскорбиновая кислота восстанавливает такие вещества, как железосинеродистый калий, метиленовую синь, молекулярный йод.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 10% раствор гидроксида натрия; 2) 10% раствор хлористоводородной кислоты; 3) 5% раствор железосинеродистого калия; 4) 1% раствор хлорного железа; 5) 0,01% раствор метиленового синего; 6) 10% раствор гидрокарбоната натрия; 7) раствор Люголя (0,1% раствор йода в растворе йодистого калия); 8) 1% раствор витамина С.

1. Реакция с железосинеродистым калием

Ход работы. В 2 пробирки внести по 1 капле 10% раствора гидроксида натрия и по 1 капле 5% раствора железосинеродистого калия. В одну пробирку добавить 5 капель 1% раствора витамина С, в другую – столько же воды, перемешать, добавить по 3 капли 10% раствора хлористоводородной кислоты и по 1 капле 1% раствора хлорного железа. В пробирке с витамином С образуется осадок берлинской лазури. В контрольной пробирке – бурое окрашивание, обусловленное образованием железосинеродистой соли окиси железа.

2. Реакция с метиленовым синим

Ход работы. В две пробирки внести по 1 капле 0,01% раствора метиленового синего, по 1 капле 10% раствора гидрокарбоната натрия. В одну из них добавить несколько капель раствора витамина С, в другую – 1 мл воды. В пробирке с витамином С происходит обесцвечивание метиленового синего (при нагревании).

3. Реакция с раствором Люголя

Ход работы. В две пробирки внести по 10 капель дистиллированной воды и по 2 капли раствора Люголя. В одну пробирку прибавить 10 капель дистиллированной воды, в другую – 10 капель раствора витамина С. В пробирке с витамином С раствор Люголя обесцвечивается в результате восстановления йода до йодистоводородной кислоты.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

Лабораторная работа 42

Количественное определение витамина С в продуктах по методу Тильманса

Цель работы. Определить содержание витамина С в различных продуктах.

Принцип метода. Количественное определение аскорбиновой кислоты основано на её способности окисляться 2,6-дихлорфенолиндофенолом в дегидроаскорбиновую кислоту. Определение проводится путём титрования исследуемой жидкости 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, в условиях, предохраняющих аскорбиновую кислоту от разрушения (кислая среда). Одному мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 1 мл 0,001 н. аскорбиновой кислоты, т.е. 0,0005 ммоль аскорбиновой кислоты (или 0,088 мг аскорбиновой кислоты).

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,001 н раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола; 2) 2% раствор хлористоводородной кислоты; 3) картофель; 5) лук; 6) молоко; 7) капуста.

Ход работы.

1. Определение содержания витамина С в картофеле.

5 г картофеля измельчить и растереть в фарфоровой ступке, приливая постепенно 1 мл соляной кислоты и 15 мл дистиллированной воды. Полученную массу слить в коническую колбочку. Ступку ополоснуть водой и слить в колбу. Титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. Рассчитать содержание аскорбиновой кислоты.

2. Определение содержания витамина С в капусте.

1 г капусты взвесить, растереть в ступке с 2 мл соляной кислоты, прилить 8 мл воды и отфильтровать. Для титрования отмерить 2 мл фильтрата, добавить

10 капель соляной кислоты и титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Рассчитать содержание аскорбиновой кислоты.

3. Определения содержания витамина С в молоке.

К 10 мл молока добавить 10 капель соляной кислоты и 10 мл воды. Титровать раствором 2,6 дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Рассчитать содержание аскорбиновой кислоты.

4. Определение витамина С в луке.

0,5 г лука взвесить и растереть в ступке с 2 мл соляной кислоты и 20 мл воды. Отфильтровать и титровать раствором 2,6 дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Рассчитать содержание аскорбиновой кислоты.

Расчет. Для расчета содержания аскорбиновой кислоты используют формулы:

$$\frac{0,088 \cdot a \cdot 50 \cdot 1000}{B \cdot 0,5} = X \text{ мг / кг} \text{ или } \frac{0,0005 \cdot a \cdot 50 \cdot 1000}{B \cdot 0,5} = X \text{ ммоль / кг}$$

где 0,088 (0,0005) – количество мг (ммоль) аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола; а – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшее на титрование; В – общее количество вытяжки, мл; в – масса вещества в граммах, взятого для анализа; г- количество мл вытяжки, взятое для титрования; 1000 – коэффициент пересчета на кг продукта.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

Лабораторная работа 43

Количественное определение витамина Р (рутина) в черном и зеленом чае

Цель работы. Определить количественно содержание витамин Р в чае. Сравнить содержание витамина Р в черном и зеленом чае.

Принцип метода. Количественное определение рутина основано на его способности окисляться перманганатом калия. В качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом калия после того, как окисляется весь рутин. Экспериментально установлено, что 1 мл 0.05 М раствора перманганата калия окисляет 3,2 мкг (0,00506 мкмоль) рутина. В черном чае содержится 300-500 мг/кг (474-790 мкмоль/кг) рутина, в зеленом чае – несколько больше.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,05 М раствор перманганата калия; 2) индикатор индигокармин; 3) черный и зеленый чай.

Ход работы. К 0.1 г черного и зеленого чая прилить по 50 мл горячей дистиллированной воды и провести экстракцию в течение 5 мин. Отмерить в конические колбочки по 10 мл экстракта, добавить по 10 мл дистиллированной воды и 10 капель индигокармина. Титровать раствором перманганата калия до появления устойчивой желтой окраски.

Расчет проводится по формуле:

$$\frac{3,2(0,00506) \cdot a \cdot 50 \cdot 1000}{10 \cdot 0,1} = X \text{ мкг (мкмоль) / кг,}$$

где 3,2 – количество мкг (0,00506 мкмоль) рутина, соответствующее 1 мл 0,05 М раствора перманганата калия; а – количество мл 0,05 н. раствора

перманганата калия, пошедшее на титрование; 10 – количество мл вытяжки, взятое для титрования; 50 – общий объем экстракта; 0,1 – навеска чая, в мг; 1000-коэффициент пересчета на кг сухого вещества.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод. Сравните содержание витамина С в продуктах и витамина Р в чае.

Лабораторная работа 44

Качественные реакции на витамин В₁

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на витамин В₁.

1. Реакция окисления. *Принцип метода.* В щелочной среде тиамин окисляется в тиохром феррицианидом калия. Тиохром обладает синей флюоресценцией при ультрафиолетовом облучении раствора на флюороскопе.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 10% раствор гидроксида натрия; 2) 5% раствор феррицианида калия; 3) 5% раствор тиамин.

Ход работы. К 1 капле 5 % раствора тиамин прибавить 5-10 капель 10% раствора гидроксида натрия, 1-2 капли 5% раствора феррицианида калия и взболтать. При облучении раствора ультрафиолетовыми лучами наблюдается синяя флюоресценция.

2. Диазореакция. *Принцип метода.* В щелочной среде тиамин с диазореактивом образует сложное комплексное соединение оранжевого цвета.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 1% раствор сульфаниловой кислоты; 2) 5% раствор нитрита натрия; 3) 10% раствор бикарбоната натрия

Ход работы. К диазореактиву, состоящему из 5 капель 1% раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5% раствора нитрита натрия, добавить 1-2 капли 5% раствора тиамин и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавить 5-7 капель 10% раствора бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

Лабораторная работа 45

Качественные реакции на витамин В₂

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на витамин В₂.

Принцип метода. Окисленная форма витамина В₂ представляет собой желтое флюоресцирующее в ультрафиолетовых лучах вещество. Реакция на витамин В₂ основана на способности его легко восстанавливаться; при этом раствор витамина В₂, обладающий желтой окраской, приобретает сначала розовый цвет за счет образования промежуточных соединений, а затем обесцвечивается, так как восстановленная форма витамина В₂ бесцветна.

Реактивы, исследуемый материал: 1) концентрированная хлористоводородная кислота; 2) цинк металлический; 3) 0,025% раствор витамина В₂ (перед определением раствор можно развести в 5 раз).

Ход работы. В пробирку налить 10 капель раствора витамина В₂, добавить 5 капель концентрированной хлористоводородной кислоты и опустить зернышко

металлического цинка. Начинается выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно розовеет, затем обесцвечивается. Сравнить обе формы витамина В₂ по флюоресценции, поместив пробирку у флюороскопа.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

Лабораторная работа 46

Качественные реакции на витамин В₆

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на витамин В₆

1. Реакция с хлорным железом

Принцип метода. Витамин В₆ при взаимодействии с раствором хлорного железа образует комплексную соль типа фенолята железа красного цвета.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 1% раствор хлорида железа; 2) 1% раствор витамина В₆.

Ход работы. К 5 каплям 1% раствора витамина В₆ прилить равное количество 1% раствора хлорида железа и перемешать. Наблюдается красное окрашивание.

2. Флюоресценция витамина В₆.

В пробирку внести 10 капель раствора витамина В₆. Поместив пробирку у флюороскопа наблюдать голубую флюоресценцию.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

Лабораторная работа 47

Качественная реакция на витамин РР

Цель работы. Ознакомиться с качественной реакцией на витамин РР.

Принцип метода. Витамин РР при нагревании с раствором ацетата меди образует плохо растворимый синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 5% раствор ацетата меди; 2), 3% раствор витамина РР в 10 % растворе уксусной кислоты.

Ход работы. Перед определением взбалтывают раствор витамина РР. В пробирку вносят 20 капель 3% раствора витамина РР и нагревают до кипения. Взболтав 5% раствор ацетата меди, приливают 20 капель к нагретому раствору витамина РР. Содержимое пробирки доводят до кипения и охлаждают под струей холодной воды. На дне пробирки выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

Лабораторная работа 48

Выделение фолиевой кислоты из дрожжей и ее обнаружение

Цель работы. Доказать наличие фолиевой кислоты в дрожжах.

Принцип метода. Фолиевая кислота хорошо растворима в 0,1 М растворе гидроксида натрия. При экстрагировании фолиевой кислоты из дрожжей и ультрафиолетовом облучении наблюдается интенсивно голубая флюоресценция.

Реактивы, исследуемый материал: 1) 0,1 М и 0,005 М растворы гидроксида натрия; 2) ледяная уксусная кислота; 3) 0,4% раствор перманганата калия; 4) 3% раствор перекиси водорода; 5) индикаторная бумага; 6) дрожжи.

Ход работы. В ступку поместить 10 г дрожжей, добавить 10 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия, 2 г кварцевого песка и растереть 5 мин. Затем центрифугировать 15 мин при 3000 об/мин.

К 10 каплям надосадочной жидкости прилить 20 капель ледяной уксусной кислоты (рН 3,0) и приблизительно 10 капель 0,4% раствора перманганата калия так, чтобы розовое окрашивание не исчезало в течение 10 минут. Через 10 минут удалить избыток перманганата калия путем добавления 4-5 капель 3% раствора перекиси водорода и прилить 0,005 М раствор гидроксида натрия (приблизительно 5 мл) до рН 4,0-4,5 в присутствии индикаторной бумаги. При ультрафиолетовом облучении фолиевой кислоты в щелочном растворе в флюороскопе наблюдается голубая флюоресценция.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

Лабораторная работа 49

Качественная реакция на витамин В₁₂

Цель работы. Ознакомиться с качественными реакциями на витамин В₁₂

Принцип метода. При взаимодействии ионов кобальта с тиомочевинной при нагревании образуется роданистый кобальт зеленого цвета.

Реактивы, исследуемый материал: 1) раствор витамина В₁₂ (фармакопейный, а ампулах); 2) концентрированная серная кислота; 3) 30% раствор гидроксида натрия; 4) 10% раствор тиомочевины.

Ход работы. Содержимое одной ампулы витамина В₁₂ переливают в пробирку, добавляют 3 капли концентрированной серной кислоты и производят сжигание до обесцвечивания в вытяжном шкафу. По окончании минерализации осторожно добавляют в пробирку сначала 10 капель воды, затем 10 капель 30% раствора гидроксида натрия. Воду и щелочь добавляют осторожно при помешивании. На беззольный фильтр наносят 2-3 капли раствора тиомочевины и высушивают над плиткой. После этого наносят на фильтр 1-2 капли полученного минерализата и снова нагревают над плиткой. На фильтре, чаще по краю пятна, появляется зеленое окрашивание, свидетельствующее о наличии кобальта.

Указания к оформлению лабораторной работы

В протоколе запишите принцип работы, ход работы, результаты, сделайте вывод.

**Перечень лабораторных работ, включенных в практические
навыки экзамена по биохимии**

1. Цветные реакции на белки и аминокислоты
2. Реакции осаждения белков
3. Определение термолабильности амилазы слюны
4. Определение оптимума рН для амилазы
5. Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов
6. Специфичность действия ферментов
7. Сопоставление окислительно-восстановительного потенциала
рибофлавина и метиленового синего
8. Обнаружение НАД в дрожжах
9. Обнаружение каталазы в крови
10. Обнаружение дегидрогеназы глицеральдегид-3-фосфата
11. Обнаружение молочной кислоты в мышечной ткани
12. Качественные реакции на кетоновые тела
13. Качественные реакции на холестерол
14. Качественные реакции на инсулин
15. Качественные реакции на адреналин
16. Рефрактометрическое определение белка в растворе
17. Качественные реакции на жирорастворимые витамины
18. Качественные реакции на витамин С
19. Качественные реакции на витамины В₁, В₂, В₆

Учебное издание

ДАНЧЕНКО Елена Олеговна

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Методические рекомендации
к выполнению лабораторных работ

Технический редактор

Г.В. Разбоева

Компьютерный дизайн

Е.В. Крайло

Подписано в печать

2012. Формат 60x84¹/₁₆. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,55. Тираж 60 экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение – учреждение образования

«Витебский государственный университет им. П.М. Машерова».

ЛИ № 02330 / 0494385 от 16.03.2009.

Отпечатано на ризографе учреждения образования

«Витебский государственный университет им. П.М. Машерова».

210038, г. Витебск, Московский проспект, 33.