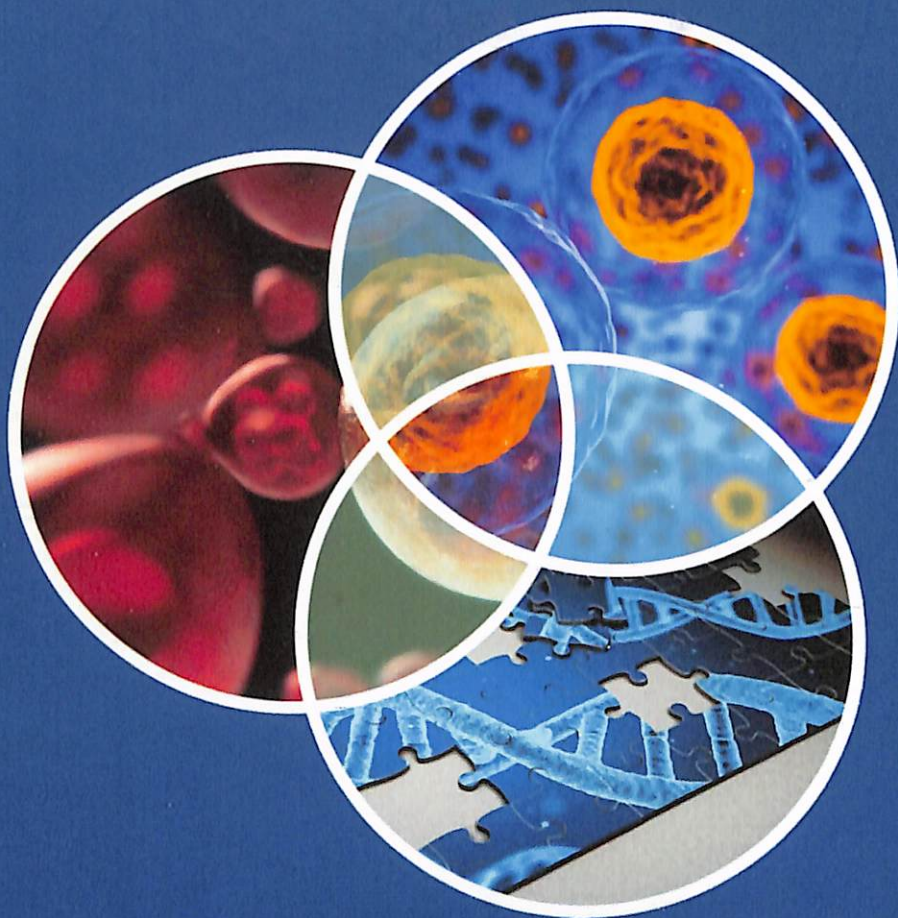


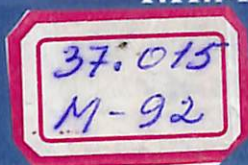
Г.И.МУХАМЕДОВ, П.МИРХАМИДОВА,
Д.ОТАЖОНОВА

37.015
М-92

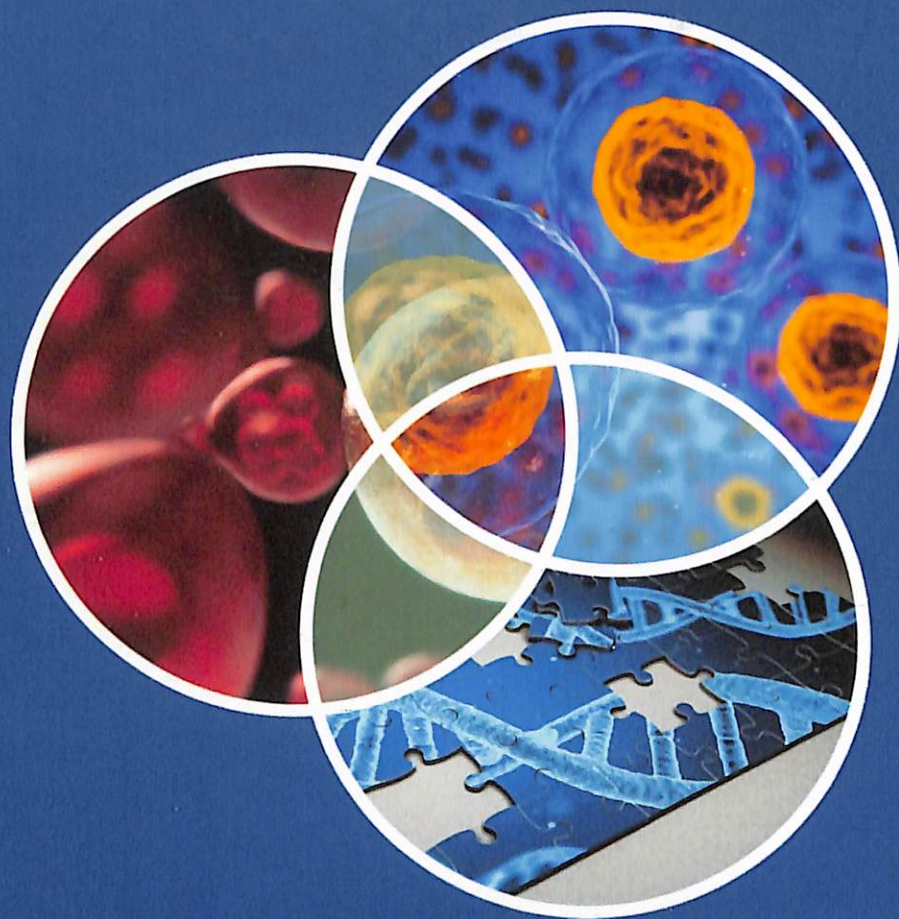
ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ



Г.И.МУХАМЕДОВ, П.МИРХАМИДОВА,
Д.ОТАЖОНОВА



ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ



34.015
М-92

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И
СРЕДНЕ СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

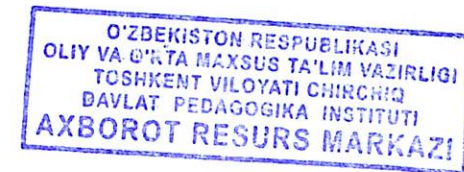
ЧИРЧИКСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ
ТАШКЕНТСКОЙ ОБЛАСТИ

Г.И.Мухамедов, П.Мирхамидова, Д.Отажонова

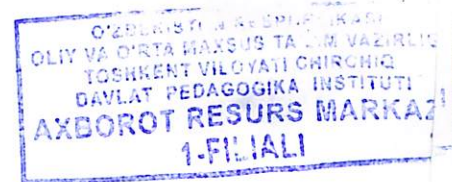
ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

-13106-

Старцев



«MALIK PRINT CO»
ТАШКЕНТ – 2022



УДК: 37.015.3(075)

КБК: 28.072я7

М 92

Мухамедов Г.И., Мирхамидова П., Отажоннова, Д.
Биологическая химия [Текст]: пособие / Г.И.Мухамедов,
П.Мирхамидова, Д.Отажоннова. -Ташкент: «MALIK PRINT CO»,
2022. -252 с.

Пособие составлено в соответствии с действующей программой по биохимии для педагогических институтов. В нем представлены лабораторные работы, как по статической биохимии, так и по химии процессов обмена веществ.

В книге значительное место уделено применению хроматографических, электрофоретических, фотометрических, спектрофотометрических и других современных методов анализа. Приведен ряд методик, которые могут оказаться полезными для студенческих научно-исследовательских кружков.

The manual is compiled in accordance with the current biochemistry program for pedagogical institutes. It presents laboratory work on both static biochemistry and the chemistry of metabolic processes.

The book devotes considerable space to the use of chromatographic, electrophoretic, photometric, spectrophotometric and other modern methods of analysis. A number of techniques are presented that may be useful for student research circles.

Данное учебное пособие рекомендован Министерством высшего образования Республики Узбекистан для студентов высших учебных заведений (свидетельство №500-067 от 23 ноября 2021 г.)

ISBN 978-9943-7906-6-7

ГЛАВА I. БУФЕРНЫЕ РАСТВОРЫ. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ИОНОВ ВОДОРОДА

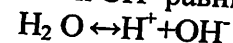
Ключевые слова: индикатор, растворы, буферные растворы, спирт, тимол, бромтимол, водородный показатель, фенолфталеин

Водородный показатель

Одно из важнейших свойств водных растворов – их кислотность (или щелочность), которая определяется концентрацией ионов H^+ и OH^- . Концентрации этих ионов в водных растворах связаны простой зависимостью $[H^+][OH^-] = K_w$; (квадратными скобками принято обозначать концентрацию в единицах моль/л). Величина K_w называется ионным произведением воды и при данной температуре постоянна. Чаще всего пользуются значением K_w при $25^\circ C$, которое равно $1,00 \cdot 10^{-14}$.

$$[H^+] \cdot [OH^-] = 10^{-7} \cdot 10^{-7}$$

В абсолютно чистой воде, не содержащей даже растворенных газов, концентрации ионов H^+ и OH^- равны (раствор нейтрален).



В других случаях эти концентрации не совпадают: в кислых растворах преобладают ионы H^+ , в щелочных – ионы OH^- . Но их произведение в любых водных растворах постоянно. Поэтому если увеличить концентрацию одного из этих ионов, то концентрация другого иона уменьшится во столько же раз.

$$pH = -\lg[H^+];$$

Эта величина может изменяться в небольших пределах – всего от -1 до 14 . При этом изменению концентрации ионов H^+ в 10 раз соответствует изменение pH на одну единицу.

При комнатной температуре в нейтральных растворах $pH = 7$, в кислых растворах $pH < 7$, а в щелочных $pH > 7$. Приблизительно значение pH водного раствора можно определить с помощью индикаторов.

Буферные растворы

Растворы, способные сохранять постоянную концентрацию ионов H^+ при добавлении к ним небольшого количества сильной кислоты или щелочи, а также при разбавлении, называются буферными растворами или буферными системами.

Различают в основном протолитические буферные растворы двух типов:

- Кислотные буферные системы обычно образованы слабой неорганической или органической кислотой и солью этой же кислоты с сильным основанием. Например:

CH_3COOH		CH_3COONa	=	ацетатный буфер
слабая кислота		соль кислоты		

H_2CO_3 ($H_2O + CO_2$)	+	$NaHCO_3$	=	гидрокарбонатный или бикарбонатный буфер
слабая кислота		соль кислоты		

- Основные буферные системы образованы слабым неорганическим или органическим основанием и солью этого основания с сильной кислотой. Например:

$NH_3 \cdot H_2O$ (NH_4OH)	+	NH_4Cl	=	аммиачный буфер
Слабое основание		соль		
$C_2H_5-NH_2$	+	$C_2H_5NH_3Cl$	=	этиламинный буфер
слабое основание		соль		

Уровень pH буферных растворов зависит от соотношения в нем кислот и солей, поэтому уровень pH раствора всегда одинаков. Уровень pH буферных растворов теоретически рассчитывается по следующей формуле.

$$[H^+] = \frac{C_{\text{кислота}}}{C_{\text{соль}}} K \quad \text{или} \quad [OH^-] = \frac{C_{\text{основание}}}{C_{\text{соль}}} K$$

Здесь $C_{\text{кислота}}$ - концентрация кислоты; $C_{\text{соль}}$ - концентрация соли; $C_{\text{основание}}$ - это концентрация основания; Точка электролитической диссоциации K-кислоты (основания)

Для живых организмов характерно поддержание кислотно-основного гомеостаза на определенном уровне. Это находит выражение в достаточно постоянных значениях pH биологических сред и способности восстанавливать нормальные значения pH при воздействии протолитов. В процессе метаболизма в организме постоянно происходит синтез, распад и взаимодействие огромного количества химических соединений. Все эти процессы осуществляются при помощи ферментов, активность которых связана с определённым значением pH.

Обеспечение постоянства pH крови и других органов и тканей является одним из важнейших условий нормального существования организма. Это обеспечение достигается наличием в организме многочисленных регулирующих систем, важнейшими из которых являются буферные системы. Таким образом, важнейшая физиологическая функция клеток также зависит от концентрации ионов водорода и их соотношения. Изменения концентрации соли в биологических жидкостях приводят к нарушению ряда важных физиологических функций.

Буферная емкость

Способность буферных систем противодействовать резкому изменению pH при добавлении к ним сильной кислоты или основания является ограниченной. Буферная смесь поддерживает pH постоянным только при условии, что количество вносимых в раствор сильной кислоты или щелочи не превышает определенной величины. В противном случае наблюдается резкое изменение pH, т.е. буферное действие раствора прекращается.

Это связано с тем, что в результате протекающей реакции изменяется соотношение молярных концентраций компонентов буферной системы: $C_{\text{кислоты}}/C_{\text{соли}}$ или $C_{\text{основания}}/C_{\text{соли}}$.

При этом концентрация компонента, реагирующего с добавленной кислотой или щелочью, уменьшается, а концентрация второго компонента возрастает, т.к. он дополнительно образуется в ходе реакции.

Количественно буферное действие раствора характеризуется с помощью буферной емкости (В). При этом различают буферную

Буферные растворы

Растворы, способные сохранять постоянную концентрацию ионов H^+ при добавлении к ним небольшого количества сильной кислоты или щелочи, а также при разбавлении, называются буферными растворами или буферными системами.

Различают в основном протолитические буферные растворы двух типов:

- Кислотные буферные системы обычно образованы слабой неорганической или органической кислотой и солью этой же кислоты с сильным основанием. Например:

CH_3COOH		CH_3COONa	=	ацетатный буфер
слабая кислота		соль кислоты		

H_2CO_3 ($H_2O + CO_2$)	+	$NaHCO_3$	=	гидрокарбонатный или бикарбонатный буфер
слабая кислота		соль кислоты		

- Основные буферные системы образованы слабым неорганическим или органическим основанием и солью этого основания с сильной кислотой. Например:

$NH_3 \cdot H_2O$ (NH_4OH)	+	NH_4Cl	=	аммиачный буфер
Слабое основание		соль		
$C_2H_5-NH_2$	+	$C_2H_5NH_3Cl$	=	этиламинный буфер
слабое основание		соль		

Уровень pH буферных растворов зависит от соотношения в нем кислот и солей, поэтому уровень pH раствора всегда одинаков. Уровень pH буферных растворов теоретически рассчитывается по следующей формуле.

$$[H^+] = \frac{C_{\text{кислота}}}{C_{\text{соль}}} K \quad \text{или} \quad [OH^-] = \frac{C_{\text{основание}}}{C_{\text{соль}}} K$$

Здесь $C_{\text{кислота}}$ - концентрация кислоты; $C_{\text{соль}}$ - концентрация соли; $C_{\text{основание}}$ - это концентрация основания; Точка электролитической диссоциации K-кислоты (основания)

Для живых организмов характерно поддержание кислотно-основного гомеостаза на определенном уровне. Это находит выражение в достаточно постоянных значениях pH биологических сред и способности восстанавливать нормальные значения pH при воздействии протолитов. В процессе метаболизма в организме постоянно происходит синтез, распад и взаимодействие огромного количества химических соединений. Все эти процессы осуществляются при помощи ферментов, активность которых связана с определенным значением pH.

Обеспечение постоянства pH крови и других органов и тканей является одним из важнейших условий нормального существования организма. Это обеспечение достигается наличием в организме многочисленных регулирующих систем, важнейшими из которых являются буферные системы. Таким образом, важнейшая физиологическая функция клеток также зависит от концентрации ионов водорода и их соотношения. Изменения концентрации соли в биологических жидкостях приводят к нарушению ряда важных физиологических функций.

Буферная емкость

Способность буферных систем противодействовать резкому изменению pH при добавлении к ним сильной кислоты или основания является ограниченной. Буферная смесь поддерживает pH постоянным только при условии, что количество вносимых в раствор сильной кислоты или щелочи не превышает определенной величины. В противном случае наблюдается резкое изменение pH, т.е. буферное действие раствора прекращается.

Это связано с тем, что в результате протекающей реакции изменяется соотношение молярных концентраций компонентов буферной системы: $C_{\text{кислоты}}/C_{\text{соли}}$ или $C_{\text{основания}}/C_{\text{соли}}$.

При этом концентрация компонента, реагирующего с добавленной кислотой или щелочью, уменьшается, а концентрация второго компонента возрастает, т.к. он дополнительно образуется в ходе реакции.

Количественно буферное действие раствора характеризуется с помощью буферной емкости (В). При этом различают буферную

емкость по кислоте (B_K) и буферную емкость по основанию или щелочи (B_O).

Буферной емкостью по кислоте является то количество химического эквивалента сильной кислоты, которое нужно добавить к 1 литру (1 дм³) буферной системы, чтобы уменьшить её pH на единицу. Ее можно рассчитать по следующей формуле:

$$B_K = \frac{n(1/z \text{ HA})}{pH_1 - pH_2}$$

где $n(1/z \text{ HA})$ – число молей химического эквивалента сильной кислоты, добавленное к 1 литру буферной системы; pH_1 – водородный показатель системы до добавления сильной кислоты; pH_2 – водородный показатель системы после добавления сильной кислоты.

Соответственно буферной емкостью по основанию является то количество химического эквивалента сильного основания (щелочи), которое нужно добавить к 1 литру (1 дм³) буферной системы, чтобы вызвать увеличение ее pH на единицу:

$$B_O = \frac{n(1/z \text{ B})}{pH_2 - pH_1}$$

где $n(1/z \text{ B})$ – число молей химического эквивалента основания, которое добавили к 1 литру буферного раствора; pH_1 – водородный показатель раствора до добавления основания; pH_2 – водородный показатель раствора после добавления основания.

Определение концентрации ионов водорода с помощью индикатора

Концентрацию (pH) ионов водорода можно определить с помощью индикаторов. Индикаторами являются слабые органические кислоты или основания, а их недиссоциированные формы отличаются от окрашенных диссоциированных форм. Диссоциация индикаторов зависит от реакционной среды.

Цветовые переходы некоторых индикаторов в зависимости от pH среды.

Цвет индикатора, интервал pH:

Цвет индикатора, интервал pH:			
Индикатор	в кислой среде	в нейтральной	в щелочной
Лакмус	красный $pH < 5$	фиолетовый $5 < pH < 8$	синий $pH > 8$
Фенолфталеин	бесцветный $pH < 8$	бледно-розовый $8 < pH < 9,8$	малиновый $pH > 9,8$
Метилоранж	красный $pH < 3,1$	оранжевый $3,1 < pH < 4,4$	желтый $pH > 6,3$

Добавляя индикатор в раствор, можно определить pH среды в зависимости от образовавшейся окраски.

Реактивы: 1) 0,15М-ный раствор KH_2PO_4 . 2) 0,15М-ный раствор NaH_2PO_4 . 3) метилрот, бромтимоловые индикаторы. 4) универсальный индикатор.

Индикаторы могут иметь разные цвета в зависимости от pH среды. Это можно увидеть в следующем примере:

Т№	Индикаторы	Предел изменения цвета	Цвет	
			В кислотах	В щелочи
1	Метил оксид	3,1-4,4	красный	желтый
2	Метилрот	4,2-6,2	красный	желтый
3	Бромтимол	6,0-7,6	желтый	синий
4	Фенолфталеин	8,0-9,8	бесцветный	пурпурно-красный
5	Тимолфталеин	9,3-10,5	бесцветный	темно-желто-коричневый

Ход работы: В четырех пробирках готовим буферные растворы с различными pH концентрациями, взяв 0,15 М-ные растворы KH_2PO_4 и NaH_2PO_4 в пропорциях, указанных ниже. При смешивании растворов буфер в каждом растворе делится на два.

В пробирки первого ряда добавляется метилротный индикатор. В пробирки второго ряда добавляется бромтимоловый индикатор и наблюдается изменение окраски в пробирках.

Растворы	Номера пробирок			
	1	2	3	4
0,15 М KH_2PO_4 , мл	9,5	8,0	6,0	3,0
0,15 М NaH_2PO_4 , мл	0,5	2,0	4,0	7,0
pH раствора	5,59	6,24	6,64	7,17

Определение pH с помощью универсального индикатора

Универсальный индикатор состоит из смеси нескольких индикаторов, раствор которых формирует соответствующий цвет в зависимости от pH. Состав универсального индикатора представлен в таблице ниже.

Состав I и II универсальных индикаторов

Индикаторы	Количество (гр)	
	1	2
Тимол	1	-
Бромтимол	0,8	0,4
Диметиламиноазобензол	0,6	-
Метилрот	0,4	0,2
Фенолфталеин	0,2	0,8
Этиловый спирт	1000,0	1000,0

Изменение цвета I-универсального индикатора находится в диапазоне pH 1-10; Изменение цвета II -универсального индикатора находится в диапазоне pH 4-10. Изменение цвета универсального индикатора выглядит следующим образом при различных значениях pH.

I индикатор		II индикатор	
pH	цвет	pH	цвет
2	красный	4	красный
4	темно-желтый	5	темно-желтый
6	желтый	6	желтый
8	зеленый	7	зеленый
10	синий	8,5	синий
		10	фиолетовый

Возьмите семь пробирок и приготовьте указанные ниже буферные растворы. В приготовленный буферный раствор добавляют по 2 капли универсального индикатора и определяют pH каждой смеси в зависимости от образовавшейся окраски:

Растворы	Номера пробирок						
	1	2	3	4	5	6	7
Na_2HPO_4 0,1M	040	4,11	7,71	10,30	12,63	15,45	19,45
Количество раствора, мл	19,60	15,89	12,29	9,70	7,37	4,55	055
Количество 0,1 М раствора лимонной кислоты, мл							
pH буферного раствора	2,2	3,0	4,0	5,0	8,0	6,8	8,0

Определение pH потенциометрическим методом

Этот метод основан на измерении электродвижущей силы гальванических элементов под влиянием концентрации, ионов водорода в исследуемых растворах с помощью специальных электродов. С помощью этого метода можно точно измерить pH любой жидкости. Специальные инструменты могут использоваться для измерения pH растворов с помощью различных потенциометров. Общее устройство этих приборов и все выполняемые ими операции по измерению pH растворов фиксируются в паспорте, который прилагается к потенциометрам (pH-метрам).

Правила работы с инструментом. Прибор включают на 15-20 минут перед измерением pH раствора. Электроды промывают 3-4 раза свежеприготовленной дистиллированной водой. Автоматическая температурная компенсация используется для измерения pH растворов.

pH раствора сначала измеряется в большом диапазоне прибора от -2 до +14, затем в малом диапазоне, а затем электроды прибора промываются водой 7-10 раз. После промывания электродов можно измерить pH растворов. Промытые электроды оставляют в воде.

ГЛАВА II. БЕЛКИ

Ключевые слова: аминокислоты, простые белки, сложные белки, изоэлектрическая точка, денатурация, химические связи, структура белков, молекулярная масса, природные пептиды

Белки, протеины, высокомолекулярные природные органические вещества, построенные из аминокислот и играющие фундаментальную роль в структуре и жизнедеятельности организмов. Именно белки (ферменты и др.) осуществляют обмен веществ и энергетические превращения, неразрывно связанные с активными биологическими функциями.

Элементарный состав большинства белков: 50,6—54,5% углерода, 6,5—7,3% водорода, 21,5—23,5% кислорода, 15—17,6% азота, 0,3—2,5% серы; в состав ряда белков входит и фосфор 0,1-2%. Некоторые белки содержат небольшое количество йода, железа, меди, брома, марганца, цинка, кальция и других веществ.

Белки играют важнейшую роль в жизнедеятельности всех организмов. При пищеварении белковые молекулы перевариваются до аминокислот, которые, будучи хорошо растворимы в водной среде, проникают в кровь и поступают во все ткани и клетки организма. Здесь наибольшая часть аминокислот расходуется на синтез белков различных органов и тканей, часть на синтез гормонов, ферментов и других биологически важных веществ, а остальные служат как энергетический материал. Т.е. белки выполняют каталитические (ферменты), регуляторные (гормоны), транспортные (гемоглобин, церулоплазмин и др.), защитные (антитела, тромбин и др.) функции.

Белки подразделяются на две большие группы: простые белки или протеины и сложные белки или протеины.

При гидролизе протеинов в кислом водном растворе получают только α -аминокислоты. Гидролиз протеидов дает кроме аминокислот и вещества небелковой природы (углеводы, нуклеиновые кислоты и др.); это соединения белковых веществ с небелковыми.

Протеины

Альбумины хорошо растворяются в воде. Встречаются в молоке, яичном белке и крови.

Глобулины в воде не растворяются, но растворимы в разбавленных растворах солей. К глобулинам принадлежат глобулины крови и мышечный белок миозин.

Глутелины растворяются только в разбавленных растворах щелочей. Встречаются в растениях.

Склеропротеины — нерастворимые белки. К склеропротеинам относятся кератины, белок кожи и соединительных тканей коллаген, белок натурального шелка фиброин.

Сложные белки состоят из простого белка и небелковой части-простетической группы.

Фосфопротеины — содержат молекулы фосфорной кислоты, связанные в виде сложного эфира у гидроксильной группы аминокислоты серина. К ним относится вителлин — белок, содержащийся в яичном желтке, белок молока казеин.

Гликопротеины — содержат остатки углеводов. Они входят в состав хрящей, рогов, слюны.

Хромопротеины — содержат молекулу окрашенного вещества, обычно типа порфина. Самым важным хромопротеидом является гемоглобин — переносчик кислорода, окрашивающий красные кровяные тельца.

Нуклеопротеины — протеины, связанные с нуклеиновыми кислотами. Они представляют собой очень важные с биологической точки зрения белки — составные части клеточных ядер. Нуклеопротеины являются важнейшей составной частью вирусов — возбудителей многих болезней.

Приготовление белковых растворов. Готовится раствор яичного белка для цветных реакций и реакций преципитации. Белок одного яйца отделяется от желтка и растворяется в 15-20 мл дистиллированной воды. Раствор процеживают через 3-4 слоя марли. Раствор хранится в холодильнике.

Приготовление раствора яичного белка для диализа. Три куриных яичных белка отделяют от желтка и растворяют в 700 мл дистиллированной воде, затем добавляют 300 мл насыщенного раствора соли хлорида натрия. Раствор процеживают через 3-4 слоя марли и хранят в холодильнике.

ГЛАВА II. БЕЛКИ

Ключевые слова: аминокислоты, простые белки, сложные белки, изоэлектрическая точка, денатурация, химические связи, структура белков, молекулярная масса, природные пептиды

Белки, протеины, высокомолекулярные природные органические вещества, построенные из аминокислот и играющие фундаментальную роль в структуре и жизнедеятельности организмов. Именно белки (ферменты и др.) осуществляют обмен веществ и энергетические превращения, неразрывно связанные с активными биологическими функциями.

Элементарный состав большинства белков: 50,6—54,5% углерода, 6,5—7,3% водорода, 21,5—23,5% кислорода, 15—17,6% азота, 0,3—2,5% серы; в состав ряда белков входит и фосфор 0,1-2%. Некоторые белки содержат небольшое количество йода, железа, меди, брома, марганца, цинка, кальция и других веществ.

Белки играют важнейшую роль в жизнедеятельности всех организмов. При пищеварении белковые молекулы перевариваются до аминокислот, которые, будучи хорошо растворимы в водной среде, проникают в кровь и поступают во все ткани и клетки организма. Здесь наибольшая часть аминокислот расходуется на синтез белков различных органов и тканей, часть на синтез гормонов, ферментов и других биологически важных веществ, а остальные служат как энергетический материал. Т.е. белки выполняют каталитические (ферменты), регуляторные (гормоны), транспортные (гемоглобин, церулоплазмин и др.), защитные (антитела, тромбин и др.) функции.

Белки подразделяются на две большие группы: простые белки или протеины и сложные белки или протеины.

При гидролизе протеинов в кислом водном растворе получают только α -аминокислоты. Гидролиз протеидов дает кроме аминокислот и вещества небелковой природы (углеводы, нуклеиновые кислоты и др.); это соединения белковых веществ с небелковыми.

Протеины

Альбумины хорошо растворяются в воде. Встречаются в молоке, яичном белке и крови.

Глобулины в воде не растворяются, но растворимы в разбавленных растворах солей. К глобулинам принадлежат глобулины крови и мышечный белок миозин.

Глутелины растворяются только в разбавленных растворах щелочей. Встречаются в растениях.

Склеропотеины — нерастворимые белки. К склеропотеинам относятся кератины, белок кожи и соединительных тканей коллаген, белок натурального шелка фиброин.

Сложные белки состоят из простого белка и небелковой части-простетической группы.

Фосфопотеины — содержат молекулы фосфорной кислоты, связанные в виде сложного эфира у гидроксильной группы аминокислоты серина. К ним относится вителлин — белок, содержащийся в яичном желтке, белок молока казеин.

Гликопротеины — содержат остатки углеводов. Они входят в состав хрящей, рогов, слюны.

Хромопотеины — содержат молекулу окрашенного вещества, обычно типа порфина. Самым важным хромопотеидом является гемоглобин — переносчик кислорода, окрашивающий красные кровяные тельца.

Нуклеопотеины — протеины, связанные с нуклеиновыми кислотами. Они представляют собой очень важные с биологической точки зрения белки — составные части клеточных ядер. Нуклеопотеины являются важнейшей составной частью вирусов — возбудителей многих болезней.

Приготовление белковых растворов. Готовится раствор яичного белка для цветных реакций и реакций преципитации. Белок одного яйца отделяется от желтка и растворяется в 15-20 мл дистиллированной воды. Раствор процеживают через 3-4 слоя марли. Раствор хранится в холодильнике.

Приготовление раствора яичного белка для диализа. Три куриных яичных белка отделяют от желтка и растворяют в 700 мл дистиллированной воде, затем добавляют 300 мл насыщенного раствора соли хлорида натрия. Раствор процеживают через 3-4 слоя марли и хранят в холодильнике.

Цветные реакции

Белки при взаимодействии с некоторыми химическими веществами дают окрашенные соединения. Образование этих соединений происходит при участии радикалов аминокислот, их специфических групп или пептидных связей. Цветные реакции позволяют установить наличие белка в биологическом объекте или растворе и доказать присутствие определенных аминокислот в белковой молекуле. На основе цветных реакций разработаны некоторые методы количественного определения белков и аминокислот.

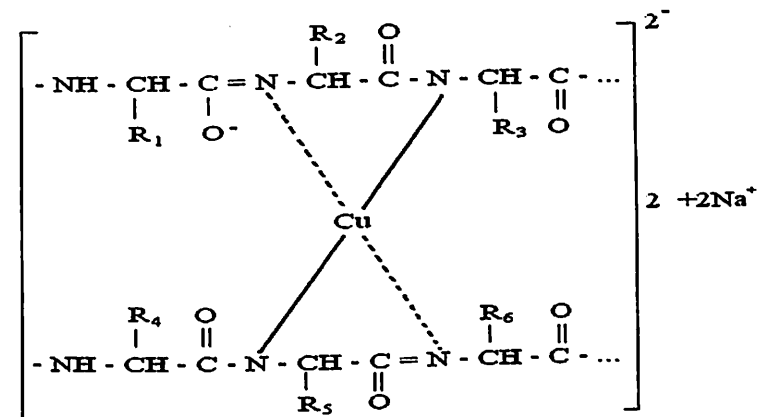
Универсальными считают биуретовую и нингидриновую реакции, так как их дают все белки. Ксантопротеиновая реакция, реакция Фоля и др. являются специфическими, так как они обусловлены радикальными группами определенных аминокислот в молекуле белка.

На основании некоторых цветных реакций разработаны методы количественного определения белков и аминокислот.

Биуретовая реакция

Реакция обусловлена наличием в белках, пептидах, полипептидах пептидных связей, которые в щелочной среде образуют с ионами меди (II) комплексные соединения, окрашенные в фиолетовый (с красным или с синим оттенком) цвет. Окраска обусловлена наличием в молекуле не менее двух групп $-\text{CO}-\text{NH}-$, связанных непосредственно между собой или при участии атома углерода или азота.

Образующееся в щелочной среде комплексное соединение меди (II) с пептидными группами имеет следующее строение:

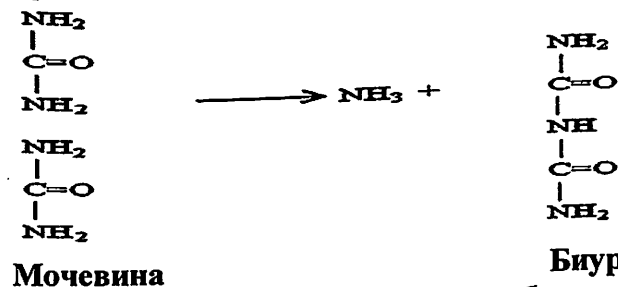


Здесь $-\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3, \text{R}_4 \dots$ - остатки аминокислот.

Ионы меди (II) соединяются двумя ионными связями с группами $=\text{C}-\text{O}^-$ и четырьмя координационными связями с атомами азота ($=\text{N}-$).

Интенсивность окраски зависит от количества белка в растворе. Это позволяет использовать данную реакцию для количественного определения белка. Цвет окрашенных растворов зависит от длины полипептидной цепи. Белки дают сине-фиолетовое окрашивание; продукты их гидролиза (поли- и олигопептиды) - красную или розовую окраску. Биуретовую реакцию дают не только белки, пептиды и полипептиды, но и биурет ($\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), оксамид ($\text{NH}_2-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$), гистидин.

Мочевина при нагревании NH_3 высвобождается из двух его молекул с образованием биурета:



Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки 1,2 и 5 мл; спиртовая лампа.

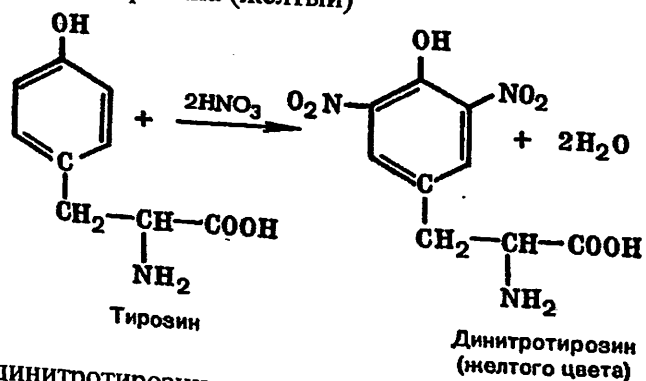
Реактивы. 1. Протеин соевой муки; раствор яичного белка. 2. 10%-ный раствор гидроксида натрия. 3. 1%-ный раствор медного купороса. 4. Мочевина.

Ход работы. 1. Добавить в раствор 100-200 мг кристаллов мочевины и нагревать до появления запаха аммиака. После охлаждения полученной массы добавляют к раствору 2 мл гидроксида натрия, 1-2 капли медного купороса. Реакция приобретает розовый цвет. 2. Добавить в раствор 2 мл яичного белка, затем добавить такое же количество гидроксида натрия, 1-2 капли раствора медного купороса. В результате получается красновато-пурпурный цвет.

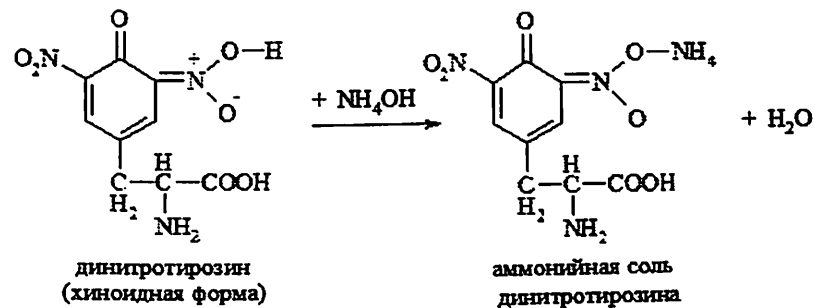
Ксантопротеиновая реакция

Большинство белковых растворов реагируют с концентрированной азотной кислотой, давая желтый или оранжевый цвет. Эта реакция характерна для ароматических (кольцевых) аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофаны) в молекуле белка, которые реагируют с азотной кислотой с образованием желтых нитросоединений:

“ксантос” — это греческое слово, означающее желтый. Тирозин под действием концентрированной азотной кислоты образует динитротирозин (желтый)



Когда динитротирозин подвергается воздействию гидроксида натрия или гидроксида аммония, образуется натриевая или аммониевая соль динитротирозина, имеющий оранжевый оттенок.



Эта реакция характерна для всех белков, содержащих ароматические аминокислоты. Поскольку белок желатина не содержит ароматических аминокислот, он не подвергается ксантопротеиновой реакции.

Ксантопротеиновые реакции также дают простые ароматические соединения - бензол и его гомологи.

Реактивы. 1. Раствор яичного белка; соевый белок. 2. 1%-ный раствор желатина. 3. Концентрированная азотная кислота. 4. 20%-ный раствор гидроксида натрия или концентрированный раствор аммиака (20-25%). 5. 0,1%-ный раствор фенола.

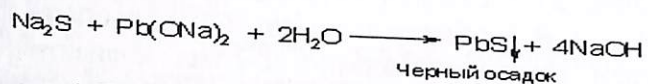
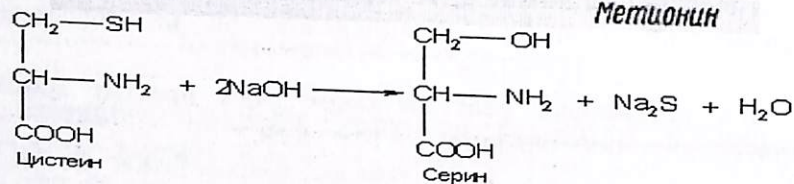
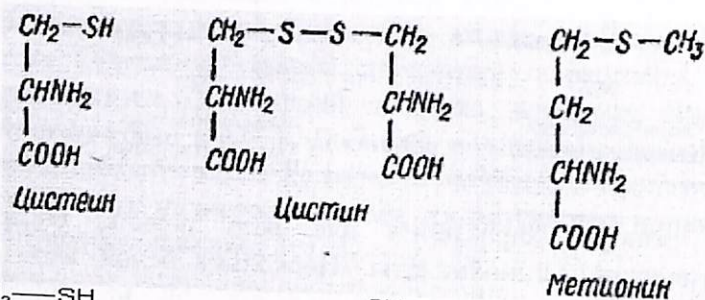
Ход работы. В пробирку заливают 2-3 мл раствора фенола и через стенки раствора заливают 1-2 мл концентрированной азотной кислоты. При осторожном нагревании образуется желтый цвет. При добавлении в раствор 1-2 мл яичного белка и добавлении в раствор 8-10 капель концентрированной азотной кислоты осадок становится желтым. После охлаждения раствор осторожно добавляют к раствору аммиака или гидроксида натрия, образуется оранжевый цвет.

Раствор нагревают, добавляя 1-2 мл 1%-ного раствора желатина, 8-10 капель концентрированного раствора азотной кислоты. Желатин не дает такой реакции, потому что не содержит ароматических аминокислот.

Реакция на серосодержащие аминокислоты

Многие белковые молекулы содержат серосодержащие аминокислоты: цистеин, цистин и метионин.

При нагревании путем добавления щелочи к белку сера выделяется из этих аминокислот в виде сероводорода. Сероводород образует черный осадок—сульфид свинца с ацетатом свинца.

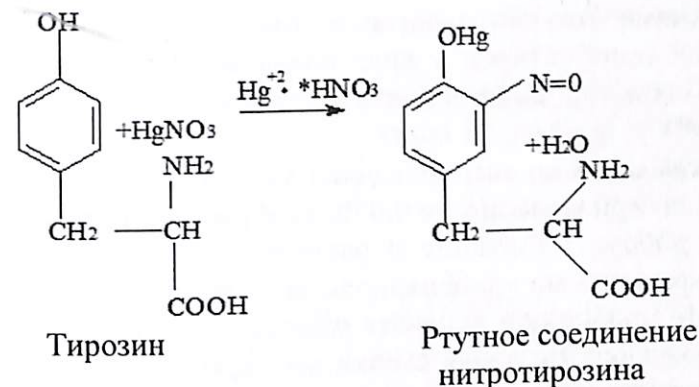


Реактивы. 1. Протеин соевой муки. Яичный белок. 2. 20%-ный раствор гидроксида натрия. 3. 0,5%-ный раствор ацетата свинца.

Ход работы. В раствор заливают 1-2 мл раствора белка и равный объем гидроксида натрия, нагревают до кипения и после охлаждения добавляют 1-2 капли раствора ацетата свинца. В результате образуется черный осадок PbS.

Тирозиновая реакция

Реакция специфична для аминокислоты тирозина в молекуле белка, которая содержит фенольную группу. При нагревании с добавлением миллиона реагентов образует красный осадок.



Почти все белки подвергаются реакции Миллона, потому что они содержат аминокислоту тирозин. Эта реакция характерна и для всех фенолов.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки.

Реактив: 1. 0,1%-ный раствор фенола. 2. Реактив Миллона; Для приготовления этого реагента берут 40г ртути и растворяют в 57 мл концентрированной азотной кислоте (при комнатной температуре).

Приготовленный раствор развести двумя объемами воды и вылить образовавшийся осадок. 3. Белковый раствор. 4. 0,1%-ный раствор желатина.

Ход работы: В первую пробирку добавьте 2 мл раствора фенола и 1 мл реактива Миллона и медленно нагрейте до розового цвета. Затем эту реакцию проводят с белком. Ко второй пробирке добавляют 2 мл раствора белка и 6-8 капель реактива Миллона, в результате реакции образуется белый осадок, который при нагревании образует темно-красный осадок. При добавлении 2 мл раствора желатина к третьей пробирке и добавлении 6-8 капель реагента Миллона, реакция Миллона не происходит.

Реакция Адамкевича

Добавьте концентрированную уксусную кислоту в раствор аминокислоты триптофана и медленно вылейте концентрированную серную кислоту из пипетки по стенке пробирки. Это образует красно-пурпурное кольцо на границе между двумя

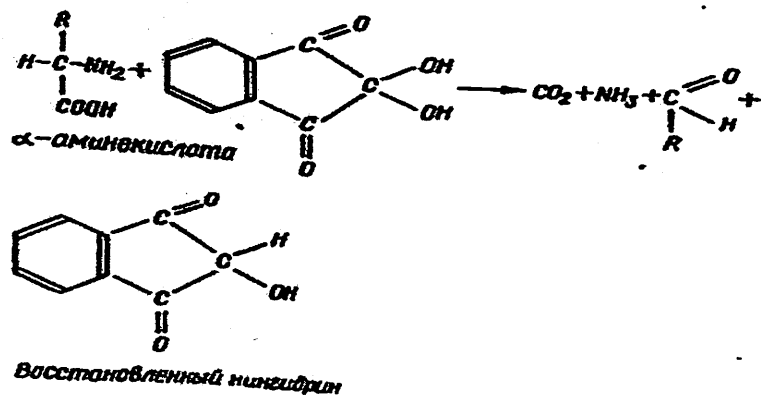
.. жидкостями. Это указывает на то, что триптофан с глиоксилатом, который присутствует в виде соединения в уксусной кислоте, имеет свойство образовывать окрашенные продукты в кислой среде.

Реактивы: концентрированная уксусная кислота, концентрированная серная кислота и 0,05%-ный раствор триптофана.

Ход работы: Добавьте в раствор 1 мл 0,05%-ного раствора триптофана и 1 мл концентрированной уксусной кислоты. Слегка нагрейте пробирку и добавьте равный объем концентрированной уксусной кислоты вдоль стенки пробирки (жидкости не должны смешиваться друг с другом), через 10 минут на границе обеих жидкостей образуется красновато-пурпурный цвет.

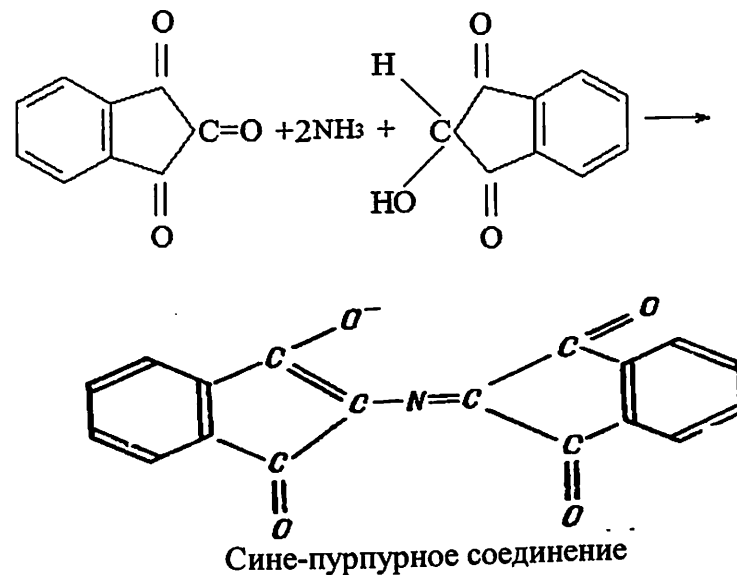
Нингидриновая реакция

Образует сине-пурпурный цвет при нагревании с раствором белка и полипептидов с реагентом нингидрина. Реакция нингидрина происходит из-за аминогрупп в α -состоянии аминокислот. Суть реакции заключается в том, что под действием α -аминокислот и пептидов нингидрин подвергается процессам дезаминирования и декарбоксилирования. В результате реакции образуются CO_2 , NH_3 , альдегид и восстановленный нингидрин. Восстановленный нингидрин, аммиак и одна молекула нингидрина реагируют с образованием сине-фиолетового соединения.



Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипеток; водяная баня.

Реактивы. 1. 0,2%-ный раствор нингидрина в спирте или в ацетоне. 2. Белковый раствор. 3. Водный раствор 0,1%-ного глицина.



Ход работы: В пробирку добавить 2 мл раствора глицина, 5-6 капель раствора нингидрина и нагреть на водяной бане. В результате раствор приобретает фиолетовый оттенок. В другую пробирку добавляют 2-3 мл раствора белка и 10-12 капель раствора нингидрина. Растворы после смешивания нагревают на водяной бане несколько минут. Реакция приобретает сине-пурпурный цвет.

Реакции осаждения белков

Известно, что белки в растворе сохраняются в природном состоянии за счёт факторов устойчивости, к которым относятся заряд белковой молекулы и гидратная (водная) оболочка вокруг нее. Удаление этих факторов приводит к склеиванию этих молекул белка и выпадению в осадок. Осаждение белков может

быть обратимым и необратимым в зависимости от природы используемых реактивов.

Обратимое осаждение — при этом процессе под воздействием факторов осаждения белки выпадают в осадок, но после прекращения действия этих факторов белки вновь переходят в растворимое состояние и приобретают свои нативные свойства. Одним из видов обратимого осаждения белков является высаливание.

Необратимое осаждение белков связано с глубокими нарушениями структуры белков (вторичной и третичной) и потерей ими нативных свойств. Такие изменения белков можно вызвать кипячением, действием концентрированных растворов минеральных и органических кислот, солями тяжелых металлов.

Для высаливания белков используют соли щелочных и щелочноземельных металлов (наиболее часто в практике используют сульфат натрия и аммония). Эти соли удаляют водную оболочку (вызывают обезвоживание) и снимают заряд. Между величиной водной оболочки белковых молекул и концентрацией солей существует прямая зависимость: чем меньше гидратная оболочка, тем меньше требуется солей. Так, глобулины, имеющие крупные и тяжелые молекулы и небольшую водную оболочку, выпадают в осадок при неполном насыщении раствора солями, а альбумины как более мелкие молекулы, окруженные большой водной оболочкой, — при полном насыщении.

Денатурация белка (необратимое осаждение) сводится к разрушению третичной и частично вторичной структуры белковой молекулы в результате разрыва водородных связей и потере им биологических или нативных свойств. При необратимых реакциях осаждения белки претерпевают глубокие изменения и не могут быть растворимы в первоначальном растворителе. К необратимым реакциям относятся осаждение белка солями тяжелых металлов, минеральными и органическими кислотами, алкалоидными реактивами и осаждение при кипячении.

Осаждение белков с использованием нейтральных солей

Реакции высаливания дают хорошие результаты для разделения белков в нативном (естественном) состоянии. Нейтральные соли способны по-разному реагировать в разных средах. Например, под действием сульфата аммония белки хорошо осаждаются в нейтральных условиях в кислых условиях под действием хлорида натрия.

Осаждение белков под действием сульфатом аммония

Необходимые инструменты: штатив с пробирками, фильтровальная бумага; воронка; пипетки на 2,5 мл.

Реактивы. 1. Сыворотка или раствор яичного белка; белок соевой муки; 2. Насыщенный раствор сульфата аммония. 3. Кристаллическая соль сульфата аммония. 4. 10%-ный раствор гидроксида натрия. 5. 1%-ный раствор медного купороса.

Ход работы. В пробирку добавить 2-3 мл сыворотку крови или разбавленного яичного белка, добавить равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и хорошо перемешивают. В результате осаждаются белки глобулина, которые отделяют фильтрованием в течение 8-10 минут. Белки глобулина остаются в осадке, а альбумины остаются в фильтрате. Для осаждения альбуминов в фильтрате, добавляют кристаллы сульфата аммония до их насыщения, в результате чего альбумины выпадают в осадок, а затем осадок фильтруют.

Берем 2-3 мл фильтрата и проведем биуретовую реакцию. Если белки полностью осаждаются, реакции биурета с фильтратом не произойдет. Осадки глобулина и альбумина растворяют в воде и проводят биуретовую реакцию.

Осаждение белков под действием хлорида натрия

Реактивы. 1. Кристаллы хлоридно-натриевой соли. 2. 2%-ный раствор уксусной кислоты.

Ход работы: В пробирку добавить 2-3 мл сыворотки или яичного белка и пропитать кристаллами NaCl до насыщения. Через 3-5 минут в растворе образуется осадок глобулинов. Затем

осадок фильтруют. Альбумины остаются в фильтрате. Альбумины не осаждаются в нейтральных растворах до тех пор, пока они не станут насыщенными. К фильтрату добавляют 4-6 капель 2%-ного раствора уксусной кислоты, в результате чего выпадает альбумин, и через 10 минут осадок фильтруют. Осадки растворяют в воде и проводят реакцию биурета.

Осаждение белков под действием минеральных кислот

Белки осаждаются под действием концентрированных минеральных кислот (кроме ортофосфатной кислоты). Эта реакция является необратимой, поскольку коллоидные частицы белка денатурируются, а их заряды нейтрализуются, что приводит к образованию сложных соединений. В этом случае белки претерпевают необратимую денатурацию. Избыточные минеральные кислоты (кроме азотной) растворяют осажденные белки.

Реактивы: 1. Концентрированная соляная кислота. 2. Концентрированная серная кислота. 3. Раствор яичного белка; соевый белок.

Ход работы: В три пробирки осторожно добавьте по 1 мл: в первую - соляную кислоту, во вторую - серную кислоту, в третью - азотную кислоту. Затем ко всем пробиркам добавляют по 1 мл раствора оксида. Затем на границе между белком и кислотой образуется белое кольцо. Каждую пробирку медленно встряхивают. Из-за наличия избытка хлорида и серной кислоты осадок в двух пробирках растворяется, осадок, образованный азотной кислотой в третьей пробирке, не растворяется, поскольку образовавшийся осадок не растворяется в избытке азотной кислоты.

Осаждение белков органическими растворителями

Под действием органических растворителей (спирт, эфир, ацетон и др.) водная оболочка (гидросферы) макромолекул белка разрушается, т.е. денатурируется, что приводит к снижению растворимости белков в растворе и осаждению белка. Когда соль присутствует в растворе белка (NaCl), она вызывает изменение

заряда коллоидных частиц, что еще больше снижает сопротивление растворов белка. При осаждении в холодных условиях спиртом (хлороформом) образовавшийся белковый осадок растворим в воде, т.е. свойства белка не изменяются. Если белок остается в спирте длительное время, он претерпевает денатурацию и образующийся осадок не растворяется в воде, растворе нейтральных солей.

Реактивы: 1. Белковый раствор. 2. 96%-ный этиловый спирт. 3. Ацетон. 4. Хлороформ. 5. Кристаллы хлорида натрия.

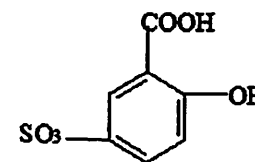
Ход работы: В три пробирки добавьте по 1-2 мл белка, затем добавьте 0,2-0,3 г соли хлорида натрия и хорошо перемешайте.

В первую пробирку добавьте 2-3 мл спирта, во вторую - 2-3 мл ацетона, в третью - 2-3 мл хлороформа. Пробирки встряхивают и через 5-6 минут можно увидеть, что образовался белковый осадок.

Осаждение белков органическими кислотами

Органические кислоты переводят белки из раствора в необратимый осадок. Эффективность различных кислот варьируется.

Наиболее эффективными и специфическими являются сульфосалициловая и трихлоруксусная кислоты.



CCl_3COOH

Трихлоруксусная кислота

Сульфосалициловая кислота

Под действием трихлоруксусной кислоты осаждаются только белки, а под действием сульфосалициловой кислоты, помимо белков, осаждаются пептоны и полипептиды.

Реактивы: 1. Раствор яичного белка; соевый белок. 2. 10%-ный раствор сульфосалициловой кислоты. 3. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

Ход работы: Возьмите две пробирки добавьте по 2 мл раствора белка и в первую пробирку добавьте 5-8 капель сульфосалициловой кислоты, а ко второй пробирке 5-8 капель трихлоруксусной кислоты. Пробирки встряхивают и наблюдают за осаждением белков.

Осаждение белков под действием солей тяжелых металлов

Белки осаждаются под воздействием солей меди, свинца, ртути, цинка, серебра и других тяжелых металлов.

Взаимодействие ионов тяжелых металлов с белками очень сложный процесс. Сначала образуются нерастворимые в воде комплексные соединения, растворимые в избытке солевого раствора (AgNO_3 , HgCl_2). Белки денатурируются под действием солей тяжелых металлов. Нарушается вторичная и третичная структура белковой макромолекулы, меняются состояния пептидной цепи, возникают случаи разрыва связей между ними (дисульфидные связи). Дисульфидные связи играют важную роль во вторичной и третичной структурной структуре белков. Разрыв между цепями приводит к изменению структуры белка - необратимой денатурации белков.

Реактивы. 1. Яичный белок; соевый белок. 2. 5%-ный раствор медного купороса. 3. 5%-ный раствор уксуснокислой соли свинца. 4. 3%-ный раствор нитрата серебра.

Ход работы: В три пробирки добавьте по 1-2 мл белкового раствора. В первую пробирку по каплям добавляют раствора сульфата меди, во вторую пробирку добавляют раствор уксусной кислоты свинца, а к третьей пробирке добавляют раствор нитрата серебра. При встряхивании растворов во всех растворах образуется белковый осадок. При добавлении избытка реагента осадок не растворяется, даже при добавлении избытка раствора нитрата серебра.

Осаждение белков алкалоидными реактивами

Алкалоиды - это азотсодержащие органические вещества, обладающие сильным физиологическим действием. К алкалоидам относятся: морфин, папаверин, атропин, кофеин, эфедрин и другие соединения, которые широко используются в терапевтической практике.

Под действием многих алкалоидных реактивов белки выпадают в осадок. К ним относятся танин, раствор йода в йодиде калия (реактив Бушарда), раствор висмута йода в йоде калия (реактив Драгендорфа), пикриновая кислота и другие.

Основная причина осаждения белковых веществ алкалоидными реактивами - схожесть гетероциклических групп, составляющих аминокислоты и алкалоиды (индол, имидазол и др.). Алкалоидные реактивы образуют с белками нерастворимые соединения. Сильные органические кислоты (например, уксусная кислота) хорошо влияют на осаждение белка с помощью алкалоидных реактивов, тогда как сильные кислоты сопротивляются этому процессу. Осадок плавится в щелочных условиях.

Реактивы: 1. Яичный белок; соевый белок. 2. 1%-ный раствор пикриновой кислоты. 3. 10%-ный раствор танина. 4. Реактив Бушарда: 1 г йод, 2 г йодид калия, 50 мл воды. Для приготовления этого реагента йодид калия растворяют в нескольких мл воды. В этом растворе растворяют йод, затем объем доводят дистиллированной водой до 50 мл. 5. Раствор йода висмута в йодиде калия реактива Драгендорфа: 13,5 г йодида калия растворяют в 20 мл дистиллированной воде. 2,5 г нитрата висмута растворяют отдельно в 10 мл азотной кислоте. Затем его оставляют в контейнере. В этом случае на дно сосуда оседают кристаллы нитрата калия. Прозрачный раствор при необходимости переливают в другую емкость и водой доводят объем до 50 мл. 6. 1%-ный раствор уксусной кислоты.

Ход работы: В четыре пробирки добавьте 1-2 мл белкового раствора, затем по 3-5 капель 1%-ного раствора уксусной кислоты в каждую пробирку. Затем к первому раствору добавляют 4-5 капель раствора пикриновой кислоты, ко второму раствору 2-4 капли раствора танина, к третьему раствору 2-4 капли реактива Бушарда, а к четвертому раствору 2-4 капли реактива Драгендорфа. В результате образуется белковый осадок.

Осаждение белков при высоких температурах

Все белки выпадают в осадок при высоких температурах. Белки легко выпадают в осадок в слабокислой среде. Под

воздействием высоких температур в сильно щелочной и кислой среде белки не выпадают в осадок, так как молекулы белка имеют сильный положительный или сильный отрицательный заряд.

Реактивы: 1. Раствор яичного белка; соевый белок. 2. 2%-ный раствор уксусной кислоты. 3. 10%-ный раствор гидроксида натрия. 4. Насыщенный раствор хлорида натрия.

Ход работы: 1. Возьмите шесть пробирок и добавьте по 10 капель белкового раствора. К пробиркам № 2,3 добавляют 2 капли 2%-ного раствора уксусной кислоты. К пробиркам № 4,5 добавьте 10 капель раствора уксусной кислоты. В шестую пробирку добавьте 2 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия. Теперь добавьте в пробирки 3 и 5 по 4 капли насыщенного раствора хлорида натрия. Все пробирки нагревают до кипения. Определяется скорость оседания растворов в пробирках.

По результатам эксперимента заполняется таблица:

№	По сколько капель вещества добавляют в пробирку			
	Белок	CH ₃ COOH	NaOH	NaCl
1	10	-	-	-
2	10	2	-	-
3	10	2	-	4
4	10	10	-	-
5	10	10	-	4
6	10	-	2	-

Диализ белков

Диализом называют процесс разделения высокомолекулярных веществ (например, белков) и низкомолекулярных (например, солей) с помощью полупроницаемых мембран.

Полупроницаемыми называют мембраны, диаметр пор которых позволяет проходить только низкомолекулярным соединениям. Примером естественных полупроницаемых мембран могут

быть капсулы Боумена—Шумлянського почек. Широко используют искусственные полупроницаемые мембраны: целлофан, коллодий, на основе которых созданы диализаторы, в том числе «искусственная почка».

Метод диализа используют в научных лабораториях, в промышленности, в клинической практике.

Метод основан на том, что низкомолекулярные вещества легко диффундируют через полупроницаемые мембраны в чистый растворитель, образуя диализат. Диффузия будет продолжаться, пока не произойдет выравнивание концентраций диффундируемого вещества между диализируемым раствором и диализатом. Процесс возобновится, если диализат заменить чистым растворителем или, если эта смена будет происходить постоянно (проточный диализ).

Реактивы: 1. раствор яичного белка или соевой муки 2. насыщенный раствор соли (NaCl) 3. 1%-ный раствор нитрата серебра 4. 20%-ный раствор гидроксида натрия 5. 2%-ный раствор сульфата меди.

Ход работы: Одна сторона стеклянной трубки длиной 10-12 см и диаметром 0,7 см покрывают целлофаном. В стеклянную пробирку наливают 5-6 капель белкового раствора и 2-3 капли солевого раствора. Затем стеклянную трубку погружают в раствор, содержащий 2-3 мл воды. Через 10-15 минут стеклянную пробирку удаляют и дистиллированную воду проверяют на наличие хлоридов и белка.

Для определения хлоридов добавляют 0,5 мл раствора в дистиллированную воду и добавляют 0,2 мл 1%-ного раствора нитрата серебра. В этом случае хлорид серебра выпадает в осадок.

Биуретовую реакцию используют для определения белков. Для этого берут 0,5 мл дистиллированной воды, добавляют к ней 0,5 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия и 5-10 капель 2%-ного раствора сульфата меди. Отсутствие фиолетового цвета свидетельствует об отсутствии белка.

воздействием высоких температур в сильно щелочной и кислой среде белки не выпадают в осадок, так как молекулы белка имеют сильный положительный или сильный отрицательный заряд.

Реактивы: 1. Раствор яичного белка; соевый белок. 2. 2%-ный раствор уксусной кислоты. 3. 10%-ный раствор гидроксида натрия. 4. Насыщенный раствор хлорида натрия.

Ход работы: 1. Возьмите шесть пробирок и добавьте по 10 капель белкового раствора. К пробиркам № 2,3 добавляют 2 капли 2%-ного раствора уксусной кислоты. К пробиркам № 4,5 добавьте 10 капель раствора уксусной кислоты. В шестую пробирку добавьте 2 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия. Теперь добавьте в пробирки 3 и 5 по 4 капли насыщенного раствора хлорида натрия. Все пробирки нагревают до кипения. Определяется скорость оседания растворов в пробирках.

По результатам эксперимента заполняется таблица:

№	По сколько капель вещества добавляют в пробирку			
	Белок	CH ₃ COOH	NaOH	NaCl
1	10	-	-	-
2	10	2	-	-
3	10	2	-	4
4	10	10	-	-
5	10	10	-	4
6	10	-	2	-

Диализ белков

Диализом называют процесс разделения высокомолекулярных веществ (например, белков) и низкомолекулярных (например, солей) с помощью полупроницаемых мембран.

Полупроницаемыми называют мембраны, диаметр пор которых позволяет проходить только низкомолекулярным соединениям. Примером естественных полупроницаемых мембран могут

быть капсулы Боумена—Шумлянского почек. Широко используют искусственные полупроницаемые мембраны: целлофан, коллодий, на основе которых созданы диализаторы, в том числе «искусственная почка».

Метод диализа используют в научных лабораториях, в промышленности, в клинической практике.

Метод основан на том, что низкомолекулярные вещества легко диффундируют через полупроницаемые мембраны в чистый растворитель, образуя диализат. Диффузия будет продолжаться, пока не произойдет выравнивание концентраций диффундируемого вещества между диализируемым раствором и диализатом. Процесс возобновится, если диализат заменить чистым растворителем или, если эта смена будет происходить постоянно (проточный диализ).

Реактивы: 1. раствор яичного белка или соевой муки 2. насыщенный раствор соли (NaCl) 3. 1%-ный раствор нитрата серебра 4. 20%-ный раствор гидроксида натрия 5. 2%-ный раствор сульфата меди.

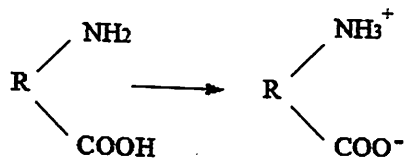
Ход работы: Одна сторона стеклянной трубки длиной 10-12 см и диаметром 0,7 см покрывают целлофаном. В стеклянную пробирку наливают 5-6 капель белкового раствора и 2-3 капли солевого раствора. Затем стеклянную трубку погружают в раствор, содержащий 2-3 мл воды. Через 10-15 минут стеклянную пробирку удаляют и дистиллированную воду проверяют на наличие хлоридов и белка.

Для определения хлоридов добавляют 0,5 мл раствора в дистиллированную воду и добавляют 0,2 мл 1%-ного раствора нитрата серебра. В этом случае хлорид серебра выпадает в осадок.

Биуретовую реакцию используют для определения белков. Для этого берут 0,5 мл дистиллированной воды, добавляют к ней 0,5 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия и 5-10 капель 2%-ного раствора сульфата меди. Отсутствие фиолетового цвета свидетельствует об отсутствии белка.

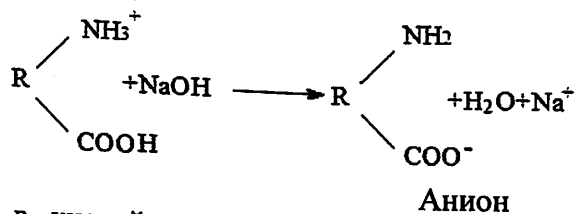
Определение изоэлектрической точки белка

Белок как амфотерный полиэлектролит содержит положительные и отрицательные заряды, соотношение которых определяется количеством кислых и основных аминокислот в его макромолекуле.

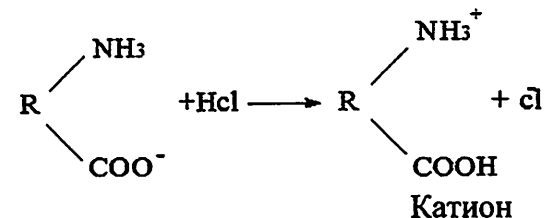


Заряженность молекулы белка является одним из факторов его устойчивости в растворах, так как мешает слипанию белковых частиц и выпадению их в осадок. На общий заряд макромолекулы белка влияет pH среды. Для каждого белка существует значение pH, при котором сумма положительных и отрицательных зарядов его равна нулю. Это состояние белка называется изоэлектрическим, а соответствующее такому состоянию значение pH называется изоэлектрической точкой. В изоэлектрической точке растворы белков неустойчивы и белки легко выпадают в осадок, особенно в присутствии водоотнимающих веществ (этиловый спирт, ацетон и т.д.).

В щелочной среде белки имеют избыток COO^- - групп и действуют как анионы. Например, натриевая щелочь образует натриевую соль белков:



Напротив, в кислой среде белок имеет аммонизационные группы NH_3^+ и действует по отношению к катоду как положительный ион:



В форме амфионов молекула белка теряет заряд, и такая коллоидная частица теряет устойчивость в растворе. Сумма положительных и отрицательных зарядов белков равна нулю, а pH раствора, который не перемещается к катоду или аноду в электрическом поле, называется изоэлектрической точкой белков. Изоэлектрическая точка разных белков соответствует разным величинам pH, поскольку количество групп с щелочным и кислотным характером в молекулах белков не равно, при разных значениях pH их скорость диссоциации одинакова, а молекула обычно электронейтральна. Например, казеин имеет pH 4,2; белок яичного альбумина 4,8; желатиновый 4,9; зеин (кукурузный белок) равен 6,2. Изоэлектрическая точка протаминов и гистонов соответствует слабощелочной среде.

В изоэлектрической точке белков добавляются водопоглощающие вещества (спирт, ацетон, эфир) или танин для ускорения осаждения. Органические растворители разрушают водную оболочку макромолекулы белка, например, азотные гетероциклические группы с танином образуют нерастворимые в воде соединения.

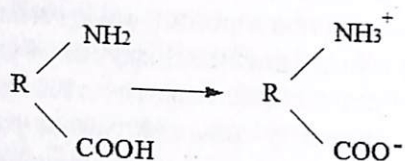
Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки 2 и 10 мл.

Реактив: 1. 1%-ный раствор желатина. 2. 0,1 Н раствор уксусной кислоты. 3. 0,1Н - ный раствор натриевой соли уксусной кислоты. 4. 96%-ный этиловый спирт. 5. 0,1%-ный раствор танина.

Ход работы: Буферные растворы с разным pH готовятся в пяти пробирках: из раствора уксусной кислоты и раствора натриевой соли уксусной кислоты в количестве, указанном в таблице. Затем в каждый раствор добавляют по 1 мл раствора желатина и хорошо перемешивают. Затем к растворам добавляют по 4 мл спирта (или 1 мл раствора танина) и перемешивают.

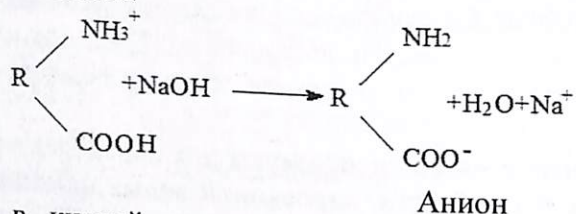
Определение изоэлектрической точки белка

Белок как амфотерный полиэлектролит содержит положительные и отрицательные заряды, соотношение которых определяется количеством кислых и основных аминокислот в его макромолекуле.

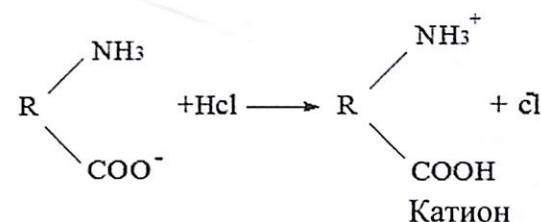


Заряженность молекулы белка является одним из факторов его устойчивости в растворах, так как мешает слипанию белковых частиц и выпадению их в осадок. На общий заряд макромолекулы белка влияет pH среды. Для каждого белка существует значение pH, при котором сумма положительных и отрицательных зарядов его равна нулю. Это состояние белка называется изоэлектрическим, а соответствующее такому состоянию значение pH называется изоэлектрической точкой. В изоэлектрической точке растворы белков неустойчивы и белки легко выпадают в осадок, особенно в присутствии водоотнимающих веществ (этиловый спирт, ацетон и т.д.).

В щелочной среде белки имеют избыток COO^- - групп и действуют как анионы. Например, натриевая щелочь образует натриевую соль белков:



Напротив, в кислой среде белок имеет аммонизационные группы NH_3^+ и действует по отношению к катоду как положительный ион:



В форме амфионов молекула белка теряет заряд, и такая коллоидная частица теряет устойчивость в растворе. Сумма положительных и отрицательных зарядов белков равна нулю, а pH раствора, который не перемещается к катоду или аноду в электрическом поле, называется изоэлектрической точкой белков. Изоэлектрическая точка разных белков соответствует разным величинам pH, поскольку количество групп с щелочным и кислотным характером в молекулах белков не равно, при разных значениях pH их скорость диссоциации одинакова, а молекула обычно электронейтральна. Например, казеин имеет pH 4,2; белок яичного альбумина 4,8; желатиновый 4,9; зеин (кукурузный белок) равен 6,2. Изоэлектрическая точка протаминов и гистонов соответствует слабощелочной среде.

В изоэлектрической точке белков добавляются водопоглощающие вещества (спирт, ацетон, эфир) или танин для ускорения осаждения. Органические растворители разрушают водную оболочку макромолекулы белка, например, азотные гетероциклические группы с танином образуют нерастворимые в воде соединения.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки 2 и 10 мл.

Реактив: 1. 1%-ный раствор желатина. 2. 0,1 Н раствор уксусной кислоты. 3. 0,1Н - ный раствор натриевой соли уксусной кислоты. 4. 96%-ный этиловый спирт. 5. 0,1%-ный раствор танина.

Ход работы: Буферные растворы с разным pH готовятся в пяти пробирках: из раствора уксусной кислоты и раствора натриевой соли уксусной кислоты в количестве, указанном в таблице. Затем в каждый раствор добавляют по 1 мл раствора желатина и хорошо перемешивают. Затем к растворам добавляют по 4 мл спирта (или 1 мл раствора танина) и перемешивают.

Через 15-20 минут в растворах образуется помутнение, степень помутнения зависит от буферной смеси в растворах. Известно, что максимальная мутность рН-смеси соответствует изоэлектрической точке желатина. Изоэлектрическая точка желатина составляет рН 4,7. Знак +, помещенный на осадкообразующие растворы в таблице, указывает на степень образования осадка.

Определение изоэлектрической точки белков:

Пробирки	Количество буферных смесей		рН смесей	1% раствор желатина, мл	Этиловый спирт, мл	Скорость осаждения (+)
	0,1н CH_3COOH	0,1н CH_3COONa				
1	1,8	0,2	3,8	1	4	
2	1,4	0,6	4,4	1	4	
3	1,0	1,0	4,7	1	4	
4	0,6	1,4	5,1	1	4	
5	ОД	1,8	5,7	1	4	

Разделение аминокислот с помощью бумажной хроматографии

Самый простой, легкий и точный метод разделения аминокислот - это бумажная хроматография. Метод хроматографии был изобретен в 1903 году русским ученым М.С. Цветом. Для бумажной хроматографии можно использовать любую высококачественную фильтровальную бумагу.

Метод разделения и определения аминокислот заключается в том, чтобы нанести их смесь на фильтровальную бумагу и окунуть один конец бумаги в соответствующий органический растворитель. Растворитель пропитывается фильтровальной бумагой и переносит (склеивает) аминокислоты. Скорость переноса аминокислот на бумагу зависит от их химической структуры, степени растворимости в растворителях. Некоторые аминокислоты имеют разную растворимость в разных растворах. Обычно одним из этих растворов является вода, а другим - органический растворитель, насыщенный водой (фенол, бутиловый спирт и т. Д.). Обычно используются органические растворители, смешанные с водой или частично смешанные.

Отношение расстояния, пройденного аминокислотой (а) к расстоянию, пройденному раствором (b), называется коэффициентом разделения аминокислот. Коэффициент разделения аминокислот (R_f) постоянен в данном растворе для каждой аминокислоты и определяется следующим образом.

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

В бумажной хроматографии аминокислоты разделяют двумя способами. Это метод хроматографии, который движется вверх и вниз.

Также существует метод односторонней и двусторонней хроматографии. В методе односторонней хроматографии разделение веществ происходит в одном направлении. В этом случае близкие к R_f аминокислоты, по 2-3 соединяются и разделяются. Для их разделения используется двусторонняя хроматография. Вовлечены два органических растворителя. Разделение осуществляется последовательно в двух взаимно перпендикулярных направлениях.

Реактивы: водонасыщенный раствор фенола, 0,1%-ный раствор нингидрина, 0,1%-ный раствор смеси аминокислот (растворим в 80%-ном растворе этилового спирта).

Ход работы: Из фильтровальной бумаги готовят полоски длиной 12-14 см и шириной 1,5 см. Сверху этой ленты продеваем иглой нить 15-20 см. Нарисуйте прямую линию в 1 см от низа бумаги и круг диаметром 0,5 см в середине. В середину круга при помощи капилляра капните 2-3 капли аминокислотной смеси. Область капель высушите на воздухе. Постепенно налейте 2 мл водонасыщенного раствора фенола на дно пробирки длиной 18-20 см и диаметром 2 см, не касаясь стенок пробирки. Удерживая подготовленную бумажную нить, опустите ее в раствор так, чтобы конец бумаги был на 2-3 мм погружен в растворитель и устойчиво стоял вертикально. Накройте пробирку пробкой и поместите в термостат при 40-50°C на 1,5-2 часа. Раствор в пробирке после подъема на 10-12 см по бумажной ленте снимают хроматограмму и сушат в течении 10-15 мин при 100°C. На хроматограмме образуются цветные пятна. Чтобы разделение аминокислот было четким, должна быть получена смесь

аминокислот, которые обычно больше отличаются друг от друга по Rf.

Контрольные вопросы

1. Задачи биохимической науки.
2. Какое значение имеет биохимическая наука в медицине, сельском хозяйстве и промышленности?
3. Перечислите имена ученых, вложивших свой вклад в развитие биохимической науки.
4. Какие биологические функции выполняют белки?
5. Классификация аминокислот в зависимости от их физико-химических свойств.
6. Физико-химические свойства аминокислот.
7. Напишите формулы незаменимых аминокислот.
8. Напишите амфотерные свойства белков.
9. Напишите образование пептидной связи.
10. Напишите химические связи, имеющиеся в белковой молекуле.
11. Уровни структуры белков.
12. Денатурация белков и их биологическое значение.
13. Расскажите о физико-химических свойствах белков.
14. Классификация белков.
15. Простые белки
16. Сложные белки

ГЛАВА III. СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

Ключевые слова: сложные белки, изоэлектрическая точка, денатурация, химические связи, структура белков, молекулярная масса, природные пептиды, нуклеопротены, липопротены

Помимо аминокислот в макромолекулу сложных белков входят и другие небелковые компоненты (простетическая группа). Сложные белки делятся на следующие группы по химической природе простетических групп (нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды, витамины, металлы и т. д.): нуклеопротены, хромопротены, гликопротены, липопротены, металлопротены и фосфопротены.

Нуклеопротены

Протеидные группы нуклеопроteidов состоят из нуклеиновых кислот - ДНК или РНК. Нуклеопротены хорошо растворимы в щелочных условиях и выпадают в осадок под действием кислот. Дезоксирибонуклеопротены осаждаются в физиологическом растворе с низкой концентрацией и растворимы в солевом растворе с высокой концентрацией.

Когда нуклеопротены частично гидролизуются разбавленными кислотами, из них высвобождаются белки и нуклеиновые кислоты. При гидролизе самих нуклеиновых кислот один за другим образуются следующие продукты разложения:



Выделение дезоксирибонуклеопротеинов из печени и селезенки

Этот тип нуклеопротеинов является наиболее важным компонентом ядра клетки. Их также называют ядерными белками. Печень, селезенка, поджелудочная железа, почки богаты нуклеопротеинами. Характерной особенностью ядерных белков является то, что они хорошо растворяются в сильных растворах солей (хлорид натрия и др.) и осаждаются в кислых растворах.

Необходимые инструменты: центрифуга; ножницы; ступка; стакан 300 и 400 мл; цилиндр 100 мл; технические весы.

Реактивы: 1. Печень или селезенка крупнорогатого скота, кролика, свиньи (свежие или замороженные). 2. 5%-ный раствор хлорида натрия. 3. Деревянная палка.

Ход работы. Возьмите 2-2,5 г печени или селезенки, хорошо растереть ножницами, затем растолочь в ступке с небольшим количеством 5%-ного раствора натрия хлорида. Затем добавить в ступку 70-80 мл раствора NaCl и растереть 10-15 минут. Гомогенат в ступке разливают в центрифужные чашки и центрифугируют со скоростью 2500 об/мин в течении 10-15 мин; затем осадок отбрасывают, и объем жидкой части измеряют с помощью цилиндра.

Шестикратный объем воды по сравнению с жидкостью наливается в мерный стаканчик, и жидкость выливается в воду, вращая ее деревянной палкой. Дезоксирибонуклеопротеины начинают выпадать в осадок в волокнистом состоянии, их заворачивают в деревянную палочку и помещают в пробирку. Их используют для качественных реакций с нуклеопротеинами.

Выделение нуклеопротеинов из дрожжей и их гидролиз

Дрожжевые грибы часто используют для изучения нуклеопротеинов. При кратковременном гидролизе дрожжевых грибов они распадаются на полипептиды, пуриновые и пиримидиновые основания, а также на рибозу, дезоксирибозу и фосфорную кислоту. Полученные продукты определяют с помощью специальных реакций.

Ход работы: В фарфоровую ступку поместить 2 г дрожжевых грибов, добавить 3-4 капли эфира и 2-4 мл дистиллированной воды. Вы можете добавить немного стеклянного порошка для лучшего измельчения. Дрожжи измельчают 1-2 минуты до образования однородной массы. Добавляют 8 мл 0,4%-ного раствора гидроксида натрия и измельчают 10-15 минут. Затем смесь в ступке фильтруют и к фильтрату добавляют 2-3 мл 5%-ного раствора ацетата. В этом случае выпадают нуклеопротеины. Осадок отделяют центрифугированием или фильтрацией и гидролизуют. Осадок помещают в широкую пробирку и добавляют 6-10 мл 10%-ного раствора серной кислоты. В качестве холодильника стеклянная трубка длиной 25-30 см закрывается пробкой и гидролизуются в кипятке в течение 1 часа. Гидролизат используется в следующих работах.

Заметка. Можно гидролитически расщепить нуклеопротеины, не отделяя их от дрожжей. Для этого в колбу помещают 1 г прессованных дрожжей, порошок добавляют к 30-40 мл 5%-ного раствора серной кислоты, закрывают колбу пробкой, наложенным на стеклянную трубку, и кипятят 1-1,5 часа. Затем трубку охлаждают и фильтруют. Выполняются показанные реакции с фильтратом.

1. Биуретовую реакцию проводят с фильтратом на полипептиды. В пробирку добавляют 1-2 мл фильтрата, 1-2 мл 10%-ного

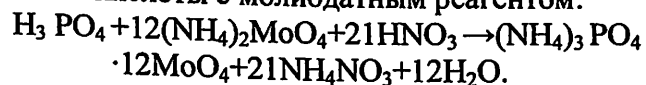
раствора гидроксида натрия и, добавляя 3-4 капли 1%-ного раствора CuSO_4 , хорошо перемешивают, в результате чего получается пурпурный цвет, характерный для пептидной связи в белках.

2. Чтобы узнать наличие пуриновых оснований, добавьте к раствору 2 мл фильтрата, добавить 5-6 капель концентрированного аммиака, затем добавить 0,5 мл аммиачного раствора нитрата серебра. Через несколько минут образуется осадок серебряной соли пуриновых оснований.

3. Для пентоз проводят реакцию Троммера. Рибоза в щелочных условиях сульфат меди превращает в гидроксид меди ($\text{Cu}(\text{OH})_2$). Добавить к раствору 1-2 мл фильтрата и равный объем гидроксида натрия, перемешать, добавить 2-3 капли медного купороса и нагреть.

В результате реакции образуется красный осадок гидроксида меди ($\text{Cu}(\text{OH})_2$).

4. Реакция на фосфорную кислоту. Фосфорная кислота образует желтую кристаллическую аммониевую соль фосфомолибденовой кислоты с молибдатным реагентом:

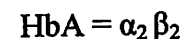


Добавить в пробирку 1-2 мл фильтрата, добавить равный объем молибдатного реагента и кипятить 2-3 минуты. В результате аммониевая соль фосфомолибдатовой кислоты образует желтый осадок.

Хромопротеины

Хромопротеины (хромо-греческий цвет, краситель) - это сложные белки, состоящие из простых белковых глобулинов, простетической группы (небелковая часть) и цветового соединения (пигмента). Связанная с белком цветовая группа различных хромопротеинов принадлежит к разным классам органических соединений и богата различными металлами - железом, медью, магнием, молибденом или пиксом, кобальтом и другими. Вот почему их еще называют металлопротеинами. Важнейшим представителем хромопротеинов являются порфириновые струк-

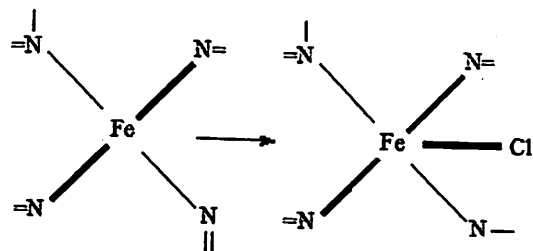
турно сложные белки, состоящие из присоединения пиррольных колец к простетической группе. К ним относятся зеленый пигмент растений - белковое соединение с хлорофиллом, гемоглобин в крови животных и человека, пигмент мышечного дыхания - миоглобин и ряд оксидазных ферментов. Гемоглобин - это металлопротеин, состоящий из белка-глобина (гистона) и протопорфина простетической группы железа, называемого гемом, который содержится в красных кровяных тельцах - эритроцитах. Его физиологическая функция - переносить кислород из легких в ткани. Практически во всех эритроцитах позвоночных молекулярная масса гемоглобина составляет около 66000. Гемоглобин состоит из четырех идентичных пар субъединиц.



α -субъединицы составляют 141, а β -субъединицы 146 аминокислотных остатков.

В составе гемоглобина различают белок глобин и небелковую пигментную группу - гем, соединенные между собой гистидиновым мостиком; каждая молекула гемоглобина содержит четыре гема и четыре полипептидные цепи. На долю гема по массе приходится 4% молекулы гемоглобина, глобина - 96 %.

Гем - это сложная молекула, состоящая из четырех азотсодержащих гетероциклических пиррольных колец. Пиррольные кольца связаны друг с другом метилом ($=\text{CH}-$), а порфириновый скелет находится в координационной связи с атомом двухвалентного железа в драгоценном камне. Атом железа также связан с азотом в остатке гистидина. Кроме того, пропионильные остатки часто связаны с остатками лизина из основных аминокислотных остатков из-за их электростатических сил. Таким образом, связь между драгоценным камнем и глобином достаточно прочная.



Эксперимент проводится на микроскопическом стекле, поскольку образующиеся кристаллы гемина имеют очень характерный внешний вид, что делает эту реакцию удобной для исследователей крови.

Существует ряд других железопорфириновых белков, близких к гемоглобину по химической структуре. К ним относится пигмент миоглобин в мышцах позвоночных и беспозвоночных. Этот металлопротеин имеет молекулярную массу 17000, он состоит из единственной полипептидной цепи, содержащей атом железа. Миоглобин также имеет свойство воспроизводиться кислородом, подобным гемоглобину. Другие важные белки железа в этой серии состоят из группы оксидазных пигментов в клетке, называемых цитохромами.

Полностью изученный представитель цитохромов - цитохром С - имеет молекулярную массу 13 000 и содержит одно железо. Обычные ферменты в организме, например, каталаза, содержат четыре атома железа, а пероксидаза - один атом железа.

Выделение кристаллов оксигемоглобина

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки; центрифуга; Мензурки на 100 мл; диаметр 6-8 см воронкой; предметные и покровные стекла для микроскопа.

Реактивы: 1. Кровь только что зарезанного кролика, лошади или другого животного. 2. Диэтиловый эфир. 3. Насыщенный раствор сульфата аммония. 4. 0,9%-ный раствор натрия хлорида. 5. 96%-ный этанол. 6. 0,1%-ный раствор хлорида натрия в уксусной кислоте (0,1 г хлорида натрия растворяют в 100 мл кислоты).

Ход работы: В раствор взять 5 мл крови, добавить к нему смесь эфира (1:1) с 1 мл воды и перемешать до полного гемолиза.

Образовавшаяся красная жидкость называется гемолизированной кровью. Добавить равный объем (6 мл) этой жидкости к насыщенному раствору сульфата аммония, перемешать и центрифугировать или отфильтровать. Фильтрат помещают в пробку и оставляют на холоде на 1 час или 1 день.

Затем на предметное стекло капают каплю фильтрата, покрывают покровным стеклом и смотрят под микроскопом. В красном цвете кристаллы оксигемоглобина проявляются в виде призмы или пластинки различной формы (эта форма зависит от вида животного).

Реакция получения гемина

Гемоглобин разлагается при нагревании в кислых условиях, и под действием хлорида натрия гем превращается в гемин, то есть хлор связывается с атомом железа. В этом случае двухвалентное железо превращается в трехвалентное.

Необходимые инструменты: предметные и покровные стекла; микроскоп.

Реактивы: 1. Кристалл хлорида натрия. 2. Уксусная кислота.

Ход работы: На предметное стекло добавляют несколько капель крови и сушат при температуре не выше 60°C. Засохшую кровь перемешивают, добавляя несколько кристаллов хлорида натрия, 1-2 капли уксусной кислоты, затем крышку накрывают стаканом и осторожно нагревают до кипения.

После охлаждения наблюдаем под микроскопом, в котором кристаллы гемина имеют ромбическую форму (коричневого цвета).

Определение гемина амидопирином

Необходимые инструменты: пипетки, штатив с пробирками.

Реактивы: 1. Дефибринированная кровь. 2. 5%-ный спиртовой раствор амидопирина (пирамидона). 3. 30%-ный раствор уксусной кислоты. 4. Перед использованием готовят 3%-ный раствор перекиси водорода в воде.

Ход работы: К раствору добавляют 1-2 мл раствора разбавленной дефибринированной крови и в равных количествах

добавляют 10-15 капель спиртового раствора амидопирин в растворе уксусной кислоты и перекиси водорода. В результате получится сине-фиолетовый цвет.

Гликопротеины

Гликопротеины – сложные белки, содержащие, помимо простого белка или пептида, группу гетероолигосахаридов. В настоящее время их принято называть гликоконъюгатами. В состав гликоконъюгата входит углеводный компонент (гликоновая фракция), ковалентно связанный с неуглеводной частью (агликоновая фракция), представленной белком, пептидом, аминокислотой или липидом.

Гликопротеины распространены в организме животных. Они встречаются практически во всех тканях. Некоторые из них участвуют в выполнении своих механических функций, а другие способствуют прохождению пищи в желудок и пищеварению. Гликопротеины также включают группу веществ в крови, ферменты, такие как холинэстераза и другие. Гликопротеины также содержатся в семенах ряда растений (ячмень, пшеница и др.). Простетическая группа ряда гликопротеинов состоит из мукополисахаридов, которые называются мукопротеинами.

Основные представители этой группы также встречаются во всех тканях. Это муцины и мукоиды, которые часто встречаются в костях, роговице, стекловидном теле и слюне. Ряд мукополисахаридов (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфатная кислота, гепарин) играют важную роль в организме

Выделение муцина из слюны

Муцин-жидкость, содержащаяся в слюне и секретах различных слизистых желез, имеет высокую вязкость, облегчает попадание пищи в желудок, защищает слизистую оболочку рта от вредных механических, термических и химических воздействий.

Муцин – это белок с кислотными свойствами, нерастворимый в воде и легко растворимый в щелочной и соляной кислоте. Щелочной раствор муцина выпадает в осадок под действием уксусной кислоты.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; стеклянный стержень; пипетки.

Реактивы: 1. 1%-ный раствор уксусной кислоты. 2. 10%-ный раствор гидроксида натрия. 3. 0,1%-ный раствор соляной кислоты. 4. 1%-ный раствор медного купороса. 5. 0,2%-ный раствор альфа-нафтола. 6. Концентрированная серная кислота.

Ход работы: В три пробирки налить 2–3 мл слюны и в каждую пробирку добавить 1%-ного раствора уксусной кислоты до образования осадка муцина. В следующем процессе осадок промывают водой.

К осадку муцина в первой пробирке добавляют 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и перемешивают, после чего после полного растворения осадка проводят биуретовую реакцию. Для этого добавьте еще 10 капель гидроксида натрия и 1-2 капли раствора медного купороса и встряхните раствор. В результате появляется розовая или пурпурная сыпь.

Осадок во второй пробирке растворяется при добавлении 1 мл 0,1%-ного раствора соляной кислоты.

К осадку муцина в третьей пробирке добавляют 6-8 капель альфа-нафтола и осторожно добавляют 1-2 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей образуется фиолетовый цвет. Эта реакция формируется простетической группой моносахаридов муцина и их производных, т.е. под действием серной кислоты образуются фурфурол и оксиметилфурфол, давая пурпурное соединение с альфа-нафтолом.

Фосфопротеины

Эти белки содержат остаток фосфорной кислоты (0,40-0,88%). Оксиаминокислоты (серин, треонин) связываются с фосфорной кислотой через эфирную связь с образованием соединений фосфора.

добавляют 10-15 капель спиртового раствора амидопирина в растворе уксусной кислоты и перекиси водорода. В результате получится сине-фиолетовый цвет.

Гликопротеины

Гликопротеины – сложные белки, содержащие, помимо простого белка или пептида, группу гетероолигосахаридов. В настоящее время их принято называть гликоконъюгатами. В состав гликоконъюгата входит углеводный компонент (гликоновая фракция), ковалентно связанный с неуглеводной частью (агликоновая фракция), представленной белком, пептидом, аминокислотой или липидом.

Гликопротеины распространены в организме животных. Они встречаются практически во всех тканях. Некоторые из них участвуют в выполнении своих механических функций, а другие способствуют прохождению пищи в желудок и пищеварению. Гликопротеины также включают группу веществ в крови, ферменты, такие как холинэстераза и другие. Гликопротеины также содержатся в семенах ряда растений (ячмень, пшеница и др.). Простетическая группа ряда гликопротеинов состоит из мукополисахаридов, которые называются мукопротеинами.

Основные представители этой группы также встречаются во всех тканях. Это муцины и мукоиды, которые часто встречаются в костях, роговице, стекловидном теле и слюне. Ряд мукополисахаридов (гиалуроновая кислота, хондроитинсульфатная кислота, гепарин) играют важную роль в организме

Выделение муцина из слюны

Муцин-жидкость, содержащаяся в слюне и секретах различных слизистых желез, имеет высокую вязкость, облегчает попадание пищи в желудок, защищает слизистую оболочку рта от вредных механических, термических и химических воздействий.

Муцин – это белок с кислотными свойствами, нерастворимый в воде и легко растворимый в щелочной и соляной кислоте. Щелочной раствор муцина выпадает в осадок под действием уксусной кислоты.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; стеклянный стержень; пипетки.

Реактивы: 1. 1%-ный раствор уксусной кислоты. 2. 10%-ный раствор гидроксида натрия. 3. 0,1%-ный раствор соляной кислоты. 4. 1%-ный раствор медного купороса. 5. 0,2%-ный раствор альфа-нафтола. 6. Концентрированная серная кислота.

Ход работы: В три пробирки налить 2–3 мл слюны и в каждую пробирку добавить 1%-ного раствора уксусной кислоты до образования осадка муцина. В следующем процессе осадок промывают водой.

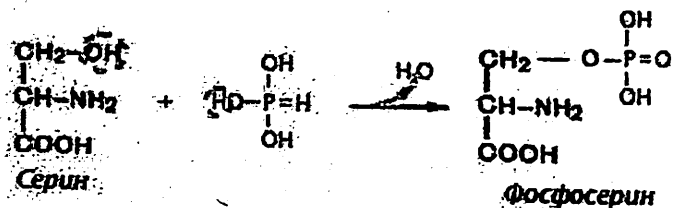
К осадку муцина в первой пробирке добавляют 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и перемешивают, после чего после полного растворения осадка проводят биуретовую реакцию. Для этого добавьте еще 10 капель гидроксида натрия и 1-2 капли раствора медного купороса и встряхните раствор. В результате появляется розовая или пурпурная сыпь.

Осадок во второй пробирке растворяется при добавлении 1 мл 0,1%-ного раствора соляной кислоты.

К осадку муцина в третьей пробирке добавляют 6-8 капель альфа-нафтола и осторожно добавляют 1-2 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей образуется фиолетовый цвет. Эта реакция формируется простетической группой моносахаридов муцина и их производных, т.е. под действием серной кислоты образуются фурфурол и оксиметилфурфол, давая пурпурное соединение с альфа-нафтолом.

Фосфопротеины

Эти белки содержат остаток фосфорной кислоты (0,40-0,88%). Оксиаминокислоты (серин, треонин) связываются с фосфорной кислотой через эфирную связь с образованием соединений фосфора.



Фосфопротеины включают следующие белки, которые играют важную биологическую роль: казеиноген в молоке (казеин), белки яичного желтка вителлин, вителин и витин, белки яиц рыб, ферменты, пепсин, фосфоорилаза, фосфоглюкомутаза и другие.

Фосфопротеины ядра клетки: гистоны и белки негистоновых хроматина фосфорилируются в присутствии фермента протеинкиназы и АТФ. Это фосфорилирование играет главную роль в регуляции хроматина.

Фосфопротеины осаждаются в кислых растворах, не растворимы в воде, растворимы в разбавленных щелочных растворах.

Определение фосфата в казеине

Казеин является представителем фосфопротеинов и выделяется из молока. Казеин расщепляется на белок и остаток фосфорной кислоты в результате щелочного гидролиза.

Необходимые инструменты: пипетки; штатив с пробирками.

Реактивы: 1. 10%-ный раствор гидроксида натрия. 2. 10%-ный раствор серной кислоты. 3. Молибденовый реактив: 3,75 г молибдата аммония растворяют в 50 мл воды и добавляют 50 мл азотной кислоты. 4. 1%-ный раствор медного купороса. 5. Казеин (молотый).

Ход работы: Гидролиз казеина. В пробирку добавить 0,1 г казеина, добавить 10 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и закрыть пробкой в холодильнике. Затем кипятят 10-15 минут и после охлаждения проводят реакцию на продукты гидролиза.

1. Определение белков. Для определения белков проводят биуретовую реакцию. Для этого к 1-2 мл раствора гидроксида

натрия и 2-3 каплям раствора сульфата меди добавляют 1-2 мл гидролизата. Реакция приобретает пурпурный цвет.

2. Определение остатка фосфорной кислоты. К раствору добавляют 1-2 мл гидролизата и 8-10 капель раствора серной кислоты, перемешивают, затем добавляют 10 капель молибденового реактива и нагревают до кипения. Жидкость становится желтой - образуется желтый осадок фосфомолибдата аммония, что свидетельствует о наличии остатка фосфорной кислоты в процессе гидролиза

Экстракция белков из биологических объектов

Чтобы определить качество белков, их сначала нужно разделить в чистом виде. Это один из признаков биологической ценности белков. Его аминокислотный состав проявляется в общем количестве белков, которые он выводит из организма.

Мы используем метод Т. Б. Плешкова при выделении белков от растений.

Реактивы: растительный материал, жидкий азот, боратный буфер

(рН-10), 0,2%-ный раствор бисульфата натрия, белковый спирт, 1%-ный и 10%-ный раствор уксусной кислоты, 0,2%-ный раствор каустической соды, трихлорацетат. 50%-ный раствор кислоты, ацетон, этиловый спирт, диэтиловый эфир.

Экстракция общих белков из растений

Существуют разные способы разделения белков из разных органов растений. Берут образец из лекарственного растения сenna, 50-100 г свежего материала (листья, стебли, плоды или других вегетативных органы) и замораживают в холодильнике или с использованием жидкого азота. Затем замороженный образец измельчают в гомогенизаторе или фарфоровой ступке с раствором боратного буфера (рН-10) в соотношении 1: 4 до образования однородной массы. Чтобы повысить растворимость белков при измельчении, добавьте немного 0,2%-ного раствора бисульфата натрия и 3-4 капли октилового спирта для предотвращения вспенивания. Полученный гомогенат

натрия и 2-3 каплям раствора сульфата меди добавляют 1-2 мл гидролизата. Реакция приобретает пурпурный цвет.

2. Определение остатка фосфорной кислоты. К раствору добавляют 1-2 мл гидролизата и 8-10 капель раствора серной кислоты, перемешивают, затем добавляют 10 капель молибденового реактива и нагревают до кипения. Жидкость становится желтой - образуется желтый осадок фосфомолибдата аммония, что свидетельствует о наличии остатка фосфорной кислоты в процессе гидролиза

Экстракция белков из биологических объектов

Чтобы определить качество белков, их сначала нужно разделить в чистом виде. Это один из признаков биологической ценности белков. Его аминокислотный состав проявляется в общем количестве белков, которые он выводит из организма.

Мы используем метод Т. Б. Плешкова при выделении белков от растений.

Реактивы: растительный материал, жидкий азот, боратный буфер

(рН-10), 0,2%-ный раствор бисульфата натрия, белковый спирт, 1%-ный и 10%-ный раствор уксусной кислоты, 0,2%-ный раствор каустической соды, трихлорацетат. 50%-ный раствор кислоты, ацетон, этиловый спирт, диэтиловый эфир.

Экстракция общих белков из растений

Существуют разные способы разделения белков из разных органов растений. Берут образец из лекарственного растения сенна, 50-100 г свежего материала (листья, стебли, плоды или других вегетативных органы) и замораживают в холодильнике или с использованием жидкого азота. Затем замороженный образец измельчают в гомогенизаторе или фарфоровой ступке с раствором боратного буфера (рН-10) в соотношении 1: 4 до образования однородной массы. Чтобы повысить растворимость белков при измельчении, добавьте немного 0,2%-ного раствора бисульфата натрия и 3-4 капли октилового спирта для предотвращения вспенивания. Полученный гомогенат

замораживают в холодильнике, затем размораживают на шейкере 1-2 часа. По истечении времени его центрифугируют 10-15 минут со скоростью 3000 оборотов в минуту. Перелить раствор в мерную колбу до объема 500 мл. Осадок экстрагируют еще 5-6 раз небольшим объемом буферного раствора. Каждый раз при центрифугировании гомогената растворы переливают в мерную колбу. Весь объем раствора в колбе для экстракции дومتки заполняют дистиллированной водой.

Количество растворенного азота должно составлять 90-95% от общего азота в растении. Чтобы определить белок в растворе по Келдалю, возьмите 20 мл раствора, а также на основе этого можно определить общий азот в тестируемом растительном материале.

Для осаждения растворенных белков раствор наливают в химический стакан емкостью 1000 мл и с помощью 10% -ного раствора уксусной кислоты доводят до pH 4,4-4,5. pH раствора определяется с помощью бумажного индикатора. Если среда становится кислой, ее pH можно снизить до 4,4-4,5 с помощью щелочи. Стакан с раствором нагревают на водяной бане до 70°C, осажденные белки центрифугируют и отделяют. Осажденные белки промывают уксусной кислотой. Для этого в центрифужную пробирку вливают 1%-ный раствор уксусной кислоты, перемешивают осадок, центрифугируют и выливают раствор на осадок.

Белки повторно осаждаются, чтобы разделить их в более чистом виде. Для этого в центрифужные пробирки наливают 0,2 N раствор каустической соды, хорошо перемешивают осадок и переливают жидкость из пробирки в стакан. Пробирку еще несколько раз промывают 0,2 N раствором едкого натра, и их также добавляют к жидкости в химическом стакане. Жидкость в химическом стакане перемешивают на водяной бане при 50°C до полного растворения белков. Нерастворимые частицы отделяют центрифугированием.

Для повторного осаждения белков в стакан, содержащий раствор белка, добавляют 50% трихлоруксусную кислоту до тех пор, пока конечная концентрация в растворе не станет 5%. В этом случае осажденные белки отделяют центрифугированием. Осадок белка в растворе центрифуги промывают ацетоном (5-6 раз), горячим этиловым спиртом (1-2 раза) и эфиром (2-3 раза) (при

центрифугировании эфиром крышка центрифуги должна быть открыта). Каждый раз после центрифугирования жидкость на осадке сливается. Полученные таким образом белковые препараты сушат и хранят при комнатной температуре в вакуум-эксикаторе. Общий азот в оксидных препаратах определяют по методу Кельдаля. Получаемые белковые препараты представляют собой белый или светло-серый порошок, содержащий 14-16% азота.

Разделение белков на отдельные фракции

Для более глубокого изучения белков необходимо разделить их на фракции. Разделение белков на фракции основано на их растворении в разных растворителях.

Белки, выделенные из тканей растений, последовательно экстрагируются водой (альбулины), спиртом (проламины) и щелочными растворами (глутенины). Фракционирование белков также проводится в холодильных камерах при температуре около 4°C.

Ход работы: Взять 25-50 г исследуемого растительного материала, зафиксировать жидким азотом и заморозить в холодильнике. Затем замороженный материал гомогенизируют с водой (1:4) или измельчают в фарфоровой ступке до образования однородной массы. Полученную однородную массу переносят в колбу и встряхивают в течение 1 часа с помощью шейкера. Это обеспечивает полное растворение белков. Затем пробирку оставляют в холодильнике при 0°C на 15-18 часов.

При отделении белков от семян растений семена сначала измельчают в муку мелкого помола. Их жиры и масла разделяются с помощью эфира и ацетона. Порошки ацетона сушат в эксикаторе. Берут 5-10 г ацетонового порошка, смешивают с 30-60 мл воды и встряхивают в течение 1 часа с помощью механического шейкера. Затем пробирку оставляют в холодильнике при 0°C на 15-18 часов.

Экстракция водорастворимых белков. Последующие рабочие процедуры выполняются равномерно, независимо от растительного материала. После того, как белковые растворы вынут из холодильника, их центрифугируют и жидкость в осадке

переливают в большой стакан. Осадок в центрифужном растворе гомогенизируют с трехкратной массой воды, помещают в колбу и встряхивают в течение 30-40 минут. Затем его снова центрифугируют и жидкость в осадке выливают снова в тот же стакан. Экстрагируют водой, повторяют центрифугирование еще 4-5 раз. В этом случае водорастворимые белки полностью экстрагируются, а осадок смешивается с 1М раствором хлорида калия в объеме, в 4-5 раз превышающем массу, и оставляется в холодильнике.

Когда ткань растения экстрагируется водой, в раствор попадают не только белки, но и другие водорастворимые соединения, включая свободные аминокислоты, сахара и минеральные соли. Поэтому полученный экстракт можно рассматривать как слабый физиологический раствор. В таком растворе есть не только водорастворимые белки (альбумины), возможно частично, также проходят белки (глобулины) в солевых растворах. Экстракт диализуют в дистиллированной воде для выделения альбуминов и глобулинов. Во время диализа мелкомолекулярные вещества, включая минеральные соли, попадают в воду изнутри целлофанового мешка. В мешочке остаются только белки. В конце диализа из-за отсутствия солей в целлофановом мешке белки, растворимые в солевых растворах, немедленно осаждаются, а альбумин остается в растворе. Чтобы отделить альбумины от белков, растворимых в физиологических растворах, раствор в целлофановом пакете и осадок переносят в центрифужные растворы. Пакет промывают 2-3 раза дистиллированной водой и также переливают в центрифужный пробирку. Затем его центрифугируют со скоростью 3-4 тысячи в минуту в течение 5-10 минут. Раствор переливают в мерную колбу на 250 мл. Осадок промывают 2-3 раза дистиллированной водой и центрифугируют. Все растворы переливают в мерную колбу и доливают до линии дистиллированной воды. Этот раствор, содержащий альбумин, хранится в холодильнике.

Оставшийся осадок в центрифужных пробирках растворяют в 10-15 мл 1М растворе хлорида калия и переливают в колбу на 250 мл. Пробирки 2-3 раза промывают раствором хлористого калия и также переливают в колбу. Жидкость в колбе заполняется

до линии раствором хлорида калия. Этот раствор, содержащий легко растворимые глобулины, хранится в холодильнике.

Экстракция солерастворимых белков. Растительную массу, оставленную 1М раствором хлорида калия, перемешивают в течение 1 часа с помощью шейкера. Затем центробежный раствор отделяют. Осадок 3-4 раза экстрагируют 1М раствором хлорида калия и центрифугируют. Все растворы добавляются к исходному раствору и заполняются раствором хлорида калия до линии измерительной шкалы. Этот раствор состоит из глобулинов.

После разделения глобулинов оставшийся осадок экстрагируют 80% -ным раствором спирта. При этом спирторастворимые белки отделяются (проламины), экстракцию длится 1 час, затем центрифугируют и белковые растворы переливают в мерную колбу.

Осадок снова 3-4 раза экстрагируют спиртовым раствором и все растворы сливают в колбу. Колба наполняется спиртовым раствором до линии. Спиртовые растворы в холодильнике не хранятся. Их можно хранить при комнатной температуре, и количество белка следует определять как можно скорее.

Экстракция щелочно-растворимых белков. Для этого остаток в центрифужной пробирке растворяют в 0,2%-ном растворе бисульфита натрия, приготовленной 0,2 М-ном боратном буфере (рН-10). Разделение некоторых белковых фракций во многом зависит от времени нахождения растительного материала в растворителе.

После разделения всех белковых фракций оставшийся растительный материал промывают водой и фильтруют, затем остаток нагревают до 50-60°C и сушат. Общий азот в нем определяется по методу Кельдаля.

Таким образом, 6 различных белковых фракций растительного материала представляют собой альбумины, легко растворимые глобулины и глобулины, которые разделяются с помощью хлорида калия; экстрагируются проламины, глютелины и нерастворимый азот. Для определения количества белка из каждой пробирки берут 20-50 мл раствора (исключая конечные фракции) и в пробирке Кельдаля определяют следующие белки.

Методы определения количества белка в биологических объектах и метаболизма белков

Методы определения количества белка основаны на исследовании азота в тканях. В тканях и органах животных содержится в среднем 16% общего азота белков, т.е. 100 г белка содержат 16 г азота. В то же время, когда содержание азота в белках и продуктах составляет 6,25 ($100:16 = 6,25$) при среднем содержании азота 16%, полученные и расщепленные белки становятся известными.

Определение содержания белка по азоту

Для определения азота в тканях, органах, биологических жидкостях и водных экстрактах используются три различных модификации метода Кельдаля: макрометод, полумакрометод и микрометод.

Принцип метода. Когда ткань или белок заливают концентрированной серной кислотой или щелочным катализатором (минерализация), амины, имины и другие типы азота превращаются в аммиак. В конце реакции образуется сульфат аммония и определяется его количество.

Необходимые инструменты: ножницы; скальпель; Пипетки 1 и 2 мл; Колба Кельдаля на 50 мл; Бюретка 20 мл.

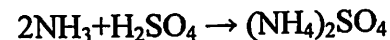
Реактивы: 1. Концентрированная серная кислота. 2. 0,1 Н раствор серной кислоты. 3. 0,1 Н раствор гидроксида натрия. 4. 33-40%-ный раствор гидроксида натрия. 5. Катализатор (пергидрол).

Ход работы: Определение общего азота в биологических объектах проводится в три этапа. Первый шаг - минерализовать белок. В колбу Кельдаля на 50 мл добавляют 0,2 мл сыворотки крови или 150-250 мг биологического объекта. Затем в пробирку добавляют 1-2 мл концентрированной серной кислоты и трубку нагревают на огне.

Исследуемый объект гидролизуются и разлагаются. Когда смесь станет коричневой, снимают колбу с огня, немного остужают и добавляют 2-4 капли пергидроля, встряхивают вещества в колбе

и снова ставят на огонь. Добавляют пергидроль еще 1-2 раза до образования бесцветной минерализации.

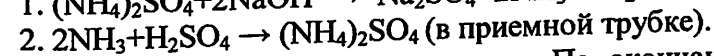
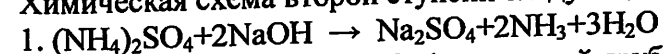
Химическая схема первого этапа следующая:



Второй шаг - прогнать аммиак. Вторая часть эксперимента проводится на специальном приборе. Масса отлитой ткани в колбе Кельдаля разбавляется водой и переливается в приводную колбу. Затем общий объем доводят до половины колбы водой. Добавляют в колбу 2-4 капли индикатора метилпрота и закрывают перфорированной пробкой. Затем он оснащается поддоном для сбора капель, который соединяется с воронкой и охладителем.

Заливная трубка №5 заполняется 20 мл раствора 0,1Н-ной серной кислотой и в нее добавляется 2-4 капли индикатора метилпрота, затем эта трубка соединяется с другим концом холодильника с помощью удлинителя. В приводную трубку через воронку добавляют раствор 33-40%-ного раствора гидроксида натрия до тех пор, пока жидкость не станет желтой (щелочная реакция). При подключении холодильника трубка нагревается и откачивается аммиак. Жидкость в приводной трубке кипятят до тех пор, пока аммиак не будет полностью удален, полнота аммиака определяется по изменению цвета лакмусовой бумаги.

Химическая схема второй ступени следующая:



Третий этап. Титрование и расчет. По окончании процесса прогона приводную трубку промывают 2-3 мл дистиллированной воды и добавляют в приемную трубку. Серная кислота, не связанная с аммиаком в приемной колбе, титруется 0,1Н-ным раствором гидроксида натрия. Азот рассчитывается по следующей формуле.

$$X = \frac{(a-b) \cdot 1,4 \cdot 100}{C}$$

Где: X-тест-объекте, количество азота в мг %; a- количество 0,1 л раствора серной кислоты в приемной колбе; b - 0,1Н раствор

гидроксида натрия, применяемый для нейтрализации связанной аммиаком серной кислоты; С - вес объекта испытаний, мг; 100 - обычный множитель для расчета азота в мг%.

Определение содержания остаточного азота в крови

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; Колба Кельдаля 25 мл; фотокалориметр или спектрофотометр; воронка с фильтровальной бумагой; Микропипетка 0,2 мл; Пипетки 1, 2, 5 мл; Колбы по 25, 50, 100 мл, ножницы.

Реактивы: 1. Кровь (смесь цитрата или оксалата в крови). 2. 86%-ный этиловый спирт. 3. 20%-ный раствор трихлоруксусной кислоты. 4. Концентрированная серная кислота. 5. Пергидрол. 6. Стандартный раствор сульфата аммония: 0,2357 г соли растворяют в 1 л воды, в 1 мл такого раствора содержится 0,05 мг азота. 7. Реактив Несслера: в первый стакан добавляют 15 г йодной соли ртути, выливают во второй стакан, перемешивают стеклянной палочкой до растворения йодной соли ртути.

Ход работы: В пробирку добавить 1,8 мл дистиллированной воды и 0,2 мл крови, затем влить 2 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты, хорошо перемешать стеклянной палочкой и дать постоять 5 минут. Жидкость становится коричневой. Жидкость в растворах фильтруют фильтровальной бумагой. Взять 2 мл фильтрата (т.е. 0,1 мл крови) в колбу Кельдаля и нагреть до тех пор, пока не добавятся 2 капли концентрированной серной кислоты, чтобы образовался белый дым. Затем прекратить нагревание колбы, охладить и добавить 2 капли пергидроля и нагреть, пока жидкость в колбе не станет равной. Затем жидкость в колбе охлаждают и разбавляют, добавляя 2-3 мл воды, измеряя ее объем и заполняя колбу (стенки колбы также промываются определенным объемом воды). Воду добавляют к 2/3 объема колбы на 25 мл, добавляют 3 мл реактива Несслера, а затем добавляют воду до метки на колбе.

В другую колбу добавляют 1 мл стандартного раствора сульфата аммония и 1 каплю концентрированной серной кислоты и доливают до 2/3 объема колбы. Затем добавляют 3 мл реактива Несслера и доливают воду до метки в колбе. Когда жидкость в

колбах встряхивается, она измеряется спектрофотометром и рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{0,05 \cdot h_1 \cdot 100}{h}$$

Где: X-азотный остаток, мг%; 0,05 - количество азота в стандартном растворе 1 мл сульфата аммония; h - экстинкция оптической плотности стандартной жидкости; h_1 - оптическая плотность экстинкции исследуемой жидкости; 100 - обычный множитель для расчета азота в мг%.

Определение азота, не входящего в состав белков тканей

После того, как кусочек печени или мышечной ткани раздавлен ножницами, его хорошо измельчают в ступке. Затем измеряют полученную массу 500 или 1000 мг и переносят в мерную колбу на 50 мл. Добавьте 20 мл разбавленной воды, перемешайте и оставьте на 26-30 минут.

Затем добавляют 5 мл 20%- раствора трихлоруксусной кислоты и оставляют на 5-10 минут, затем фильтруют. В следующем процессе берут 2 мл фильтрата и переливают в колбу Кельдаля, в которую добавляют 0,1 мл концентрированной серной кислоты и минерализуют на песчаной бане. Затем при образовании густого белого дыма снять колбу с огня и, немного остывнув, добавить 1-2 капли пергидроля. Колбу снова нагревают на песочной бане до образования бесцветной прозрачной жидкости. По окончании минерализации в колбу добавляют 2-3 мл воды, промывают 25 мл, несколько раз промывают водой и помещают в колбу, т. е. прибавляют 2/3 от общего объема. Затем добавляют 5 мл реактива Несслера и довести до отметки в колбе.

В тех же условиях контрольный образец минерализуется, т.е. в колбу добавляют 0,1 мл серной кислоты и 2 мл воды. После охлаждения добавляют 2 мл стандартного раствора сульфата аммония и 5 мл реактива Несслера и доводят объем водой до метки в колбе. Жидкости в обеих пробирках тщательно перемешивают и определяют их оптическую плотность на спектрофотометре, ФЭК.

Количество азота рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{0,10 \cdot h_1 \cdot 25 \cdot 100}{C \cdot h \cdot 2}$$

Где: X- количество азота, не входящего в состав белка мг%; 0,10-количество азота (мг) соответствует концентрации 2 мл стандартного раствора; h - погашение оптической плотности контрольного образца; h₂-экстинкция оптической плотности тестируемой жидкости; 25-общее количество тканевого экстракта; для расчета 100 мг%; C-масса ткани, полученной для экстракции, мг; 2- количество фильтрата, полученного за минерализацию.

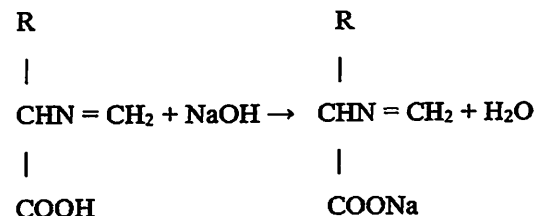
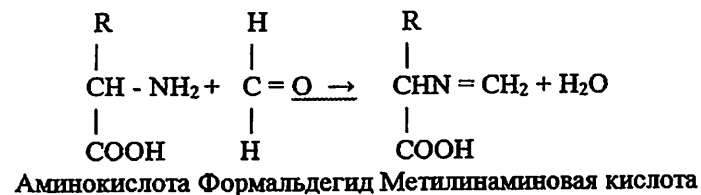
Зная количество общего азота и небелкового азота в ткани, определяется количество азота, содержащегося в белках.

Общий азот - азот, который не входит в состав белков.

Определение азота в аминокислотах с титрованием формальдегидом

Азот свободных аминокислот в полипептидах, белках и аминокислотах называется аминным азотом. При изучении структуры и состава белковых молекул, а также их продуктов, образующихся в результате гидролиза, большое значение имеет количество азота аминокислот. В зависимости от количества аминного азота можно изучать активность протеолитических ферментов (катепсинов) и скорость гидролиза белков. Определение аминокислот в биологических материалах дает дополнительные характеристики аминокислотного и белкового обмена в организме.

Когда белки расщепляются ферментами или кислотами, образуются аминокислоты, которые свободно содержат аминокислотные группы и карбоксильные группы в аминокислотном составе. Чтобы определить количество аминокислот, свободные аминокислоты в аминокислотах объединяют с формальдегидом с образованием производного метилена, после чего карбоксильные группы титруют щелочным раствором:



В зависимости от количества карбоксильных групп, нейтрализованных щелочами, рассчитывается количество свободных аминокислот в аминокислотах в растворе. Молекула большинства аминокислот сохраняет эквивалентное количество аминных и карбоксильных групп.

Необходимые инструменты: колбы 50 мл; пипетки 5, 10, 20 мл; бюретка 10 мл.

Реактивы: 1. 0,25%-ный раствор глицина. 2. 0,1%-ный раствор фенолфталеина. 3. 0,1 Н раствор гидроксида натрия. 4. Состав смеси готовится перед этим анализом реактивов, 1-2 капли фенолфталеина добавляют к 6 мл 20%-ного раствора формальдегида и добавляют по каплям через бюретку 0,1 Н раствор гидроксида натрия до тех пор, пока смесь не приобретет розовый цвет.

Ход работы: добавить в колбу 3 мл 25%-ного раствора глицина, добавить 1-2 капли фенолфталеина и титровать 0,1%-ным раствором гидроксида натрия через бюретку до образования розового цвета. Затем добавьте пипеткой 2 мл смеси рецептур к нейтрализованному раствору глицина (розовый цвет раствора исчезнет). Титруйте 0,1Н-ным раствором гидроксида натрия до образования розового цвета. Определяется количество растворения 0,1 Н-ного натриевой щелочи, которое используется для титрования.

Исчисление. Например, 0,88 мл 0,1 н щелочного раствора использовали для титрования 3 мл 0,25% -ного нейтрализованного раствора глицина.

зованного глицина, а на 1,4 мг азота соответствует 1 мл 0,1 N щелочной раствор. Поэтому умножить количество 0,1N щелочного раствора, используемого для титрования, на 1,4, чтобы найти количество аминного азота в 3 мл 0,25% раствора глицина.

$$0,88 \cdot 1,4 = 1,232 \text{ мг или } 0,001232 \text{ г.}$$

Это означает, что 3 мл 0,25% раствора глицина или 0,0075 г аминокислоты содержат такое же количество азота. Если 0,0075 г глицина содержит 0,001232 г, то в 100 г глицина содержится X г азота.

$$\text{Из этого } 0,0075 \text{ г} - 0,001232 \text{ г}$$

$$100 \text{ г} - X$$

$$X = \frac{100 \cdot 0,001232}{0,0075} = 16,4 \text{ г азот}$$

Это означает, что глицин содержит 16,4% аминного азота.

Подобные тесты можно проводить с гидролизованными белками. Для этого в колбу добавить 3 мл 0,25% -ного гидролизата и работать в варианте, описанном выше для глицина.

Определение количества белков биуретовым методом

Белки реагируют с атомами меди в щелочных условиях, образуя сине-пурпурный цвет. Интенсивность этого цвета варьируется в зависимости от количества белка в растворе. Биуретовый метод выполняется быстрее и проще, чем метод Кельдаля. Этот метод используется только при тестировании материалов с высоким содержанием белка.

Необходимые инструменты: Штатив; пробирки; Пипетки 1, 2, 5, 10 мл; Спектрофотометр.

Реактивы: 1. Стандартный раствор белка альбумина, этот раствор содержит 10 мг белка альбумина в 1 мл. 2. Биуретовый реагент берут из 0,15 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 0,6 г $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (натрий-тарtrat-калиевая или сегнетова соль) и растворяют в 50 мл воды. К этому раствору смешать, добавляя 30 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и добавляя к раствору 0,1 г соли кДж, доводя до 100 мл водой.

Ход работы: для построения откалиброванного графика используется стандартный раствор белка альбумина, в котором

хранится 10 мг белка альбумина в 1 мл раствора. Образцы готовят следующим образом.

№	Количество белка, мг	Объём белкового раствора, мл	H ₂ O, мл
1	2	0,2	1,8
2	4	0,4	1,6
3	6	0,6	1,4
4	8	0,8	1,2
5	10	1,0	1,0
6	12	1,2	0,8
7	16	1,6	0,4
8	20	2,0	-
9	0	-	2,0

Добавить во все пробирки 8 мл биурета и оставить при комнатной температуре. Измерение производится путем сравнения воды в девятом растворе, который сохраняет все компоненты, кроме белка. Через 30 минут его измерить на спектрофотометре при длине волны 540 нм. Полученные результаты использовать для построения калиброванного графика. Для построения графика величина оптической плотности откладывается по оси ординат, а количество белка, соответствующего оптической плотности, откладывается по оси абсцисс.

Для определения количества белка в исследуемом растворе работа проводится в вышеуказанных условиях. Для этого исследуемый белок разводится до 2 мл, затем добавляется 8 мл биурета.

В зависимости от оптической плотности тестируемого белка определяется количество белка на графике. Количество белков рассчитывается в мг%.

Определение количества белков методом микробиурета

Реактивы: 1. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -2,1%-ный раствор. 2. KOH -30% -ный раствор. 3. А раствор 4. Для приготовления этого раствора смешайте 1 часть 2,1% -ного раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ и 9 частей раствора KOH-30%-ного. Этот раствор готовят перед использованием.

Ход работы: Выполнить калибровку по стандартному раствору белка альбумина для определения количества белка в тестируемом объекте; график создан. Образцы, содержащие от 5 мкг до 120 мг белка, готовят для построения графика. К этим образцам добавляют 2,5 мл раствора А, измеренного при 310 нм на спектрофотометре через 30 минут.

Чтобы определить количество белка в исследуемом растворе, возьмите 0,5 мл этого раствора, добавьте 2,5 мл раствора и измерьте в условиях, описанных выше.

Определение содержания белка по методу Лоури

Этот метод широко используется при определении количества белка. Этот метод обладает высокой чувствительностью и может определять содержание белка в образцах от 10 до 100 мкг. Метод основан на цветах, образованных ароматическими аминокислотами в сочетании с реагентом Фолина за счет пептидных связей реакции биурета.

Построен откалиброванный график для определения количества белка. Для построения этого графика используются стандартные растворы альбумина.

Необходимые инструменты: штатив; пробирки; пипетки 0,1, 1,5 и 10 мл; спектрофотометр.

Реактивы: 1. 0,1 Н раствор гидроксида натрия. 2. Раствор А: раствор 2%-ного карбоната натрия в 0,1 Н гидроксиде натрия. 3. Раствор В: 0,5%-ный раствор сульфата меди в 1%-ном тартрате натрия. Для приготовления раствора 10 г тартрата натрия растворяют в 300 мл воды. Затем к раствору добавляют 5 г сульфата меди и объем увеличивают до 1 литра. 4. Раствор С: чтобы приготовить этот раствор, добавить 1 мл раствора В к 49 мл раствора А. Этот раствор готовится перед анализом. 5. Реагент Фолин или раствор Е. Для приготовления раствора взять 100 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г соли $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 2-литровую колбу и растворить в 700 мл воды. Затем к раствору добавить 50 мл 85% кислоты H_3PO_4 и 100 мл концентрированной кислоты HCl . Затем смесь добавить в обратную колбу и кипятить 10-12 часов. После закипания добавить 150 г сульфата лития, 50 мл воды, несколько капель бромированной воды. Прокипятить без охлаждения 15

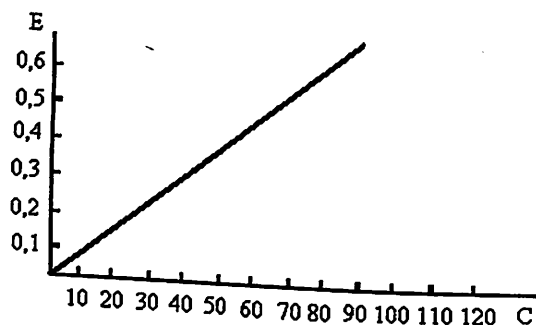
минут, чтобы удалить излишки брома. Смесь охлаждают до комнатной температуры, фильтруют и доводят до 1 литра. Кислотность фолинового реагента определяют титрованием 0,1 Н гидроксидом натрия в присутствии фенолфталеина. Реагент хранится в темной таре. Реагент фолин с кислотностью 1 Н используется для определения белка.

Ход работы: Для построения калиброванного графика готовят стандартный раствор альбумина. Для этого 4 мг альбумина растворяют в 10 мл воде, в 0,1 мл этого раствора задерживается 40 мкг белка. Добавить в пробирки 10-120 мкг раствора белка альбумина. Подготовка к этому показана в таблице ниже.

№	Количества белка, мкг	Раствор белка, мл	Дистиллирован- ная вода, мл
1	120	0,3	0,1
2	110	0,275	0,125
3	100	0,250	0,150
4	90	0,225	0,175
5	80	0,2	0,2
6	70	0,175	0,225
7	60	0,150	0,250
8	50	0,125	0,275
9	40	0,1	0,3
10	30	0,075	0,325
11	20	0,05	0,35
12	10	0,025	0,375
13	-	-	0,4

К каждому раствору добавить 2 мл раствора С, хорошо перемешать и оставить при комнатной температуре на 10 мин. Затем добавить 0,2 мл реагента Фолина, встряхнуть пробирки и оставить в комнате на 30 минут. Затем его измерить относительно безбелкового зонда на длине волны 750 нм на спектрофотометре. По полученным данным график называется солевым. Для этого величина оптической плотности по оси ординат, количество белка в мкг отложено по оси абсцисс.

Чтобы определить количество белка в биологическом объекте, добавьте к раствору 0,4 мл исследуемого белка (разведенного в 50 или 100 раз) в условиях, описанных выше. В зависимости от оптической плотности количество белка определяется по графику, затем количество белка в неразбавленном объекте рассчитывается в мг.



Калиброванный график. По оси абсцисс - количество белка в образцах, мкг (C); Оптическая плотность по оси ординат (E).

Гидролиз белков и определение их аминокислотного состава

Чтобы определить аминокислотный состав белков, их необходимо предварительно гидролизовать. Затем методом хроматографии определяется их аминокислотный состав.

Реактивы: образец чистого белка. 6 Н раствор соляной кислоты.

Ход работы: Сначала гидролизуются белки. Для этого экстрагируют 50-100 мг чистого белка и помещают в стеклянную ампулу, в которую добавляют 10 мл 6 Н соляной кислоты. Затем ампула заполняется азотом, а ее открытая сторона закрывается нулевым слоем плавления. Гидролиз в кипящей воде длится 24 часа. По окончании гидролиза ампулу охлаждают, и раствор переливают в фарфоровую чашку. Раствор в фарфоровой посуде упаривают на водяной бане. Добавить в сухую миску 3-4 капли дистиллированной воды и снова упаривать до полного высыхания. Этот процесс повторяется 3-4 раза, пока не исчезнут кислотные свойства чашки. Ампулу также можно хранить в

морозильной камере. При кислотном гидролизе аминокислота триптофан расщепляется.

Количество гидролизованного белка на хроматограмме зависит от количества аминокислот в белке. При высоком содержании белка в аминокислотах получается небольшое количество гидролизата, и наоборот, если количество аминокислот низкое, получается большое количество гидролизата. Обычно содержание белка в взятой пробе составляет от 0,6 до 2 мг. Нанесение гидролизата на хроматограмму и разделение аминокислот проводят по описанной выше методике.

Определение аминокислот методом тонкослойной хроматографии

В методе тонкослойной хроматографии все аминокислоты могут быть отделены от смеси гидролизатов белка или аминокислот. В качестве тонкого слоя часто используют силикагель, производные целлюлозы и другие вещества, готовые специальные пластинки (силуфол).

Этот метод основан на различных уровнях разделения аминокислот в двух несмешивающихся жидких фазах (неподвижная водная фаза и фаза движущегося органического растворителя). Когда аминокислоты хорошо растворимы в водной фазе, они медленно перемещаются впереди органических растворителей. Скорость вытеснения всех аминокислот различна. Коэффициент скорости сдвига рассчитывается следующим образом.

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

Здесь: *a* - расстояние от места падения аминокислоты до центра места образования этой аминокислоты, см; *b* - фронт раствора, см.

После разложения аминокислот пластину сушат и опрыскивают раствором нингидрина. Когда α-аминокислоты окисляются при взаимодействии с нингидрином, они распадаются на аммиак, альдегид и угольную кислоту, и нингидрин возвращается. Возвращенный нингидрин и другая молекула нингидрина

реагируют с аммиаком с образованием сложного мурексида, которое придает ему сине-фиолетовый цвет.

Необходимые инструменты: хроматографическая камера; термостат; 0,1 мл пипетки.

Реактивы: 1. 0,1 М цитратный буфер, pH-5,3 2. 0,1%-ный раствор нингидрина в ацетоне. Кадмий добавляют к реагенту нингидрина для стабилизации цвета хроматографических пластин. Этот раствор готовится в соотношении 5: 1.

1. 5 частей раствора 1% - ного нингидрина в ацетоне. 2. Смесь ацетата кадмия; Для приготовления этой смеси смешивают 50 мл уксусной кислоты и 100 мл воды и растворяют в этой смеси 1 г ацетата кадмия. 3. Гидролиз белков. 4. Пластина «Силуфоль УВ-254».

Ход работы: Отмерить 2–2,5 см от нижней части пластины УВ-254 и простым карандашом нарисовать слой. Гидролизаты тестируемого белка закапывают на расстоянии 1,5-2 см друг от друга. Затем по каплям берут 10-20 мл этого протеинового гидролизата и пятно сушат горячим воздухом - переливают вертикально в камеру хроматографии. Хроматографию проводят в специальных камерах с использованием 0,1 М цитратного буфера pH-5,3 в качестве растворителя. Растворитель заливается в камеру на толщину 1-1,5 см.

Когда уровень растворителя поднимается до 4/5 высоты пластины, пластину вынимают из камеры и сушат горячим воздухом. Затем пластину осторожно опрыскивают раствором 1% нингидрина в ацетоне. Нагреть пластину при 105 ° С в термостате в течение 10 минут. В результате аминокислоты появляются в виде сине-фиолетовых пятен. Затем рассчитывается коэффициент скорости сдвига (Rf) каждой аминокислоты по приведенной выше формуле.

Контрольные (стандартные) растворы хроматографируют вместе с гидролизатом тестируемого белка. Это позволяет быстро идентифицировать аминокислоты в тестируемом образце. Следует отметить, что в методе тонкослойной хроматографии аминокислоты оцениваются качественно и определить их количество не представляется возможным.

Определение белковых фракций электрофорезом в полиакриламидном геле

Электрофорез белков используется в аналитических целях. Метод дискового электрофореза - это разделение белков в концентрированном геле с известной концентрацией и определенными молекулами. Полиакриловый амидный гель используется в дисковом электрофорезе. Полиакриловый амидный гель состоит из трех разных частей:

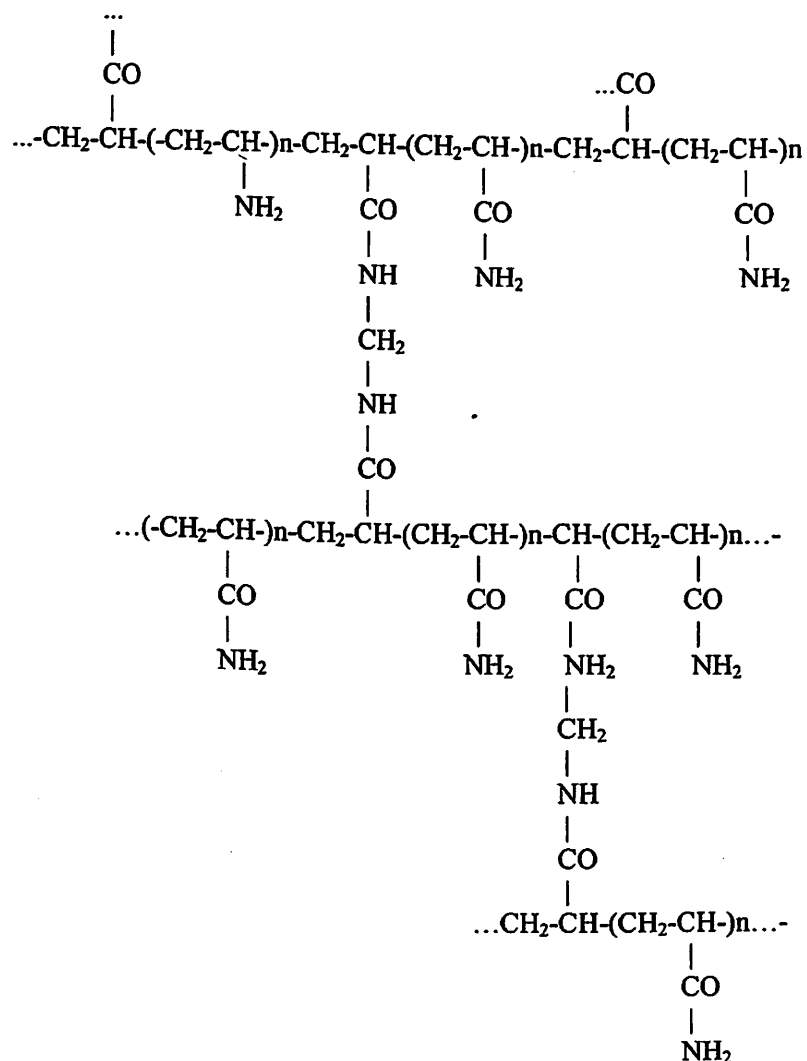
1) стартовая часть геля большого сита; 2) концентрирующий гель с большим ситом; 3) мелкое сито для разделения геля.

Полиакриламидный гель-акриламид является продуктом сополимеризации $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ и N_1N метилен-бисакриламида.

Вязкость, прочность и эластичность геля зависят от степени полимеризации и сшивания полиакриламида, а также от количества N , N_1 -метиленбисакриламида, участвующего в сшивании. Гель полимеризуется в стеклянных пробирках, закрепленных в виде колонки. Системы окисления-восстановления используются в качестве катализаторов реакций сополимеризации, которые являются источником свободных радикалов, например: персульфат аммония $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ и N , N , N , N_1 -тетраметилэтилендиамин (TEMED): $(\text{CH}_3)_2 = \text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N} = (\text{CH}_3)_2$.

Электродные растворы, то есть буферные растворы, действуют как проводники в скользящих частях гелей с электродом, и в этом случае pH и состав буферов будут изменяться. Метод электрофореза имеет очень высокую чувствительность. Этот метод позволяет обнаруживать более 30 фракций белков сыворотки.

Необходимые инструменты: Аппарат для электрофореза изготовлен из оргстекла и состоит из двух электродных резервуаров, верхнего и нижнего, емкостью 1,5 л каждый. Оба резервуара имеют угольные электроды, к которым подключен постоянный ток. Устройство УИП-1. используется как источник питания переменного тока.



Реактивы. 1. Раствор А: в колбу на 100 мл добавить 48 мл 1 Н НСl, 36,3 г триса и 0,46 мл TEMED, и после растворения добавить воду до метки на колбе. Раствор должен иметь рН 8,9. 2. В-раствор: добавить 30,0 г акрилового амида и 0,8 г метилбисакриламида в 100 мл колбу, растворить в 70-80 мл дистиллированной воде и профильтровать, затем довести объем раствора до 100 мл, добавив дистиллированную воду, затем

хорошо перемешать. 3. С-раствор: 0,14 г персульфата аммония растворяют в 100 мл дистиллированной воды, этот раствор готовят перед использованием. 4. Электродный буфер: 6,0 г триса и 28,8 г глицина растворяют в дистиллированной воде, и объем доводят до 100 мл путем добавления воды, рН 8,3. Перед применением развести в 10 раз. 5. Раствор красителя-индикатора: 0,001% раствор бромфенолового синего в дистиллированной воде. 6. Реагент Амидо-Шварца используется для окрашивания белковых фракций. 1%-ным раствором 10 В Амидо-Шварца готовится в 1 7%-ном растворе уксусной кислоты. 7. 7%-ный раствор уксусной кислоты. 8. Сыворотка крови.

Ход работы: Приготовление геля. Один конец чистой и сухой трубки заклеивают липкой лентой, надевают резиновые кольца и устанавливают на штатив.

В отдельной колбе или стакане смешать 1 часть раствора А, 2 части раствора В, 4 части раствора С и 1 часть дистиллированной воды. Пипеткой внести по 2,5 мл приготовленной смеси в каждую пробирку. 0,2-0,3 мл дистиллированной воды налить в смесь слоями с помощью капилляра, чтобы поверхность геля была равномерно ровной и препятствовала прохождению кислорода. Для полимеризации гели в пробирках хранить 30 минут при комнатной температуре или в термостате при 30°C в течение 15-20 минут. По окончании полимеризации слой воды с гелем удалить полосками, приготовленными из фильтровальной бумаги, и верхнюю часть геля промыть электродным буфером.

Белковый раствор, используемый для анализа, готовится из буферного раствора, используемого для приготовления геля. Концентрация белкового раствора должна составлять 1-5 мкг / мл. Например, для проверки сыворотки крови 3 мкл сыворотки крови (приблизительно 200 мкг белка) смешивают с 0,15 мл буферного раствора, используемого для приготовления геля, и добавляют сахарозу или глицерин для увеличения концентрации до 20-25%, по 10 на пробирку. 100 мкл приготовленного белкового раствора. Затем трубки до конца заполняются электродным буфером.

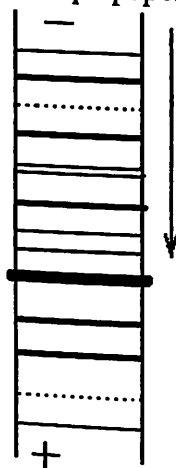
Электрофорез проводится в холодильнике. Температура электродных буферов перед использованием доводится до + 4° С. Аппарат для электрофореза также охлаждается. К 500 мл

буферного раствора добавляют 1 мл красителя-индикатора 0,001% раствора бромфенолового синего. При закрытии крышки устройства электрод подключается к источнику переменного тока, нижний электрод служит анодом (+), а верхний электрод служит катодом (-).

К каждой пробирке прикладывают ток 0,5–1,0 мА (20–30 минут), а затем увеличивают до 2–5 мА для каждой пробирки. Разделение оксидных фракций занимает 2–3 часа, т.е. источник тока отключается, когда краситель остается на расстоянии 3 мм от нижнего конца трубки. Электродные буферы переливают из контейнеров с инструментом в другие контейнеры, а трубки откручивают. Чтобы удалить гель из пробирок, в шприц набирают дистиллированную воду и направляют иглой между стенками пробирки и гелем, после чего гель медленно удаляется. Для окрашивания белковых зон в гелях в пробирки добавляют 10 В раствор амидо-Шварца и оставляют на 10–15 минут. Затем его переливают в другую емкость.

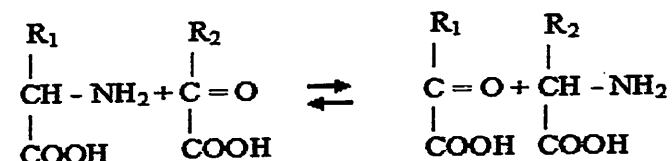
Гели промывают 7%-ным раствором уксусной кислоты. Чтобы обесцветить части геля, не содержащие белков, его следует несколько раз промыть этим раствором. Процесс отбеливания занимает 10–12 часов. Затем проводится электрофорез в зависимости от интенсивности окраски зон с белковыми фракциями и их расположения.

Внешний вид белкового электрофореграммы.

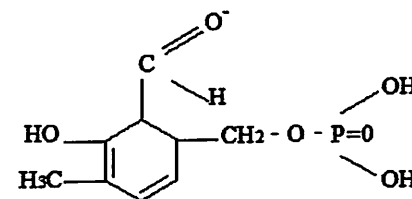


Реакция переаминирования

Перенос аминогруппы от аминокислоты к кетокислоте без разделения на свободный аммиак называется переаминированием или трансаминированием. В общем виде реакцию можно записать следующим образом.



Процесс переаминизации происходит в присутствии ферментов-аминотрансфераз, которые распространены во всех тканях. Аминотрансферазы представляют собой пиридоксаль-фосфатные белки, кофермент которых представляет собой промежуточный фосфопиридоксаль (витамин В₆).



Пиридоксальфосфат

Во время реакции переаминизации пиридоксальфосфат превращается в пиридоксальаминфосфат, затем превращается в кетокислоту с аминогруппой и снова в пиридоксальфосфат.

В тканях часто встречается реакция переаминизации. Все аминокислоты участвуют в реакции переаминирования. С глутаматом, аспарагином, аланином эта реакция проходит быстро. Глицин, лейцин-изолейцин, гистидин, триптофан, фенилаланин и тирозин труднее переаминировать.

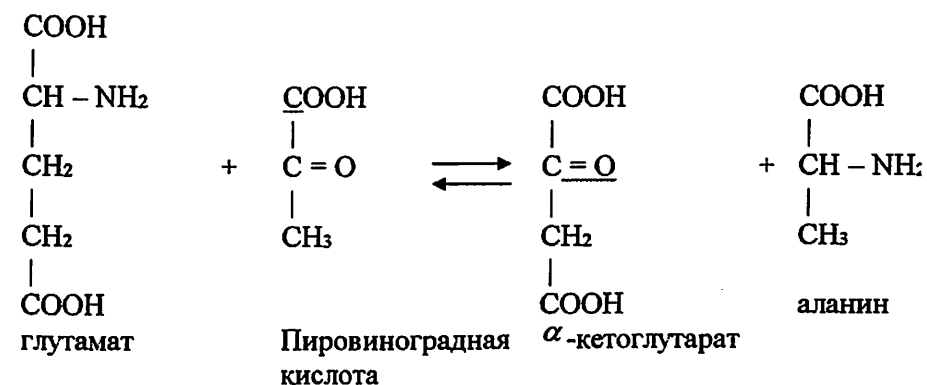


Реакция переаминирования имеет особое значение в метаболизме азота. Во-первых, в результате этой реакции из α -кетокислот синтезируются новые аминокислоты. Во-вторых, реакция перенапряжения - это один из методов деградации аминокислот.

Приготовление ферментного препарата проводят при $+4^\circ\text{C}$. Для получения ферментного препарата животное забивают, разрезают скелетную мышцу и измельчают ножницами. Полученную тканевую суспензию помещают в стакан гомогенизатора, добавляют 0,1% раствор KHSO_3 в соотношении 1: 5 и измельчить в гомогенизаторе в течение 2 минут. Гомогенат фильтруют через четыре слоя марли и используют в эксперименте. Для растворов для эксперимента готовят реакционные смеси по следующей схеме:

№	Раствор CH_2JCOOH в KHCO_3 , мл	Глютамин кислота, мл	Пировиноградная кислота, мл	H_2O , мл	Гомогенат, мл
1	0,5	0,5	0,5	-	1,5
2	0,5	0,5	0,5	-	1,5
3	0,5	-	0,5	0,5	1,5

Переаминирование, переводя аминокруппы всех аминокислот в кетоглутаратную кислоту, обеспечивает их дезаминирование. Образовавшаяся глутаминовая кислота теряет свою аминокруппу под действием глутаматдегидрогеназы, высвобождая NH_3 . Эта реакция обратная и превращается обратно в α -кетоглутаратную кислоту. Процесс переаминизации с участием мышечных ферментов, глутамата и пировиноградной кислоты.



Процесс переаминирование пировиноградной кислоты останавливают, чтобы посмотреть, как протекает реакция переаминизации. В результате оставшаяся пировиноградная кислота образует оранжевый цвет с салициловым альдегидом. Инкубируют в присутствии моноид уксусной кислоты, чтобы остановить реакцию переаминирования.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; водяная баня; ножницы; гомогенизатор; пипетки 1 и 2 мл.

Реактивы: 1. 0,1% и 2%-ные растворы гидрокарбоната калия (KHCO_3). 2. Раствор глутаминовой кислоты: 6 мг глутаминовой кислоты растворяют в 1 мл 2%-ном растворе KHCO_3 . 3. Раствор пировиноградной кислоты, 4,6 мг пировиноградной кислоты растворяют в 1 мл дистиллированной воде. 4. Готовят раствор монокислотной уксусной кислоты в бикарбонате калия, 0,002 М раствор CH_2JCOOH в 0,1%-ном растворе KHCO_3 . 5. Насыщенный раствор гидроксида калия. 6. 2% раствор салицилового альдегида в спирте. 7. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

Ход работы: В этом исследовании гомогенат мышечной ткани используется в качестве источника ферментов. Фильтрат гомогената готовят, как описано выше. В первый раствор заливают 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, затем добавляют к фильтрату тканевого гомогената. Под действием этой кислоты не происходит ферментативной реакции. Ко второму и третьему



Реакция переаминирования имеет особое значение в метаболизме азота. Во-первых, в результате этой реакции из α -кетокислот синтезируются новые аминокислоты. Во-вторых, реакция перенапряжения - это один из методов деградации аминокислот.

Приготовление ферментного препарата проводят при $+4^\circ\text{C}$. Для получения ферментного препарата животное забивают, разрезают скелетную мышцу и измельчают ножницами. Полученную тканевую суспензию поместить в стакан гомогенизатора, добавить 0,1% раствор KHSO_3 в соотношении 1: 5 и измельчить в гомогенизаторе в течение 2 минут. Гомогенат фильтруют через четыре слоя марли и используют в эксперименте. Для растворов для эксперимента готовят реакционные смеси по следующей схеме:

№	Раствор CH_2JCOOH в KHCO_3 , мл	Глютамин кислота, мл	Пировиноградная кислота, мл	H_2O , мл	Гомогенат, мл
1	0,5	0,5	0,5	-	1,5
2	0,5	0,5	0,5	-	1,5
3	0,5	-	0,5	0,5	1,5

Переаминирование, переводя аминокислоты в кетоглутаратную кислоту, обеспечивает их дезаминирование. Образовавшаяся глутаминовая кислота теряет свою аминогруппу под действием глутаматдегидрогеназы, высвобождая NH_3 . Эта реакция обратная и превращается обратно в α -кетоглутаратную кислоту. Процесс переаминизации с участием мышечных ферментов, глутамата и пировиноградной кислоты.



Процесс переаминирования пировиноградной кислоты останавливают, чтобы посмотреть, как протекает реакция переаминизации. В результате оставшаяся пировиноградная кислота образует оранжевый цвет с салициловым альдегидом. Инкубируют в присутствии моноиода уксусной кислоты, чтобы остановить реакцию переаминирования.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; водяная баня; ножницы; гомогенизатор; пипетки 1 и 2 мл.

Реактивы: 1. 0,1% и 2%-ные растворы гидрокарбоната калия (KHCO_3). 2. Раствор глутаминовой кислоты: 6 мг глутаминовой кислоты растворяют в 1 мл 2%-ном растворе KHCO_3 . 3. Раствор пировиноградной кислоты, 4,6 мг пировиноградной кислоты растворяют в 1 мл дистиллированной воде. 4. Готовят раствор мононенасыщенной уксусной кислоты в бикарбонате калия, 0,002 М раствор CH_2JCOOH в 0,1%-ном растворе KHCO_3 . 5. Насыщенный раствор гидроксида калия. 6. 2% раствор салицилового альдегида в спирте. 7. 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты.

Ход работы: В этом исследовании гомогенат мышечной ткани используется в качестве источника ферментов. Фильтрат гомогената готовят, как описано выше. В первый раствор заливают 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, затем добавляют к фильтрату тканевого гомогената. Под действием этой кислоты не происходит ферментативной реакции. Ко второму и третьему

раствору добавляют гомогенат ткани, перемешивают и инкубируют при 37–38 °С. Инкубация длится 90 минут, встряхивание каждые 5-10 минут.

После инкубации ферментативную реакцию останавливают, добавляя в пробирки 1 мл раствора трихлоруксусной кислоты, и через 10 минут смесь во всех пробирках фильтруют. Фильтрат используют для определения пировиноградной кислоты с салициловым альдегидом. Для этого берут три пробирки и добавляют 1 мл фильтрата из исходной первой пробирки в первую пробирку, фильтрат из второй пробирки во вторую пробирку и фильтр из третьей пробирки в пробирку под номером 3. Затем добавляют ко всем растворам 1 мл насыщенного КОН и 0,5 мл 2%-ного раствора салицилового альдегида. Жидкости в растворах встряхивают и перемешивают. Затем растворы инкубируют на водяной бане при 37-38 °С в течение 10 минут. Цвета, сформированные во всех решениях, сравниваются, и здесь можно увидеть, как прошел процесс перелива по цветам. Пишем результаты наших выводов.

Контрольные вопросы

1. Уровни структуры белков.
2. Денатурация белков и их биологическое значение.
3. Физико-химические свойства белков.
4. Классификация белков.
5. Уровни структуры белков.
6. Денатурация белков и их биологическое значение.
7. Расскажите о физико-химических свойствах белков.
8. Классификация белков.
9. Простые белки
10. Сложные белки.
11. Простые белки

ГЛАВА IV. ЛИПИДЫ

Ключевые слова: простые липиды, сложные липиды, триглицериды, воск, ненасыщенные жирные кислоты, насыщенные жирные кислоты, нейтральные жиры, йодное число, кислотное число, омыление

Липиды — большая группа веществ биологического происхождения, хорошо растворимых в органических растворителях, таких, как метанол, ацетон, хлороформ и бензол. В то же время эти вещества нерастворимы или мало растворимы в воде. Слабая растворимость связана с недостаточным содержанием в молекулах липидов атомов с поляризующейся электронной оболочкой, таких, как O, N, S или P

Липиды делятся на два основных класса: жиры (нейтральные жиры) и липиды (жирные вещества).

По химической природе липиды делятся на несколько групп:

I. Жирные кислоты.

II. Липиды глицерина:

а) нейтральные жиры; б) фосфорные глицериды.

III. Липиды, не содержащие глицерина:

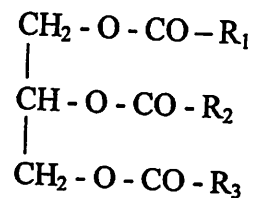
а) сфинголипиды; б) алифатические спирты и воски; в) стероиды.

IV. Липиды связаны с другими классами веществ:

а) липопротеинами; б) протеолипиды; в) фосфатидные пептиды; г) липополисахариды.

Липиды выполняют важные функции в тканях и клетках. Энергия высвобождается при окислении жиров в организме (9,3 ккал при окислении 1 г жира). Липиды - структурный элемент биологических мембран. В организме липиды образуют сложные соединения с белками - липопротеинами.

Стерины участвуют в образовании ряда биологически активных веществ - витаминов, гормонов, желчных кислот. Жиры представляют собой сложный эфир глицерина трехатомного спирта и жирных кислот. Жиры имеют следующую общую структуру:



Здесь: $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ - радикалы жирных кислот.

Натуральные масла содержат остатки насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (пальмитиновой, стериновой, олеиновой, линоленовой и др.). Ненасыщенные жирные кислоты, которые содержат более одной двойной связи, часто встречаются в растительных маслах, а также в небольших количествах в животных жирах. Ненасыщенные жирные кислоты в пище - линоленат, арахидонат - играют важную роль в окислительно-восстановительных процессах в клетке, а также в биосинтезе простагландинов.

Растворение и эмульгирование жиров

1) В 5 пробирок добавляют 10 капель растительного масла. В первую пробирку добавляют 2 мл бензола, во вторую пробирку - 2 мл ацетона, к третьей пробирке - 2 мл бензина, к четвертой пробирке - 2 мл этилового спирта и к пятой пробирке - 2 мл воды. Определена степень плавления масел в различных растворителях.

2) Возьмите 4 пробирки и добавьте 1 мл воды в первую пробирку, 1 мл 1%-ного раствора белка во вторую пробирку, 1 мл разбавленного мыла в третью пробирку и 1 мл 10% раствора карбоната натрия в четвертую пробирку. Добавьте в каждый раствор по 5 капель растительного масла и хорошо перемешайте. За исключением первой пробирки, во всех растворах образуется устойчивая эмульсия.

Реактивы: масло растительное очищенное, бензол, бензин, уксусная кислота, спирт этиловый, 1%-ный раствор протеина, мыло разбавленное, 10%-ный раствор карбоната натрия.

Качественные реакции, используемые при определении жиров

При качественном анализе масел используется ряд реакций. Примеры включают цветную реакцию с участием осмия, образование масляных пятен, реакцию омыления и галлоидную реакцию.

Цветная реакция. На стекло микроскопа капните 1 каплю масла, добавьте 1 каплю 1%-ного раствора осмиевой кислоты. Масло дает черный цвет.

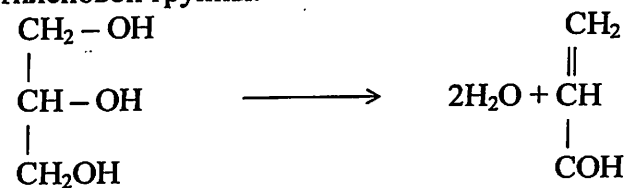
Масляное пятно. Если взять подсолнечные семена и прижать их к бумаге, образуется масляное пятно. Пятно не исчезает даже при нагревании бумаги. Это говорит о том, что масло действительно есть.

Галлоиды. Эта реакция особенно характерна для масел с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот. Добавьте в раствор 1-2 капли масла и 1-2 мл эфира. Добавьте 1-2 капли бромированной воды и хорошо перемешайте. Быстрая потеря желтого цвета бромированной воды указывает на присутствие ненасыщенных жирных кислот.

Реактивы: масло хлопковое очищенное, 1%-ный раствор осмиевой кислоты, эфир, вода бромированная.

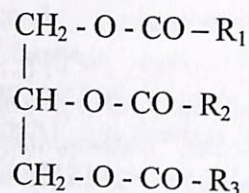
Определение глицерина в жире (акролеиновая реакция)

Акролеин образуется из глицерина в масле. Это делается с помощью обезвоживающих агентов (гидросульфит калия, борная кислота, сульфат магния). Акролеин - простейший альдегид из этиленовой группы.



Глицерин

Акролеин



Здесь: $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$ - радикалы жирных кислот.

Натуральные масла содержат остатки насыщенных и ненасыщенных жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линоленовой и др.). Ненасыщенные жирные кислоты, которые содержат более одной двойной связи, часто встречаются в растительных маслах, а также в небольших количествах в животных жирах. Ненасыщенные жирные кислоты в пище - линоленат, арахидонат - играют важную роль в окислительно-восстановительных процессах в клетке, а также в биосинтезе простагландинов.

Растворение и эмульгирование жиров

1) В 5 пробирок добавляют 10 капель растительного масла. В первую пробирку добавляют 2 мл бензола, во вторую пробирку - 2 мл ацетона, к третьей пробирке - 2 мл бензина, к четвертой пробирке - 2 мл этилового спирта и к пятой пробирке - 2 мл воды. Определена степень плавления масел в различных растворителях.

2) Возьмите 4 пробирки и добавьте 1 мл воды в первую пробирку, 1 мл 1%-ного раствора белка во вторую пробирку, 1 мл разбавленного мыла в третью пробирку и 1 мл 10% раствора карбоната натрия в четвертую пробирку. Добавьте в каждый раствор по 5 капель растительного масла и хорошо перемешайте. За исключением первой пробирке, во всех растворах образуется устойчивая эмульсия.

Реактивы: масло растительное очищенное, бензол, бензин, уксусная кислота, спирт этиловый, 1%-ный раствор протеина, мыло разбавленное, 10%-ный раствор карбоната натрия.

Качественные реакции, используемые при определении жиров

При качественном анализе масел используется ряд реакций. Примеры включают цветную реакцию с участием осмия, образование масляных пятен, реакцию омыления и галлоидную реакцию.

Цветная реакция. На стекло микроскопа капните 1 каплю масла, добавьте 1 каплю 1%-ного раствора осмиевой кислоты. Масло дает черный цвет.

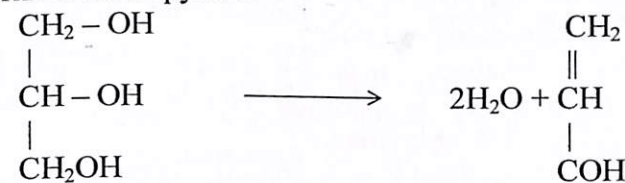
Масляное пятно. Если взять подсолнечные семена и прижать их к бумаге, образуется масляное пятно. Пятно не исчезает даже при нагревании бумаги. Это говорит о том, что масло действительно есть.

Галлоиды. Эта реакция особенно характерна для масел с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот. Добавьте в раствор 1-2 капли масла и 1-2 мл эфира. Добавьте 1-2 капли бромированной воды и хорошо перемешайте. Быстрая потеря желтого цвета бромированной воды указывает на присутствие ненасыщенных жирных кислот.

Реактивы: масло хлопковое очищенное, 1%-ный раствор осмиевой кислоты, эфир, вода бромированная.

Определение глицерина в жире (акролеиновая реакция)

Акролеин образуется из глицерина в масле. Это делается с помощью обезвоживающих агентов (гидросульфит калия, борная кислота, сульфат магния). Акролеин - простейший альдегид из этиленовой группы.



Глицерин

Акролеин

Акролеиновая реакция используется для разложения глицерина в масле.

Реактивы: Масло хлопковое, соль гидросульфат калия.

Ход работы: В раствор заливают 2-3 капли очищенного хлопкового масла, в которое добавляют 0,3-0,5 г гидросульфата калия или другого дегидратирующего агента, нагревают до образования темно-белого дыма. Образование запаха (осторожного запаха) при нанесении указывает на образование акролеина.

Определение химических показателей жиров

Качество масел и их источник определяют путем проверки их химических свойств. Качество растительных масел зависит от созревания семян и срока их хранения. Это, в свою очередь, приводит к изменению их физических и химических характеристик. Например, когда жир хранится в течение длительного времени, он распадается, что приводит к увеличению количества свободных жирных кислот. Увеличение кислотного числа, повышение качества масла свидетельствует о снижении качества масла. Качество жиров также ухудшается из-за того, что соединения ненасыщенных жирных кислот легко окисляются. В настоящее время разработан ряд методов определения качества масла, из которых важно определить кислотное, йодное число.

Кислотное число жиров

Количество миллиграммов гидроксида калия, используемого для нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г жира, называется кислотным числом масел. Это число - один из важных показателей, определяющих качество масел.

Реактивы: масло хлопковое рафинированное, 96%-ный раствор этилового спирта. 0,1 Н раствор гидроксида калия. Раствор фенолфталеина в 0,1%-ном спирте.

Ход работы: Взять 2 пробирки и заполнить первую 3-5 г хлопкового масла и 15-20 мл спиртово-эфирной смеси, а во вторую только 15-20 мл спиртово-эфирной смеси. Пробирки хорошо встряхнуть и добавить 2-3 капли фенолфталеина. Затем титровать спиртовым раствором гидроксида калия в течение 0,5-

1 мин до образования светло-розового цвета, который не меняется.

Кислотное число определяется по следующей формуле:

$$X = \frac{T(a-b)}{H}$$

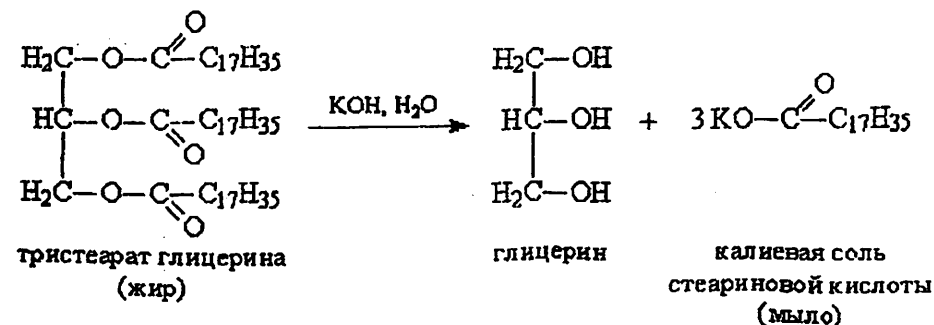
b-гипосульфит калия, используемый для контроля; Т - поправочный коэффициент к титру 0,1Н раствора КОН.

a- количество щелочи, израсходованное на титрование навески жира, мл.

Количество омыляемых жиров

Количество калиевой щелочи, используемой для нейтрализации свободных и связанных жирных кислот в одном грамме жира, называется числом омыления жиров.

Жиры являются химически стабильными соединениями, но при гидролизе под воздействием щелочи эфирные связи легко разрываются, что приводит к образованию жирных кислот и глицерина.



Количество омыления в жирах и маслах может быть следующим: жир говяжий-190-200, жир бараний-192-198, сало - 193-200, масло конопли -187-195.

Количество омыления растительных масел может варьироваться в зависимости от вида растения, внешних факторов. Например, количество омыленных кокосовых, пальмовых и других растительных масел из тропических растений намного выше.

Необходимые инструменты: колба 50 мл; пробка с воздушным охлаждением; бюретка; 2 пипетки по 1,5 мл; водяная баня.

Реактивы: 1. Растительное масло и животный жир. 2. Спиртовой раствор 0,5 Н гидроксида калия. 3. 0,5 Н раствор соляной кислоты. 4. Раствор фенолфталеина в 0,1 Н спирте.

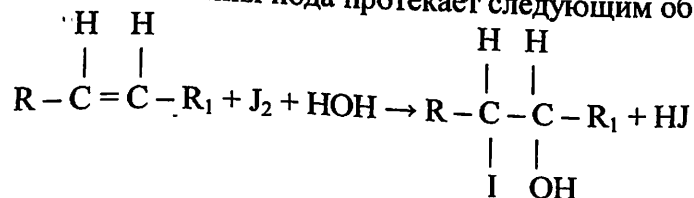
Ход работы: Наполнить первую колбу (опытный образец) 0,5 г растительного масла или животного жира, вторую колбу (контрольный образец) 0,5 мл дистиллированной воды и 15 мл 0,5 Н раствора гидроксида калия через бюретку в каждую колбу. Колбу закрывают пробкой с воздушным охлаждением и помещают на кипящую водяную баню на 30-40 минут. Затем в колбы добавляют 4 капли фенолфталеина и титруют раствором 0,5 Н соляной кислоты до исчезновения розовой окраски. Количество омыления рассчитывается по следующей формуле.

$$X = \frac{(b-a) \cdot K \cdot 28,05}{C}$$

Где X - число омыления; b - объем 0,5 раствора соляной кислоты, использованный для титрования контрольной пробы, мл; a - объем 0,5 Н раствора соляной кислоты, использованный для титрования исследуемой пробы, мл; 28,05 - количество гидроксида калия в мг, что соответствует 1 мл 0,5 Н раствора соляной кислоты; K - поправочный коэффициент титрования 0,5 Н раствора соляной кислоты; C - вес жира, г.

Определение йодного числа жиров

Число, выраженное в граммах йода на 100 г жира, называется йодным числом жиров. Это число представляет собой степень ненасыщенности жирных кислот, содержащихся в жирах. Реакция связывания йода протекает следующим образом:



Не вступающий в реакцию избыток йода титруют гипосульфитом натрия.

Чем больше йодное число, тем более жидким будет жир. Йодное число некоторых жиров и масел следующее: 38-46 у крупного рогатого скота, 31-46 у овец, 50-70 у свиней, 110 у хлопкового масла, 174 в льняном масле. Это число указывает на количество ненасыщенных жирных кислот в жирах, поскольку йод может связываться вместо двойной связи в молекуле.

Необходимые инструменты: колба 50 мл; бюретка, пипетки 0,2, 1,5-10 мл.

Реактивы. 1. Растительное масло. 2. 96%-ный спирт этиловый. 3. 0,1 Н раствор йода в спирте (приготовление: 12 691 г йода растворяют в 1 л 96%-ного этилового спирта). 4. 0,1 Н раствор гипосульфита натрия. 5. 1%-ный раствор крахмала.

Ход работы: В первую колбу (опытная проба) отвешивают 0,1-0,2 г растительного масла, во вторую колбу (контрольный образец) добавляют 0,1-0,2 мл воды и в обе колбы добавляют по 5 мл спирта. После растворения масла в колбы с помощью пипетки добавляют 10 мл 0,1 Н спиртового раствора йода, закрывают колбу пробкой, встряхивают и оставляют в темноте 15 мин. Затем титруют 0,1 Н раствором гипосульфита натрия до образования светло-желтого цвета, затем добавляют 1 мл 1%-ного раствора крахмала и титруют до исчезновения синего цвета.

Йодное число (x, г) определяется по следующей формуле.

$$X = \frac{(b-a) \cdot K \cdot 0,01269 \cdot 100}{C}$$

Здесь: b - объем 0,1 Н раствора гипосульфита натрия, использованный для титрования контрольной пробы, мл; a - объем раствора гипосульфита натрия, использованного для титрования экспериментальной пробы, мл; K - поправочный коэффициент титрования 0,1 Н раствора гипосульфита натрия; 0,01269 - количество йода в граммах составляет, что эквивалентно 1 мл 0,1 Н раствора гипосульфита натрия; 100 - расчетный коэффициент на 100 грамм жира; C - масса полученного масла, г.

Выделение и определение общих липидов от биологических объектов

Принцип метода. Суммарные липиды экстрагируются из тканей смесью хлорофилла и метанола, липид отмывается от других остатков водой или раствором слабых солей, сушится и осаждение липидов измеряется на аналитических весах. Определение общих липидов основан на методе М. Кейтса (1975).

Необходимые инструменты: гомогенизатор; центрифуга; цилиндр; ножницы; бюкс или стакан; Пипетки по 1, 2, 5 мл.

Реактивы. 1. Хлороформ. 2. Метанол. 3. Смесью №1, эта смесь состоит из хлороформа и метанола, смесь приготовлена в соотношении 1: 2 для экстракции липидов. 4. Смесью №2 хлороформ-метанол-вода, которую готовят в соотношении 1: 2: 0,8. 5. Плазма крови. 6. Растительный материал.

Ход работы. Чашки центрифуги заполняют 1 мл плазмы крови или 1 г растительного сырья и 3,75 мл 1-й смеси, встряхивают 30-60 минут. Затем его центрифугируют при скорости 3000 об / мин в течение 10 минут, и экстракт переносится на другую пробирку. Экстрагируют 4,75 мл смеси 2 до осадка и добавляют оба экстракта. К этому экстракту добавляют 2,5 мл хлороформа и 2,5 мл дистиллированной воды. Его центрифугируют при скорости 3000 об / мин в течение 10 минут. Слой хлороформа удаляется шприцем или пипеткой и помещается в другой контейнер, и после определения объема добавляется бензол в равном объеме. Раствор липидов хлороформа разливают в заранее взвешенные бюксы или химические стаканы и помещают в термостат при 60 °С. Сушку продолжают, пока она не приобретет постоянный вес.

Вес липидного осадка измеряют с помощью аналитических весов, а количество липидов в измеряемой ткани рассчитывают в процентах по формуле, приведенной ниже.

$$X = \frac{m \cdot 100}{P}$$

Здесь: m-масса выпавших липидов в осадок, г; P - масса ткани, полученной для анализа липидов, г.

Определение содержания масел по методу Сокслета

Этот метод широко используется для определения количества масла. Он основан на отделении масла от растительного сырья с помощью различных органических растворителей.

Ход работы. Семена растения очищают от кожуры, сердцевину сушат до однородной массы, измельчают в ступке и укладывают в бумажные пакеты по 5-10 г. Пакет должен легко помещаться в аппарат Сокслета. Затем пакет сушат при 90-100 °С в течение 2 часов, после охлаждения выливают в экстрактор. Аппарат Сокслета состоит из колбы и экстрактора, заполненного растворителем и водного охладителя.

2/3 - 3/4 части объема предварительно взвешенной колбы известной массы заливают эфиром и соединяют с экстрактором. После подключения холодильника включается водяная баня. Температура водяной бани должна быть такой, чтобы каждый час растительный материал 8-10 раз тщательно промывали эфиром. Обычно температура водяной бани составляет около 45-50°С. Полное отделение масла зависит от количества масла в материале и занимает 6-10 часов. После полного отделения масла колбу отделяют от аппарата, эфир перегоняют и колбу сушат в сушильном шкафу при 90-100°С. Затем колбу снова взвешивают и определяют количество масла.

$$X = \frac{(A - B) \cdot 100}{B}$$

X-количество сырого масла, в процентах, А-масса жировой трубки, г. В - масса сухой трубки, г. В-масса растительного материала, г.

Реактивы: эфир и растительное сырье.

Определение фракционного состава липидов в биологических объектах

В последнее время для определения фракционного состава липидов широко применяется метод тонкослойной хроматографии. Наилучшим носителем является силикагель, для проявления хроматограмм используют смеси жирорастворителей.

Ход работы. Взять силиконовые пластинки, разрезать ее ножницами шириной 4-5 см и провести карандашом стартовую линию, оставив 1,0-1,5 см. Сырое масло, добытое в предыдущем исследовании, используется для эксперимента. Концентрация липидов в эфирном экстракте увеличивается до 15-20%. Липидный раствор закапывают в начальную линию тонкослойной хроматограммы с помощью капилляра или микропипетки. Если концентрация липидов ниже, хроматограмму сушат на воздухе или сушат феном и повторно закапывают 2-3 раза. Пластику хроматограммы опускают в герметично закрытый химический стакан или камеру. На дно стакана налейте раствор толщиной 0,3-0,5 см. Внутренняя часть стакана должна быть выстлана фильтровальной бумагой, пропитанной парами раствора. Это позволяет раствору быстро подниматься по хроматограмме. Раствор состоит из смеси гексана, диэтилового эфира, уксусной кислоты в соотношении 73: 25: 2. Эксперимент прекращают, тогда когда раствор поднимается на высоту 15-18 см. Пластику вынимают из камеры и сушат в трубчатой печи или сушилке. Высушенную пластину опрыскивают 10% -ным раствором фосфомолибдата и сушат при 80-100 °С до образования синих пятен. Исходно различные липиды расположены следующим образом: 1-фосфолипиды, 2-необнаруживаемые липиды, 3-холестерин, 4-моноглицериды, 5-диглицериды, 6-свободные высокомолекулярные жирные кислоты, 7-триглицериды, 8-стероиды. Ближе к стартовой черте есть углеводы.

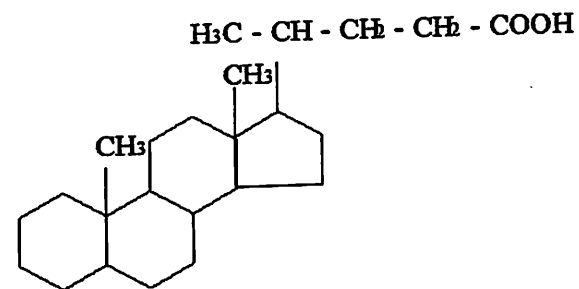
Реактивы: пластинки силикола, липиды в экстракте, гексан, диэтиловый эфир, уксусная кислота.

Качественная реакция желчных кислот

Желчные кислоты имеют стероидную структуру, состоящую из полностью насыщенного стерильного кольца и боковых ответвлений из пяти углеродов. По структуре желчные кислоты аналогичны холестерину и являются производными холановой кислоты.

В состав желчи входят, в основном, кислота, дезоксихолановая кислота, митохонановая кислота, хенодезоксихолановая кислота. Эти желчные кислоты не являются свободными, но соединяются

с глицином или таурином и попадают в желчь в форме этих кислот. Наиболее важными из них являются гликохолат, гликодезоксихолат, тауроксолат и тауродезоксихолат кислоты. Желчные кислоты, входящие в состав желчи, выполняют важные функции в переваривании жиров. Они являются эмульгаторами, активируют липазу и участвуют в абсорбции жирных кислот.



Холанатная кислота

Оксиметилфурфурол используется для открытия желчных кислот, которые образуют красный цвет с желчными кислотами. Оксиметилфурфурол образуется при воздействии на фруктозу концентрированной кислоты HCl или H₂SO₄.

Необходимые инструменты: пипетки по 1 и 2 мл, штатив с пробирками.

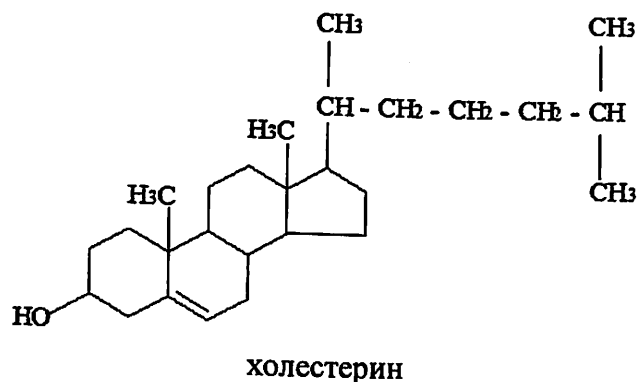
Реактивы. 1. Водный раствор огня (1:2). 2. 5%-ный раствор сахарозы или 3%-ный раствор фруктозы. 3. Концентрированная серная кислота.

Ход работы. К сухому раствору добавить 10 капель разбавленной желчи и взболтать с добавлением 1-2 капель раствора сахарозы или фруктозы. Аккуратно слить концентрированной серной кислоты со стенки пробирки. На границе жидкостей образуется пурпурное кольцо, которое затем приобретает красновато-пурпурный цвет.

Определение количества холестерина в органах и тканях

Холестерин представляет собой производное циклопентанопер гидрофенантрена, полициклического ненасыщенного спирта,

содержащего 27 атомов углерода. У 3-углеродного атома в структуре холестерина есть один гидроксил, одна двойная связь между 5 и 6 атомами углерода, группы CH_3 (метильная группа) в 10 и 13 атомах углерода и 8-углеродная цепь на 17 атоме углерода. Эмпирическая формула холестерина - $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$ (моль. Масса 386).



Сухой холестерин животного составляет 0,25-0,30% массы тела. Холестерин в небольших количествах присутствует в организме в нормальных условиях в виде свободных или сложных эфиров, а в патологических случаях количество холестерина увеличивается и приводит к гиперхолестеринемии.

Повышенный уровень холестерина наблюдается у пациентов с желтухой, циррозом печени, нефрозом и уреимией. Уровень холестерина также повышается при эндокринных заболеваниях, микседеме, кретинизме и диабете, а также при авитаминозе.

При болезни Базедова гипохолестеринемия наблюдается при анемии. Холестерин участвует в структуре клеточных мембран, что важно для регулирования метаболизма.

Принцип метода. Определение уровня холестерина основано на цветной реакции Либермана-Бунхарда. Хлороформный раствор холестерина образует зеленую окраску с уксусным ангидридом и концентрированной серной кислотой, интенсивность которой пропорциональна концентрации холестерина.

Необходимые инструменты: колба 25 мл; пипетки по 1, 2, 5 и 10 мл; цилиндр; водяная баня.

Реактивы. 1. Смесь этанола и этилового эфира в соотношении 3:1. 2. хлороформ. 3. уксусный ангидрид и концентрированная серная кислота. 4. стандартные растворы холестерина, в 1 мл этого раствора содержится 0,1 мг холестерина.

Ход работы. Отмерить 200-300 мг мелко нарезанной ткани печени или почек, переложить в колбу объемом 25 мл и добавить 15 мл спиртово-эфирную смесь. Как только жидкость в колбе перемешается, довести до кипения. Смесь оставить на водяной бане до кипения. После остывания смеси ее снова добавить в колбу из спиртово-эфирной смеси до метки колбы. Смесь в колбе встряхнуть, затем фильтровать через фильтровальную бумагу и выпаривать на кипящей водяной бане до высыхания.

После испарения остаток в колбе растворяют в 10 мл хлороформе. Для проверки цветовой реакции берут 5 мл раствора холестерина в хлороформе, добавляют 1 мл уксусного ангидрида и 4 капли H_2SO_4 . Хорошо перемешанную смесь оставляют в темном месте на 30 минут. Интенсивность получаемого цвета определяется величиной оптической плотности. Оптическая плотность измеряется на спектрофотометре при длине волны 656 нм. Количество холестерина определяется по откалиброванному графику, другая концентрация холестерина берется из стандартного раствора холестерина, чтобы сформировать откалиброванный график, проводится цветная реакция и измеряется оптическая плотность.

Количество холестерина в ткани (в мг%) рассчитывается по следующей формуле:

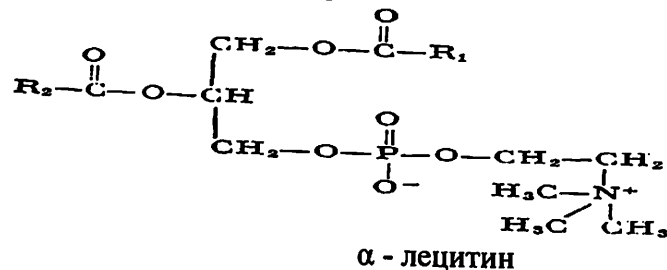
$$X = \frac{m V V_2 \cdot 100}{P V_1 V_3}$$

В этом случае: m - количество холестерина в пробе, мг; V - объем смеси спирт-эфир (25 мл), V_1 - объем спиртово-эфирного экстракта, полученного для определения (5 или 10 мл), V_2 - раствор холестерина в хлороформе (10 мл), V_3 - раствор холестерина в хлороформе, полученный для цветной реакции (5 мл), P - масса ткани, г.

С помощью этого метода количество холестерина в образцах может быть определено от 0,05 до 0,5 мг.

Выделение лецитина из желтка куриного яйца

Лецитин - это фосфоглицерид (фосфатидилхолин). Когда лецитин гидролизуется, молекула глицерина, две молекулы жирной кислоты, молекула фосфорной кислоты и азотистое основание расщепляются на холин. Холиновая фосфорная кислота подразделяется на α и лецитины в зависимости от состава остатка и кислот, которые он содержит.



Здесь: R_1, R_2 - остатки жирных кислот.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки; стакан 100 мл, стеклянная палочка.

Реактивы. 1. Желток куриного яйца. 2. Этиловый спирт. 3. Ацетон. 4. Насыщенный раствор хлорида кадмия (приготовленный на спирте).

Ход работы. Добавьте в стакан примерно 1/5 - 1/6 яичного желтка и добавьте 10 мл горячего спирта, перемешивая стеклянной палочкой. Жидкость в стакане фильтруется в сухой пробирке. Фильтрат должен быть прозрачным.

Осуществляется ряд реакций лецитина с этим спиртовым фильтратом.

1. Осаждение ацетоном. После добавления в сухой раствор 2-3 мл ацетона добавляют каплю спиртового раствора лецитина. В результате образуется осадок, поскольку лецитин не растворяется в ацетоне.

2. Эмульсионное образование лецитина. Для этого в раствор добавляют каплю дистиллированной воды с каплей лецитина в спирте. В результате получается стабильная эмульсия лецитина в воде.

3. Осаждение хлоридом кадмия. К раствору берут 1 мл спиртового раствора лецитина и по каплям добавляют раствор хлористого кадмия. Лецитин образует соединение с хлоридом кадмия и осаждается в белом состоянии.

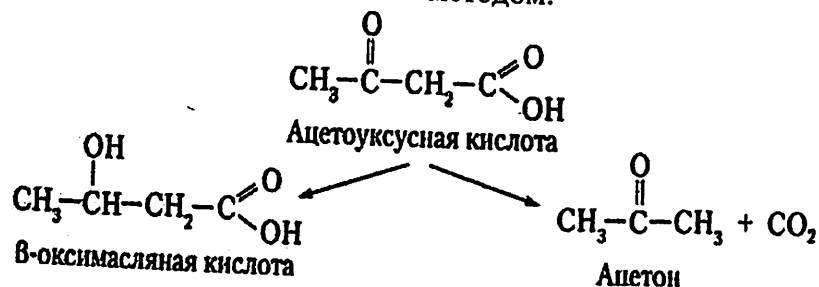
Обнаружение ацетоновых тел в моче

В высших жирных кислотах, которые входят в состав тканей человека и животных, есть четное количество атомов углерода. Когда жирные кислоты расщепляются в тканях, жирная кислота сначала расщепляется на капрон, жирную кислоту, которая, в свою очередь, распадается на две молекулы уксусной кислоты. Схематично эти реакции можно записать следующим образом.



Ацетоуксусная кислота является источником жирных кислот, которые состоят из оксимасляной кислоты и ацетона. Небольшое количество ацетоновых (кетонных) тел содержится в плазме крови нормального организма. При ряде заболеваний, таких как диабет, когда углеводные запасы организма сокращаются, окисление жиров ускоряется и увеличивается количество кетонных тел. В результате β -оксимасляная кислота и ацетат уксусной кислоты начинают накапливаться в тканях и крови, а уксусная кислота декарбоксилируется с образованием ацетона.

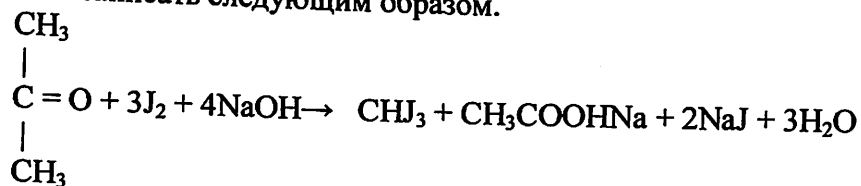
К кетоновым телам относятся ацетон, ацетоуксусная кислота и β -оксимасляная кислота. Повышение ацетоновых тел в крови и моче определяется биохимическим методом.



Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипеток.

Реактивы. 1. 10%-ный раствор гидроксида натрия. 2. Раствор йода в йодиде калия. 3. Моча, содержащая ацетон (на 0,5 л мочи добавляют 5 мл ацетона).

Ход работы. Ацетон взаимодействует с йодом в щелочных условиях с образованием йодоформа, о чем можно судить по образованию желтого осадка и его характерному запаху. Реакцию можно записать следующим образом.



В раствор заливают 1 мл исследуемой мочи и 1-2 капли раствора гидроксида натрия и 3-4 капли йода в растворе йода калия. В результате реакции образуется желтый осадок и характерный запах йодоформа.

Определение ацетоуксусной кислоты в моче

Енольная форма ацетоуксусной кислоты взаимодействует с хлоридом железа с образованием комплексного соединения, которое образует вишнево-красный цвет.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор хлорного железа. 2. В мочу добавляют 1 г салициловой кислоты, содержащей уксусную кислоту (0,5 л мочи).

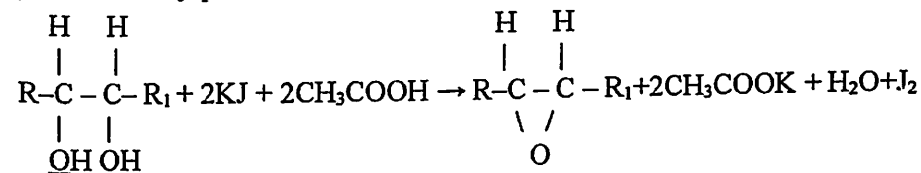
Ход работы. Добавить в пробирку 1 мл исследуемой мочи и добавить по каплям раствора хлорида железа. Результат - вишнево-красный цвет.

Определение перекисного числа жиров

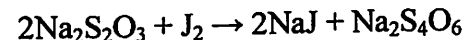
Кислоты в составе жиров частично окисляются под действием липооксидазы и кислорода, влаги, света в воздухе.

Пероксидное число указывает количество перекисей в 100 г жира, которое определяется количеством граммов йода.

Принцип метода. Определение пероксидного числа основано на том факте, что в кислых условиях пероксид жирной кислоты подвергается действию йода калия, и йод выделяется в результате реакции. Эту реакцию можно выразить следующим образом:



Выделившийся йод титруют гипосульфитом:



Необходимые инструменты: 150-200 мл колба; для бюреточного титрования; Пипетки 1 и 2 мл.

Реактивы. 1. Уксусная кислота. 2. Насыщенный раствор йода калия; 3. 1%-ный раствор крахмала. 4. 0,01 Н раствор гипосульфита.

Ход работы. Взвесить на аналитических весах 1 г масла и перелить в колбу на 150-200 мл. В другую колбу (контрольную) налить 2-3 мл воды. Добавить в обе колбы по 10 мл хлороформа и встряхнуть. Затем добавить в колбы 20 мл насыщенного раствора уксусной кислоты и 1 мл йода калия, хорошо перемешать и оставить на 3 минуты. Затем выделенный йод титровать 0,01 Н раствором гипосульфита до образования желтой окраски, затем в

колбы добавить 1 мл 1%-ного раствора крахмала и титровать до исчезновения синей окраски.

Количество пероксидов рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{(a-b) \cdot T \cdot 0,001269 \cdot 100}{H}$$

Здесь: X - пероксидное число; a - количество 0,01 Н раствора гипосульфита, использованного для титрования пробы теста, мл; b - количество гипосульфита, использованного для титрования контрольной пробы, мл; T - титр раствора гипосульфита; H - вес жира, г.

Контрольные вопросы

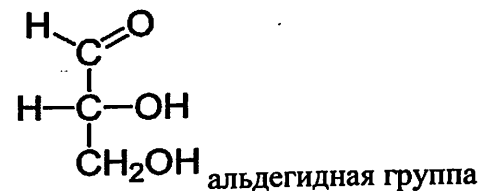
1. Какое биологическое значение имеют липиды?
2. Распространение липидов.
3. Химический состав липидов.
4. На какие классы делятся липиды?
5. Кислотное и йодное числа, число омыления.
6. Строение представителей фосфолипидов.
7. Строение и значение гликолипидов.
8. Строение и значение стероидов.
9. Строение и значение восков.
10. Химический состав и значение фосфатидов.

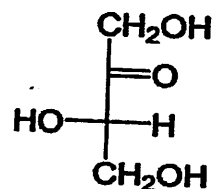
ГЛАВА V. УГЛЕВОДЫ

Ключевые слова: моносахариды, дисахариды, олигосахариды, полисахариды, мукополисахариды, гетерополисахариды, гемополисахариды, пектиновые вещества, гликозидная связь

Углеводы - один из важных компонентов организма растений и животных. Количество углеводов в организме человека и животных составляет 2%, и они выполняют множество функций: 1. Углеводы являются основной энергией для организма. При расщеплении 1 г углеводов выделяется 4,1 ккал энергии. 2. Углеводы выполняют пластическую функцию. Они включают клеточную мембрану, компоненты клеточной структуры и нуклеопротеины, гликопротеины, гликолипиды, ряд витаминов и коферментов. Углеводы играют ключевую роль в растениях. 3. Запасы углеводов имеют большое значение как питательные вещества. Растительный крахмал - это резервная форма углеводов гликогена у животных, которые потребляются при необходимости. Печень и мышцы - это в основном запасы гликогена. 4. Защитную функцию, эту функцию выполняют основные представители мукополисахаридов: гиалуроновая кислота, гепарин. Гиалуроновая кислота проникает в ткани и межклеточную соединительную ткань и связывает их вместе. Он предотвращает попадание в ткани различных повреждающих веществ. Гепарин - мощный ингибитор свертывания крови в тканях животных (печень, селезенка и т. д.).

Углеводы - это альдегиды или кетоны многоатомных спиртов в зависимости от их химической структуры.





кетонная группа

Углеводы делятся на две основные группы в зависимости от их структуры и свойств: простые углеводы - моносахариды и сложные углеводы - полисахариды. Полисахариды образуют две подгруппы. Это низкомолекулярные олигосахариды и истинные полисахариды.

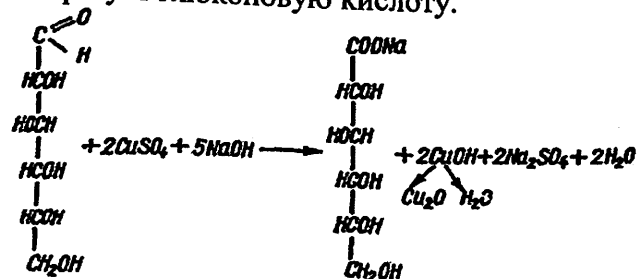
Моносахариды

В зависимости от количества атомов углерода моносахариды делятся на триозу, тетрозу, пентозу, гексозу, гептозу и другие. Общая формула для этого - $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$. Моносахариды проявляют обратимость, потому что они содержат карбонильную группу.

Восстановительные свойства моносахаридов

Все моносахариды проявляют ион-восстанавливающие свойства солей меди, серебра и других металлов в щелочных условиях. Эта реакция происходит из-за альдегидной группы в молекуле моносахарида, которая легко окисляется с образованием карбоксильной группы, и ионы металлов возвращаются.

1. Реакция Троммера. Глюкоза реагирует с солью сульфата меди в щелочных условиях с образованием оксида меди, который сам образует глюконовую кислоту.

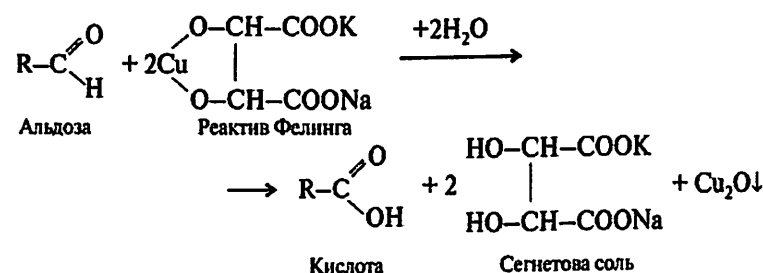


Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки 1 и 2 мл, спиртовая лампа.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор глюкозы. 2. 20%-ный раствор гидроксида натрия. 3. 5%-ный раствор медного купороса.

Ход работы. К раствору добавляют 3-4 мл раствора глюкозы и 1-2 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия и 2-3 капли 5%-ного раствора сульфата меди. Пробирку осторожно встряхивают. Вначале образуется осадок гидроксида меди CuOH_2 , затем красный осадок оксида Cu_2O .

2. Реакция с реактивом Фелинга. Когда моносахариды кипятят с реагентом Фелинга, этот реагент восстанавливается до оксида меди, а моносахариды окисляются до глюконовой кислоты.



Реактивы. 1. 1%-ный раствор глюкозы. 2. реагент Фелинга. Этот реагент готовят из двух растворов. 1-Растворите 34,64 г сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в колбе на 500 мл и долейте воды до метки. 2-в колбу емкостью 500 мл добавить 173 г соли сегнета, растворить в 200-250 мл воды и добавить 100 мл 50%-ного раствора гидроксида натрия, затем долить воду до метки на колбе. Реагент перед использованием смешивают в равных объемах.

Ход работы. В раствор заливают 3-4 мл 1%-ного раствора глюкозы и кипятят под навесом с добавлением реактива Фелинга, в результате чего образуется красный осадок оксида меди.

Цветные реакции, используемые при определении моносахаридов

Реакция Подобедова -Молиша.

Сахар реагирует с α -нафтолом и тимолом с образованием окрашенных соединений.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор глюкозы 2. 0,2%-ный раствор α -нафтола в спирте (0,5 г α -нафтола растворяют в 50 мл этилового спирта. Перед применением развести 5 раз). 3. 1%-ный спиртовой раствор тимола, 4. концентрированная серная кислота.

Ход работы. Взять 2 пробирки и добавить в каждую по 2 мл 1%-ного раствора глюкозы. К первой пробирке добавляют 5 капель 0,2%-ного раствора α -нафтола, ко второй пробирке добавляют 5 капель 1%-ного раствора тимола. В обе пробирки вдоль стенки пробирки осторожно добавить 2 мл концентрированной серной кислоты. Между серной кислотой и раствором сахара образуется пурпурный цвет в первом растворе и красный цвет во втором растворе.

Реакция Селеванова. Кетогексозы, включая фруктозу, дают темно-красный цвет при нагревании с соляной кислотой и резорцином. Этот цвет характерен для оксиметилфурфуrolа, который является продуктом реакции.

Реактивы. 1. Реактив Селеванова (0,05 г резорцина растворяют в 100 мл 20% -ной соляной кислоты) 2. 1%-ный раствор глюкозы 3. 1%-ный раствор фруктозы.

Ход работы. Взять 2 пробирки и добавить по 2 мл реактива Селеванова. К первому добавляют 2 капли раствора фруктозы, ко второму добавляют 2 капли раствора глюкозы. Обе пробирки оставляют на кипящей водяной бане на 1-2 минуты. Раствор, содержащий фруктозу, окрашивается в красный цвет, а раствор, содержащий глюкозу, не окрашивается.

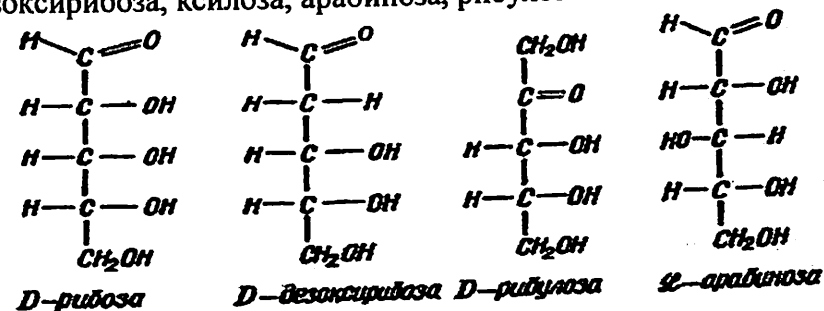
Реакция дифениламина. Кетозы, включая фруктозу, также дают синий цвет с дифениламином в кислой среде. Эта реакция также используется для количественного определения фруктозы (колориметрический метод).

Реактивы. 1. 20%-ный раствор дифениламина (приготовлен на 96%-ном спирте). 2. 20% раствор соляной кислоты. 3. 1%-ный раствор фруктозы.

Ход работы. Взять 1 мл 1%-ного раствора фруктозы, добавить 0,5 мл дифениламина и 1 мл соляной кислоты. Смесь выдерживают на кипящей водяной бане 5 минут. Реакция дает синий цвет.

Реакция на пентозы. Пентозы встречаются в тканях растений и животных. Они входят в состав ДНК и РНК, многих коферментов

(NAD, NADF, FAD). В эту группу углеводов входят рибоза и дезоксирибоза, ксилоза, арабиноза, рибулоза.



Характерной реакцией пентоз является то, что они теряют воду при нагревании с концентрированными кислотами и превращаются в фурфурол, который реагирует с орцином, давая зеленый цвет, реагирует с анилином, давая красный цвет.

Реакция пентоз с анилином. **Реактивы.** 1. Рибоза, 1-2%-ный раствор арабинозы. 2. Анилин ($C_6H_5NH_2$). 3. Уксусная кислота. 4. Концентрированная соляная кислота.

Ход работы. В пробирку залить 2 мл раствора пентозы и такое же количество концентрированной соляной кислоты, затем осторожно нагреть до кипения. После остывания добавить 1 мл анилина и 1 мл уксусной кислоты. Раствор становится красным.

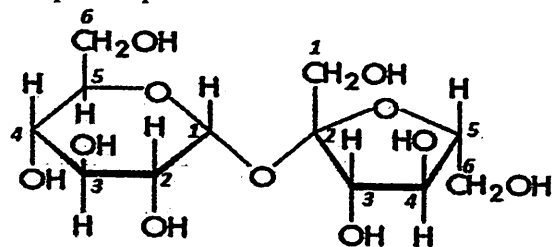
Реакция пентоз с орцином. **Реактивы.** 1. 1-2%-ный раствор пентоз. Реактив Орцина: 0,25 г орцина растворяют в 125 мл 30%-ной соляной кислоте и к этому раствору добавляют 1 мл 10%-ного раствора хлорида железа. Раствор хранят в посуде из темного стекла.

Ход работы. В раствор добавить 1-2 мл реактива орцина, нагреть до кипения и добавить 4-5 капель раствора пентозы, в результате чего получится синий цвет.

Дисахариды

Дисахариды образуются в результате отделения одной молекулы воды от двух молекул моносахаридов. Общая формула дисахаридов - $C_{12}H_{22}O_{11}$. Дисахариды включают: сахарозу, лактозу, мальтозу, целлобиозу.

Моносахариды, составляющие молекулу сахарозы, связаны между собой 1, 4 связями. Они не имеют свободной гидроксильной группы глюкозида. Следовательно, они не вызывают реакции Троммера.

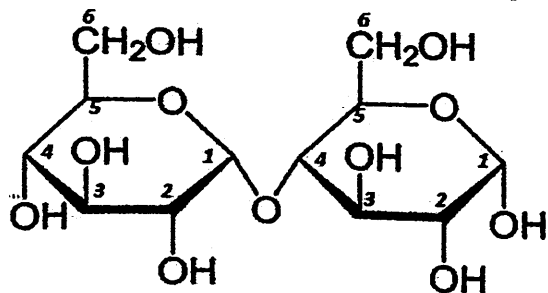


Сахароза

Сахароза не восстанавливает жидкость Фелинга. Когда сахароза нагревается с кислотой или под действием сахаразы распадается на глюкозу и фруктозу.

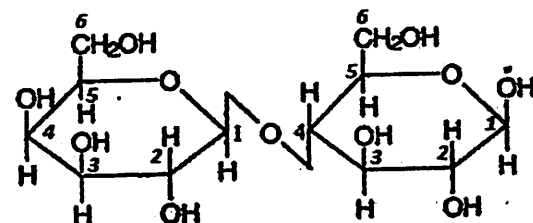
Мальтоза. При расщеплении образуются две молекулы α -D-глюкопиранозы. Поскольку они хранят глюкозид в виде одного остатка глюкозы, связанного связью 1:4, они обладают восстановительным свойством мальтозы. Мальтоза не встречается в природе в свободном виде, это ключевой элемент в структуре крахмала и гликогена, который образуется в желудочно-кишечном тракте в результате их гидролитического распада.

Мальтоза гидролизует в присутствии фермента с образованием двух молекул глюкозы. Поскольку гидроксильная группа глюкозы открыта, мальтоза обладает обратимым свойством.



Мальтоза

Лактоза, молочный сахар - дисахарид состоит из одной молекулы D-глюкозы и одной молекулы D-галактозы, к которой присоединен первый атом углерода галактозы через четвертый атом углерода глюкозы. Глюкоза, содержащая лактозу, обладает обратимым свойством из-за того, что свободный глюкозид является гидроксидом.



Лактоза

Определение восстановительных свойств дисахаридов

Реактивы. 1. 2%-ный раствор мальтозы. 2. 2%-ный раствор лактозы. 3. 2%-ный раствор сахарозы. 4. 30% -ный раствор гидроксида натрия. 5. 5%-ный раствор медного купороса.

Ход работы. Взять три пробирки, добавить по 3-4 мл раствора мальтозы, лактозы, сахарозы и провести реакцию Троммера. Мальтоза и лактоза проявляют восстановительные свойства, образуя красный осадок в пробирках. Сахароза, как упоминалось выше, не может проявлять это свойство и, следовательно, не образует реакцию Троммера.

В другой пробирке взять 1 мл 1%-ного раствора сахарозы и добавить 3-4 капли концентрированной серной кислоты. Пробирку погрузить в кипящую водяную баню на 10-15 минут, затем нагреть с 1 мл 30% раствора гидроксида натрия и 3-4 каплями 5% раствора сульфата меди. Пробирка дает желтый или красный цвет. Это связано с тем, что моносахариды, образующиеся в результате гидролиза, проявляют восстановительные свойства.

Полисахариды

Полисахариды - это высокомолекулярные соединения, которые при гидролизе кислотами или ферментами расщепляются на моносахариды, олигосахаридами. Каждый моносахарид связан с моносахаридом рядом друг с другом гликозидными связями. Именно поэтому их еще называют полигликозидами. Полисахариды из группы моносахаридов были названы гомополисахаридами. Содержание моносахаридов в гомополисахаридах варьируется в зависимости от их природы (крахмал, гликоген, целлюлоза). Если полисахариды содержат различные моносахариды, их называют гетерополисахаридами. Гетерополисахариды иногда содержат другие вещества (аминокислоты, жиры, белки и т. Д.). Гетерополисахариды включают мукополисахариды, гемицеллюлозы и другие.

Реакция крахмала с йодом

Характерная реакция для крахмала - образование синей окраски с раствором йода в йодиде калия. Йодная реакция крахмала - сложный процесс, цвет которого зависит от структуры крахмала. Крахмал представляет собой смесь двух полисахаридов - амилозы и амилопектина. Молекула амилозы состоит из 1000-6000 - D = остатков глюкозы, из которых 1,4 = молекула с глюкозидной связью имеет неразветвленной цепи. При полном гидролизе он распадается на молекулы D-глюкозы. Амилоза растворяется в воде и под действием йода дает темно-синий цвет. Амилопектин также принадлежит к группе очень больших остатков D-глюкозы, которые связаны 1,4-глюкозидными связями, как и амилоза. Однако цепь амилопектина сильно разветвлена, причем разветвленная часть связана с 1,6 глюкозидными связями. Амилопектин также распадается на молекулы D-глюкозы при полном гидролизе. Амилопектин не растворяется в воде, в воде набухает и образует пасту под действием йода образует пурпурный цвет.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки 1 и 2 мл.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор крахмала. 2. Раствор йода в калий йодиде: растворить 20 г калия йодида и 10 г йода в 500 мл воде. 3. 10%-ный раствор гидроксида натрия. 4. Этиловый спирт.

Ход работы. В пробирку заливают 2-3 мл раствора крахмала и 3-4 капли йодного раствора йода калия, в результате чего появляется синий цвет. Жидкость в этом растворе делится на три пробирки: в первый раствор добавляют 1-2 мл раствора гидроксида натрия, во второй раствор добавляют 2-3 мл этилового спирта, а третий раствор нагревают. Во всех случаях синий цвет исчезает. После того, как третья пробирка остынет, она снова станет синей. Образованный комплекс крахмала с йодом чувствителен к спирту, щелочам, высоким температурам и образует с йодом гипойодиты.

Определение восстановительных свойств крахмала

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки по 1,2 мл; водяная баня.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор крахмала. 2. Концентрированная серная кислота. 3. 20%-ный раствор гидроксида натрия. 4. 5%-ный раствор медного купороса.

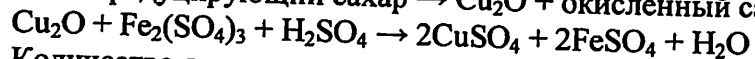
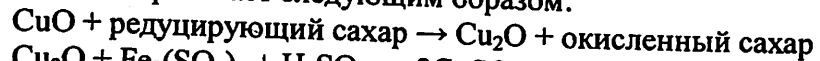
Ход работы: В две пробирки добавить по 4-5 мл раствора крахмала. В первую пробирку добавить 3-5 капель концентрированной серной кислоты, а во вторую пробирку - столько же воды. Оба раствора помещают в кипящую водяную баню на 10-15 минут. После охлаждения проводят реакцию Троммера. В первом растворе образуется красный осадок оксида меди, что указывает на гидролитическое разложение крахмала с образованием глюкозы, которая имеет обратимое свойство. Однако во втором растворе реакция Троммера не происходит, потому что крахмал не гидролизует, поэтому он не образует глюкозу, которая имеет свойство восстановления.

Определение сахаров с восстановительными свойствами по методу Бертрана

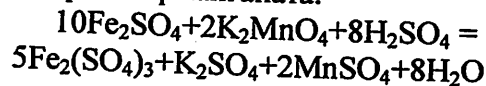
Восстановительные сахара реагируют с ионами меди в щелочных условиях с образованием оксида меди (I). Полученный

в результате оксид меди (I) подвергают действию раствора соли сульфида железа (III), который после промывания водой подкисляют серной кислотой соответственно. В этом случае оксид меди (I) превращается в оксид меди (II). Оксид железа (III) восстанавливается до оксида железа (II).

Реакция протекает следующим образом:



Количество восстановленного оксида железа (II) определяется титрованием раствором перманганата.



Из этого уравнения 1 мл раствора перманганата калия эквивалентен 10,05 мг меди.

Ход работы. 5-10 грамм (в зависимости от количества углеводов) экстрагируют из растительного материала и измельчают в фарфоровой ступке с использованием стеклянного порошка до образования однородной массы. Затем в 2-3 формы наливают 50 мл воды и переливают массу в колбу заданного размера до 100 мл. Раствор промывают последней порцией воды, и ее тоже переливают в колбу. Затем колбу выдерживают на водяной бане при температуре 70–80°C в течение 20–30 мин. После охлаждения пробирки белок и другие вещества, мешающие определению углеводов в смеси, осаждают путем добавления небольшого количества (0,5–1 мл) соли ацетата свинца до тех пор, пока смесь не станет прозрачной. Избыток свинца удаляют насыщенным сульфатом натрия. (Белый осадок добавляется до прекращения образования). Затем смесь фильтруют и 1-2 раза промывают теплой водой. Общий объем фильтрата доводят до 100 мл. Растворимые сахара в фильтрате определяют следующим образом. В колбу налить 5-20 мл фильтрата (в зависимости от количества углеводов в исследуемом растворе). Метод определения сахаров требует, чтобы получаемые растворы были определенного объема. Следовательно, если получено 5 или 10 мл фильтрата, общий объем следует увеличить до 20 мл, добавив соответственно 15 или 10 мл дистиллированной воды. Добавить к фильтрату 20 мл реагентов А и В. Смесь нагревают и варят ровно 3 минуты. В

результате осаждается красный оксид меди (I). Если он бесцветный, необходимо уменьшить количество исследуемого фильтрата. Как только раствор остынет, раствор медленно переливают в стеклянный фильтр. Затем осадок на стеклянном фильтре вместе с осадком в трубке растворяют, используя соль сульфата железа (II) в серной кислоте. После растворения осадка трубку и стеклянный фильтр промывают дистиллированной холодной водой до исчезновения кислой реакции. Затем жидкость в колбе титруют перманганатом калия до образования светлорозового цвета.

Объем 0,1 Н перманганата калия, использованного для титрования, умножается на титрование меди, и количество сахаров определяется по таблице. Процентное содержание сахаров определяется по следующей формуле.

$$x = \frac{a \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot H}$$

а-количество обнаруженного сахара (в полученном объеме) по таблице Бертрона; V - объем смеси, полученной из растительного материала; V₁ - объем раствора, полученного для определения сахара; H-растительный материал в граммах.

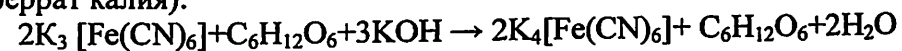
Реактивы: 1. Реактив А-раствор сульфат меди, 40 г сульфата (CuSO₄ · 5H₂O) растворяют в 1 л дистиллированной воды. 2. Реактив В - Щелочной раствор соли Сегнета. Растворите 200 г соли сегнета (C₄H₄O₆ KNa · 4H₂O) и 150 г NaOH в 1 литре дистиллированной воде. 3. Раствор перманганата. 5 г перманганата калия растворяют в 1 л дистиллированной воде. В этом случае 1 мл раствора соответствует количеству 10 мг меди. Если используется 0,1 Н. Раствор перманганата (3,16 г KMnO₄), 1 мл раствора соответствует 6,36 мг меди. Смешать 4,50 г Fe (SO₄)₃ и 200 г (108 мл) концентрированной серной кислоты и долить до 1 л дистиллированной воды.

Таблица
Количество растворимых сахаров в миллиграммах меди (по Бертрану)

Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь
10	20,4	37	72,0	64	119,6
11	22,4	38	73,8	65	121,3
12	24,3	39	75,7	66	123,0
13	26,3	40	77,5	67	124,7
14	28,3	41	79,3	68	126,4
15	30,2	42	81,1	69	128,1
16	32,2	43	82,9	70	129,8
17	34,2	44	84,7	71	131,4
18	36,2	45	86,4	72	133,1
19	38,1	46	88,2	73	134,7
20	40,1	47	90,0	74	136,3
21	42,0	48	91,8	75	137,9
22	43,9	49	93,6	76	139,6
23	45,8	50	95,4	77	141,2
24	47,7	51	97,1	78	142,8
25	49,5	52	98,9	79	144,5
26	51,5	53	100,6	80	146,1
27	53,4	54	102,3	81	147,7
28	55,3	55	104,1	82	149,3
29	57,2	56	105,8	83	150,9
30	59,1	57	107,6	84	152,5
31	60,9	58	109,3	85	154,0
32	62,8	59	111,1	86	155,6
33	64,6	60	112,8	87	157,2
34	66,5	61	114,5	88	158,8
35	68,3	62	116,2	89	160,4
36	70,1	63	117,9	90	162,0

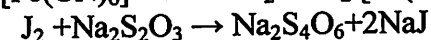
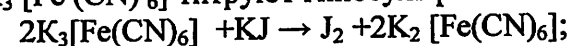
Определение глюкозы в биологических жидкостях методом Хагедорна-Иенсена

С помощью этого метода можно определять глюкозу и другие сахара с восстановительными свойствами в составе различных биологических объектов. В результате реакции сахара окисляются в щелочных условиях и возвращаются в красную соль крови (феррицианид калия) и желтую соль (гексациано- (II) - феррат калия).



Полученный $K_4[Fe(CN)_6]$ осаждают с использованием сульфата цинка.

Избыток $K_3[Fe(CN)_6]$ титруют гипосульфатом.



Глюкоза - постоянный компонент крови. Глюкоза попадает в кровоток через кишечник. В нормальной крови человека он составляет от 80 до 120 мг%. Количество глюкозы в крови различных сельскохозяйственных животных составляет, мг%:

В травах 90-100

У коров 60-80

У овец и коз 40-65

У кроликов 100-200

У птиц 130-260

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки по 0, 1, 2, 5, 10 мл; водяная баня; воронки диаметром 3-4 см; микробюретки 1-2 мл; фильтровальная бумага.

Реактивы. Для осаждения белков: 0,45%-ный раствор сульфата цинка; 0,1 Н раствор гидроксида натрия - это смесь двух реактивов, используемых для осаждения белков; 5%-ный раствор оксалата натрия (применяется для промывания микропипеток).

Для определения глюкозы. 1. Гексациан = раствор феррата (III). Для приготовления этого раствора растворите 1,65 г перекристаллизованного

$K_3[Fe(CN)_6]$ и 10,6 г безводного карбоната натрия в колбе объемом 1 л и долить воды до метки на колбе. Раствор хранят в прохладном месте в посуде из темного стекла. 2. Хлор = цинк = раствор йода: для приготовления этого раствора в колбе на 200

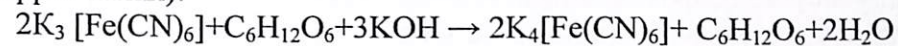
Таблица

Количество растворимых сахаров в миллиграммах меди (по Бертрану)

Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь
10	20,4	37	72,0	64	119,6
11	22,4	38	73,8	65	121,3
12	24,3	39	75,7	66	123,0
13	26,3	40	77,5	67	124,7
14	28,3	41	79,3	68	126,4
15	30,2	42	81,1	69	128,1
16	32,2	43	82,9	70	129,8
17	34,2	44	84,7	71	131,4
18	36,2	45	86,4	72	133,1
19	38,1	46	88,2	73	134,7
20	40,1	47	90,0	74	136,3
21	42,0	48	91,8	75	137,9
22	43,9	49	93,6	76	139,6
23	45,8	50	95,4	77	141,2
24	47,7	51	97,1	78	142,8
25	49,8	52	98,9	79	144,5
26	51,5	53	100,6	80	146,1
27	53,4	54	102,3	81	147,7
28	55,3	55	104,1	82	149,3
29	57,2	56	105,8	83	150,9
30	59,1	57	107,6	84	152,5
31	60,9	58	109,3	85	154,0
32	62,8	59	111,1	86	155,6
33	64,6	60	112,8	87	157,2
34	66,5	61	114,5	88	158,8
35	68,3	62	116,2	89	160,4
36	70,1	63	117,9	90	162,0

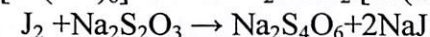
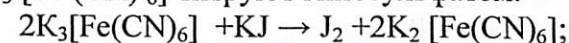
Определение глюкозы в биологических жидкостях методом Хагедорна-Иенсена

С помощью этого метода можно определять глюкозу и другие сахара с восстановительными свойствами в составе различных биологических объектов. В результате реакции сахара окисляются в щелочных условиях и возвращаются в красную соль крови (феррицианид калия) и желтую соль (гексациано- (II) - феррат калия).



Полученный $K_4[Fe(CN)_6]$ осаждают с использованием сульфата цинка.

Избыток $K_3[Fe(CN)_6]$ титруют гипосульфатом.



Глюкоза - постоянный компонент крови. Глюкоза попадает в кровоток через кишечник. В нормальной крови человека он составляет от 80 до 120 мг%. Количество глюкозы в крови различных сельскохозяйственных животных составляет, мг%:

В травах 90-100

У коров 60-80

У овец и коз 40-65

У кроликов 100-200

У птиц 130-260

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки по 0, 1, 2, 5, 10 мл; водяная баня; воронки диаметром 3-4 см; микробюретки 1-2 мл; фильтровальная бумага.

Реактивы. Для осаждения белков: 0,45%-ный раствор сульфата цинка; 0,1 Н раствор гидроксида натрия - это смесь двух реактивов, используемых для осаждения белков; 5%-ный раствор оксалата натрия (применяется для промывания микропипеток).

Для определения глюкозы. 1. Гексациан = раствор феррата (III). Для приготовления этого раствора растворите 1,65 г перекристаллизованного

$K_3[Fe(CN)_6]$ и 10,6 г безводного карбоната натрия в колбе объемом 1 л и долить воды до метки на колбе. Раствор хранят в прохладном месте в посуде из темного стекла. 2. Хлор = цинк = раствор йода: для приготовления этого раствора в колбе на 200

мл растворяют 10 г сульфата цинка, 50 г хлорида натрия и 5 г йодата калия. 3. 3%-ный раствор уксусной кислоты. 4. 0,005 Н раствор тиосульфата натрия. 5. Готовят 1%-ный крахмал в насыщенном растворе хлорида натрия. 6. Кровь кролика, 0,01 г соли оксалата натрия добавляют к 10 мл крови для предотвращения свертывания крови.

Ход работы. Седimentация и разделение белков. Белки крови кипятят и осаждают гидроксидом цинка. Для этого сначала готовят цинковую щелочь. Заполнить четыре помеченных раствора 5 мл раствора сульфата цинка и 1 мл раствора гидроксида натрия, чтобы образовался осадок гидроксида цинка. Затем с помощью микропипетки наполнить две пробирки 0,1 мл крови (микротрубки следует промыть раствором оксалата натрия). В оставшиеся два раствора залить 0,1 мл дистиллированной воды, которая является контрольной пробой. Все пробирки поместить в кипящую водяную баню на 3 минуты. В результате осаждаются белки крови. Жидкости в растворах фильтруют, осадок промывают 2 раза по 3 мл дистиллированной воды. Полученный фильтрат должен быть прозрачного цвета.

Определение глюкозы. К безбелковым фильтратам и контрольным образцам добавляют кровь из 2 мл содового раствора феррата гексациана (III) калия, затем нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 минут. После охлаждения добавить в каждый стакан по 3 мл раствора хлор-цинк-йод и по 2 мл раствора уксусной кислоты. Жидкость в растворе желтеет под действием выделяющегося йода. Добавить по 2 капли раствора крахмала во все пробирки и титровать раствором тиосульфата натрия до исчезновения синего цвета. Как только количество тиосульфата натрия, используемого для титрования, известно, количество глюкозы определяется с помощью таблицы.

Разница между числом, полученным экспериментально, и числом, нанесенным на контроль, дает количество углеводов, которые обладают обратимым свойством в исследуемом растворе. Подсчитывается количество углеводов в общем объеме раствора, полученного для тестирования. Процент углеводов определяется следующим образом.

$$x = \frac{a \cdot 100}{H}$$

В этом случае: а - количество углеводов в исследуемом материале; Н - количество полученного материала.

Определение восстановительных сахаров по методу Бьерра

Этот метод также позволяет обнаружить очень небольшое количество сахара (0,1-0,9 мг) в тестируемом растительном материале. В методе Берра также используются реактивы, используемые в методе Бертрана.

Ход работы. Взять 3 мл исследуемого раствора, вылить в центрифужный раствор, добавить свежеприготовленную жидкость Феленг. Раствор капают на кипящую водяную баню и кипятят 6 минут. По истечении времени пробирки быстро охлаждают до комнатной температуры с помощью холодной воды. В этом случае на дно пробирки выпадает красный осадок. Полученный осадок центрифугируют 2-3 минуты при 2000 об / мин, осадок отделяют. Осадок растворяют в 3-5 мл раствора сульфата железа (II). Затем растворяют в 0,01 Н растворе перманганата калия. Затем количество растворимых сахаров титруют 0,01 Н раствором перманганата калия в соответствии с таблицей. Израсходованный 1 мл раствора перманганата калия соответствует 1 мг меди. В зависимости от количества найденной меди, можно определить количество восстановительного сахара на основе таблицы.

Таблица

0,1 мл глюкозы крови, мг (по Хагедорну)

Гипосуль-фит, мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,009
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,342	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234

0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,043	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

Количество глюкозы, равное количеству меди (в мг) (по Бьерру)

Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь	Глюкоза	Медь
0,1	0,55	1,10	2,60	2,00	4,30	5,50	10,80
0,2	0,80	1,20	2,80	2,25	5,00	6,00	11,90
0,3	1,00	1,30	3,00	2,50	5,30	6,50	12,80
0,4	1,15	1,40	3,20	2,75	5,95	7,00	13,90
0,5	1,35	1,50	3,40	3,00	6,25	7,50	14,90
0,6	1,60	1,60	3,60	3,50	7,10	8,00	15,90
0,7	1,80	1,70	3,80	4,00	8,00	9,00	16,90
0,8	2,00	1,80	4,00	4,50	8,50	9,00	17,80
1,0	2,40	1,90	4,15	5,00	8,95		

Определение фруктозы

Фруктоза содержится в большинстве фруктов. Фруктоза реагирует с резорцином в кислых условиях с образованием окрашенного соединения.

Реактивы: Спиртовой раствор резорцина (1 г резорцина растворяют в 1 л 25%-ного этилового спирта). 30%-ный раствор соляной кислоты. Стандартный раствор фруктозы. 100 мг фруктозы растворяют в 100 мл насыщенного раствора бензойной кислоты и хранят в холодильнике. Возьмите 10 мл этого раствора и разведите в 100 мл воды.

Ход работы. Взять 5–20 г растительного материала и растереть в фарфоровой ступке с 10–20 мл воды, используя стеклянный

порошок, до образования однородной массы. Затем перелить в колбу на 200 мл. Колбу погрузить в водяную баню с температурой 80–90°C и экстрагировать 1 ч. Затем охладить колбу и добавить 5–6 мл 10%-ного раствора ацетата свинца. В этом случае осаждаются другие вещества, мешающие обнаружению фруктозы.

Жидкость в колбе тщательно перемешивают, доводят до линии водой и фильтруют.

Перенести 5 мл фильтрат в колбу на 50 мл, добавить 5 мл спиртового раствора резорцина и 15 мл 30%-ного раствора соляной кислоты. Хорошо перемешать жидкость в колбе и поместить на водяную баню при 80°C на 20 минут. Затем при охлаждении колбы наблюдать за интенсивностью окраски ФЭК. Используется светофильтр (540 нм). Для определения количества фруктозы калибровочная линия строится графически с использованием стандартных растворов. Влейте 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мл стандартного раствора в колбы (50 мл); 4,5 соответственно на них; 4,0; 3,0; 2,0; 1,0; Залить 0,1 мл дистиллированной воды. Затем во все колбы добавить 5 мл раствора резорцина и 15 мл 30% раствора соляной кислоты и поставить на водяную баню при 80–50°C на 20 мин. хранится во время. По истечении этого времени интенсивность цвета, образованного при охлаждении трубок, измеряется в ФЭК.

Определение содержания сахарозы

Сахароза - один из самых распространенных сахаров в растениях. Не имеет восстановительных свойств. Для химического определения сахарозы используются различные методы гидролиза. Сахароза обычно расщепляется на фруктозу и глюкозу путем ферментативного или кислотного гидролиза. Количество сахарозы определяется по восстанавливающим свойствам моносахаридов, которые являются продуктами гидролиза.

Сахарозу трудно обнаружить в водных экстрактах, поскольку такие экстракты содержат другие высокомолекулярные полисахариды, которые гидролизуются с образованием обратимых сахаров. Такие водные экстракты немного сложно фильтровать. Поэтому рекомендуется использовать спиртовые экстракты при

определении сахарозы.

Реактивы: все реактивы, используемые для определения сахаров по методу Бертрана. 4%-ный раствор гидроксида натрия, соляная кислота (плотность 1,19). Метиловый красный.

Ход работы. Взять 10–25 исследуемых растительных материалов и растолочь в фарфоровой ступке с использованием 5–10 мл 96%-ного этилового спирта до образования такой же массы, как и стеклянный порошок. Затем измельченную массу перелить в колбу на 200 мл. Фарфоровую ступку снова промыть 10–15 мл спирта и также перелить в колбу. Концентрация спирта, полученная для экстракции, не должна превышать 75–80%. Экстракт в колбе выдержать на водяной бане при 75–80°C в течение 30 минут. Затем его фильтровать в другую колбу. Оставшийся материал снова 1–2 раза экстрагировать спиртом и все экстракты объединить. Спирт в экстрактах перегоняется (под вакуумом) в специальном холодильнике и на водяной бане. Оставшийся спиртовой экстракт на дне пробирки доверху залит водой. Взять 25 мл приготовленного экстракта, перелить в мерную колбу на 50 мл и выдержать 10 минут на водяной бане при 67–70 °C. Затем в колбу добавить 1,5 мл соляной кислоты (плотность 1,19). В этом случае концентрация кислоты в пробирке составляет около 2%. Гидролиз длится 6–7 минут при температуре 67–70 °C. После завершения гидролиза трубку быстро охладить до комнатной температуры с помощью холодной воды и добавить 4–5 капель метилового красного. Затем жидкость в колбе нейтрализовать 4%-ным гидроксидом натрия до образования темного цвета. В этом случае следует добавлять по каплям щелочь. Нейтрализованный раствор залить водой до линии. Количество сахара определяется по методу Бертрана. Общее количество сахаров в экстракте (сахароза). Чтобы определить количество сахарозы, общий сахар вычитается из количества сахара, который имеет восстановительное свойство.

$$X = 2 (A - V) \cdot 0,95;$$

X - количество сахарозы, мг; A - общий сахар, мг; V - сахар с обратимыми свойствами, мг.

Определение крахмала

Крахмал - один из самых распространенных и важных полисахаридов в организме растений. Особенно много его в зернах растений. У многолетних трав он собирается в подземных органах.

У всех растений - от водорослей до высших растений - углеводы, образующиеся в хлоропластах во время фотосинтеза, непосредственно превращаются в крахмал. Крахмал состоит из двух разных соединений, а именно амилозы и амилопектина. Амилопектин становится пурпурным и красновато-пурпурным под действием йода.

Амилоза синее под действием йода. Методы определения крахмала основаны на определении интенсивности окраски, которую он образует с йодом, или количества глюкозы, образовавшейся в результате кислотного и ферментативного гидролиза. У каждого из выше перечисленных методов есть свои недостатки. Например, причина, по которой определение крахмала под действием йода не дает хороших результатов, заключается в том, что амилоза и амилопектин дают разные цвета под действием йода. Содержание в крахмале амилопектина и амилозы может варьироваться в зависимости от органов и сорта растений.

При определении крахмала кислотным гидролизом существует риск гидратации полисахаридов, отличных от растительного материала. Метод Починки дает хорошие результаты при определении количества крахмала.

Определение содержания крахмала методом Починки

Этот метод основан на образовании комплекса крахмала с йодом. Полученный комплекс окисляют до CO_2 и H_2O в кислых условиях с использованием дихромата калия. В результате реакции йод выделяется свободно. Этот йод титруют гипосульфитом, чтобы определить количество крахмала в зависимости от количества потребленного гипосульфита.

Реактивы: 1. 0,25 N раствор дихромата калия (12,3 г $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ растворяют в 250 мл воды в двухлитровой колбе и после охлаждения добавляют 800 мл концентрированной H_2SO_4).

Раствор выливают в цветной стакан). 2. 80%-ный раствор нитрата кальция растворяют в 200 граммах

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в 250 мл воде. Из этого раствора готовят 20% и 5%-ные растворы 3. 0,5%-ный раствор йода (10 г KI и 5 г I_2) сначала тщательно растирают в ступке, затем переливают в колбу объемом 1 л с 10 мл дистиллированной водой и заполняют до линии водой. 4. 0,1 Н раствор гипосульфита.

Ход работы. Исследуемый растительный материал (1 г картофеля, 3 г листьев) тщательно растирают в фарфоровой ступке с использованием 5 мл 80% -ного раствора нитрата кальция. Затем экстракт переливают в колбу на 200 мл. Раствор 2-3 раза промывают 80% -ным раствором нитрата кальция. Общий объем жидкости в колбе не должен превышать 30 мл. Накрывать пробирку воронкой и варить на электрической плите 3 минуты. В этом случае крахмал растворяется. Колбу охладить, воронку тщательно промыть и вылить раствор в мерную колбу на 100 мл. Затем его доводят до краев дистиллированной водой и фильтруют в химический стакан. Взять 5 мл этого фильтрата в центрифужном растворе. Добавить 2 мл раствора йода, хорошо перемешать и оставить на 30 минут.

В результате осаждается йодный комплекс крахмала. Количество йода в осадке около 15%. По окончании времени пробирку центрифугируют 5-10 минут со скоростью 4000-5000 в минуту. Осадок снова промывают 2-3 раза 5%-ным раствором нитрата кальция. Каждый раз при добавлении раствора осадок в колбе тщательно перемешивают. Затем осадок переносят в колбу на 200 мл с 0,2-0,3 мл воды. Раствор промывают 3-4 раза дистиллированной водой (общий объем воды не должен превышать 3 мл). В колбу добавляют 10 мл раствора 0,25 Н бихромата калия, приготовленного в 85% -ной серной кислоте, хорошо перемешивают и выливают на кипящую водяную баню на 15 минут. В этом случае крахмал разлагается до диоксида углерода и воды с помощью дихромата. Когда колба остынет, добавляют 5 мл 20%-ного раствора йодида калия и 120 мл воды. В этом случае бихромат калия выделяет йод. Отделенный йод титруют 0,1 Н раствором гипосульфита. Титрование продолжают до образования желтой окраски, затем колбу опорожняют 1 мл 0,5%-ном раствором крахмала и продолжают титрование до тех пор, пока

раствор не станет светло-воздушным. 1 мл 0,1 Н раствора гипосульфита соответствует 0,675 мл крахмала (йод, адсорбированный крахмалом с начала реакции, не влияет на результат реакции).

Также проводится отдельное контрольное титрование. Для этого в колбу на 20 мл наливают 10 мл 0,25 Н раствора дихромата калия, 120 мл воды, 5 мл 20%-ного раствора йодида калия и титруют 0,1 Н раствором гипосульфита. Количество крахмала определяется следующим образом.

$$X = \frac{0,675 \cdot b \cdot T \cdot (a - b_1)}{H}$$

X - содержание крахмала, %; b_1 - количество 0,1 Н раствора гипосульфита, использованного для контрольного титрования, мл; a - количество 0,1 Н раствора гипосульфита, использованного для титрования крахмала в эксперименте, в мл; b - объем, полученный для осаждения крахмала (5 мл); T - Поправка на титр раствора гипосульфита 0,1 Н; H - масса растительного материала, полученного для эксперимента, в граммах..

Определение содержания клетчатки

Этот метод, предложенный Куршером и Ганеком, основан на определении остаточной клетчатки путем отделения растворимых веществ из смеси уксусной и азотной кислот от растительного материала.

Реактивы: Растительный материал, смесь уксусной и азотной кислот, азотная кислота (плотность 1,4) и 80%-ный раствор уксусной кислоты смешанные в соотношении 1:10 (по объему) 0,2 М каустической соды, этиловый спирт.

Ход работы. Взять 1 г растительного материала и хорошо растереть в фарфоровой ступке до образования однородной массы. Перелить его в колбу на 100-200 мл и залить 40 мл смеси уксуса и азотной кислоты. Присоединить к колбе холодильник и вылить на песчаную баню на час. Затем его охлаждают и фильтруют или центрифугируют в специальном стеклянном фильтре. Потому что несколько раз кипячение промывают в спиртовом растворе 0,2 М едкого калия и в конце дистиллированной водой с

использованием 10 мл этилового спирта. Осадок осадка сушат в термостате при 105°C до такой же массы. Процент клетчатки определяется массой осадка.

$$X = \frac{a \cdot 100}{H}$$

X - Количество волокна %; a - это вес осадка, определенный в эксперименте, H-вес растительного материала, г.

Определение содержания гликогена

В печени различных млекопитающих содержится от 2 до 8% гликогена. Количество гликогена в печени зависит от состава пищи и количества перевариваемой пищи. Если в рационе животного мало углеводов, накапливается меньше гликогена, и наоборот, если в рационе больше углеводов, количество гликогена выше. Физическая нагрузка приводит к снижению гликогена в печени. Количество гликогена в печени контролируется эндокринной системой.

Необходимые инструменты: колбы 50, 200 мл; водяная баня; пипетки 1, 2, 5 мл.

Реактивы: 1. 2,5%-ная соляная кислота. 2. 10%-ный гидроксид натрия. 3. Печень кролика.

Ход работы. Отмерить 1 г печени кролика и растолочь в 10 мл воде. Полученную смесь перелить в колбу на 200 мл, налить дистиллированную воду до метки колбы, и перемешать, затем получают 5 мл жидкости и определяют сахара. Еще 1 г печени измельчают, добавляя 15 мл 2,5%-ной соляной кислоты. Смесь переливают в колбу на 50 мл и кипятят на кипящей водяной бане 1 час. После охлаждения жидкость переливают в колбу на 200 мл и смешивают с водой до метки. Затем берут 2 мл, нейтрализуют, добавляя 1-2 капли 10% гидроксида натрия, и определяют количество сахаров по методу Хагедорна-Иенсена.

Расчет содержания гликогена. Из количества мг глюкозы, обнаруженного в 1 г гидролизованной печени, вычитается количество глюкозы в миллиграммах в 1 г печени, обнаруженное до гидролиза. Полученное значение глюкозы в миллиграммах умножают на коэффициент 0,9, чтобы определить количество

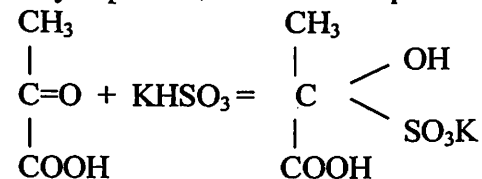
гликогена, то есть вес гликогена и глюкозы эквивалентен. В печени кролика гликоген составляет около 5-6%.

Определение содержания пировиноградной кислоты

Пировиноградная кислота играет очень важную роль в метаболических реакциях. Пировиноградная кислота играет важную роль в метаболизме белков, липидов и углеводов. Пировиноградная кислота составляет 0,8-1,5 мг% в плазме крови и печени и 3,0-3,5% в мышечной ткани. При отсутствии витамина B₁ процессы окисления пировиноградной кислоты и поглощения кислорода в организме снижаются. В результате пировиноградная кислота накапливается в головном мозге и других тканях. Пировиноградная кислота выводится с мочой (200 мг в сутки у здорового человека). Определив количество пировиноградной кислоты в моче в течение дня, можно узнать процесс углеводного обмена.



Пировиноградная кислота образует бисульфитные соединения с бисульфитом калия или натрия в кислой среде:



Избыток бисульфита калия связывается с йодом.



Когда бисульфитное соединение пировиноградной кислоты подвергается воздействию щелочи, высвобождается бисульфит в количестве, эквивалентном пировиноградной кислоте. Количество выделяемого бисульфата определяется титрованием йодом.

Необходимые инструменты: колба 25 мл; пипетки 1, 2, 10 мл; микробюретка.

Реактивы. 1. 0,1 и 0,01 Н раствор йода. 2. 1% -ный раствор бисульфата калия или натрия. 3. Насыщенный раствор бикарбоната или бикарбоната натрия. 4. 0,1 Н раствор гипосульфита натрия. 5. 1%-ный раствор крахмала, приготовленный в насыщенном растворе хлорида натрия. 6. 0,1 Н раствор оксалоацетатной кислоты. 7. Моча.

Ход работы. Перенести пипеткой 1 мл мочи в колбу на 25 мл, затем добавить в 9 мл воды и 1 мл 0,1 Н раствора оксалоацетата и хорошо перемешать, чтобы соли кальция выпали в осадок. Добавить 10 капель раствора бисульфата калия или натрия, встряхнуть смесь и перелить в пробирку, затем оставить в темное место на 15 минут. Затем добавить 10 капель раствора крахмала и по каплям добавить избыток бисульфата из 0,1 Н раствора йода до образования синего цвета. Чтобы удалить избыток йода, добавить по каплям 0,1 Н раствор гипосульфита натрия до исчезновения синего цвета, затем добавить 0,01 Н раствор йода (для связывания избытка гипосульфита) до тех пор, пока снова не сформируется синий цвет. Затем добавить 10 капель насыщенного раствора гидрокарбоната натрия (синий цвет исчезает) и жидкость в колбе титровать 0,01 Н раствором йода через микробюретку до тех пор, пока снова не появится синяя окраска.

Количество пировиноградной кислоты в моче в течение дня рассчитывается по следующей формуле.

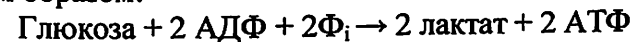
$$X = \frac{Э \cdot A \cdot 0,01 \cdot B}{I}$$

Здесь: Э - грамм эквивалент пировиноградной кислоты; А - количество 0,01 Н раствора йода, использованного для титрования, мл; 0,01 - нормальность раствора йода; В - суточное количество мочи, мл; I - количество взятой на анализ мочи, мл.

Определение процесса гликолиза

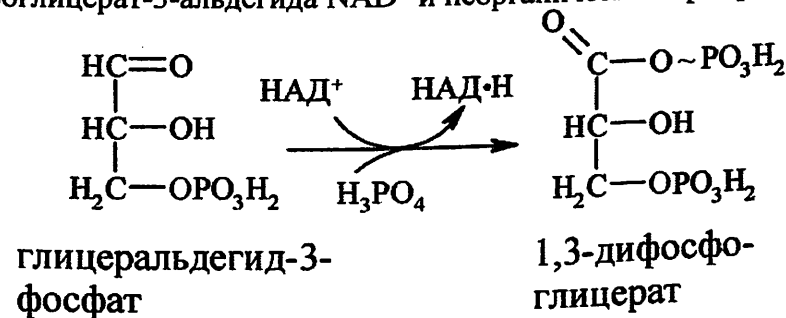
Процесс образования молочной кислоты в результате анаэробного расщепления углеводов, начиная с гликогена или глюкозы, называется гликогенолизом или гликолизом. Этот процесс сложен и включает в себя множество ферментативных реакций.

Суть анаэробного расщепления глюкозы заключается в расщеплении глюкозы на 2 молекулы молочной кислоты и выделении энергии, общий результат которого можно записать следующим образом:



Если этот процесс начинается с глюкозы, на первом этапе глюкоза взаимодействует с ферментом АТФ гексокиназой с образованием глюкозо-6-фосфата. Распад гликогена начинается с фосфорилирования - реакции, которая происходит в присутствии неорганического фосфора и фермента фосфорилазы. В результате реакции образуется глюкозо-6-фосфат, на который влияет фермент фосфоглюкомутаза с образованием глюкозо-6-фосфата. Стадии разложения после образования глюкозы и глюкозо-6-фосфата из гликогена одинаковы.

Одной из основных реакций гликолиза является реакция окисления фосфоглицеральдегида, реакция протекает в присутствии фермента глицеральдегид - 3 - фосфатдегидрогеназы. Этот фермент представляет собой сложный белок, коферментная часть которого состоит из никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺). В этом случае 1,3-дифосфоглицерат образуется в результате специфической реакции окисления в присутствии фосфоглицерат-3-альдегида НАД⁺ и неорганического фосфора.



1,3-дифосфоглицератная кислота подвергается реакции перефосфорилирования с АДФ в присутствии фермента фосфоглицераткиназы, что приводит к образованию 3-фосфоглицератной кислоты и АДФ.

Таким образом, в результате этих реакций энергия окисления фосфоглицератальдегида накапливается в виде макроэргической фосфатной связи одной молекулы АТФ.

Когда фермент глицератальдегид-3-фосфатдегидрокиназа подвергается действию моноиодацетата или монобромацетата, фермент теряет свою активность. При добавлении моноиодацетата в инкубационную смесь реакция разложения углеводов останавливается на стадии альдолазы, поскольку накопленная реакция 3-фосфоглицератальдегида приводит к образованию 1,6-дифосфата фруктозы.

В предыдущей реакции, то есть под действием фосфофруктокиназы, реакция фруктозо-6-фосфата на фруктозо-1,6-дифосфат необратима, поэтому фруктозо-1,6-дифосфат накапливается, когда гликолитическая реакция оксидоредуктаз блокируется.

Образцы сравнивают с процессом гликолиза, интенсивностью окраски, образованной присутствием моноиодацетата в инкубационной смеси и без добавления фруктозо-1,6-дифосфат-резорцина.

Реактивы. 1. фосфатный буфер, 0,1 М, pH-7,6. 2. Готовят 0,5%-ный раствор гликогена в фосфатном буфере. 3. 0,5 М раствор CH_3JCOOH нейтрализуют до pH 7,6. 4. 6%-ный раствор CCl_3COOH .

Ход работы. Гомогенат мышц используется в качестве источника фермента, участвующего в процессе гликолиза.

Крысу забить для приготовления гомогената мышц. Связывающий мышцы жир отделить от ткани, поместить в фарфоровую посуду и в ледяную баню. Затем растереть ножницами и натянуть получившуюся массу. Для гомогенизации выделенной мышечной каши ее перелить в стакан гомогенизатора, добавить 6-7 объемов (6-7 мл на 1 г мышечной каши) из охлажденного фосфатного буфера. Гомогенизировать 1-2 минуты. Гомогенизация проводится при $+2^\circ\text{C}$ $+4^\circ\text{C}$. Полученный мышечный гомогенат фильтровать через 4-слойную марлю и использовать для эксперимента.

Для эксперимента взять три пробирки. В первый раствор заливают 2 мл трихлоруксусной кислоты перед добавлением мышечного гомогената и не инкубируют.

Для эксперимента подготовлена следующая схема.

№	Гликоген, мл	CH_2JCOOH , мл	H_2O , мл	Мышечный гомогенат, мл
1.	0,9	-	0,1	1
2.	0,9	0,1	-	1
3.	0,9	-	0,1	1

Вторая и третья пробирки инкубируют в термостате при 90°C в течение 90 мин.

После инкубации во вторую и третью пробирки добавляют 2 мл трихлоруксусной кислоты и перемешивают стеклянной палочкой. Через 10-15 минут все три образца фильтруются. Все фильтраты используются для определения фруктозо-1,6-дифосфата.

Определение дифосфата фруктозы основано на цветной реакции с фруктозой, которая образует резорцин. Для этого взять три пробирки. К первой пробирке добавить 1 мл фильтрата №1, ко второй пробирке - фильтрата №2, а к третьей - фильтрата №3. Ко всем растворам добавить 1 мл и 3 мл концентрированной соляной кислоты (удельный вес 1,15) из раствора 0,1%-ного резорцина в 95%-ном спирте. Затем смесь перемешивают стеклянной палочкой и выливают в водяную баню с температурой 80°C на 10 мин. В зависимости от интенсивности окраски образцов видно, что образуется дифосфат фруктозы.

Построен откалиброванный график для определения количества образовавшегося дифосфата фруктозы. Для построения графика готовят стандартные растворы, содержащие разное количество фруктозы. В 1 мл основного раствора содержится 100 мкг фруктозы.

Из этого основного раствора готовят 6 капель раствора фруктозы разной концентрации. Его готовят по схеме, представленной ниже.

Как только цвет в образцах сформирован, его строят на спектрофотометре на длине волны 390 нм.

№	Фруктоза, мл	H ₂ O, мл	Резорцин, мл	HCl, Мл
1.	0,2	0,8	1,0	3,0
2.	0,4	0,6	1,0	3,0
3.	0,6	0,4	1,0	3,0
4.	0,8	0,2	1,0	3,0
5.	1,0	-	1,0	3,0
6.	-	1,0	1,0	3,0

Для построения графика величина оптической плотности образцов откладывается по оси ординат, количество фруктозы - по оси абсцисс. В зависимости от оптической плотности тестируемых образцов график определит, сколько фруктозы присутствует.

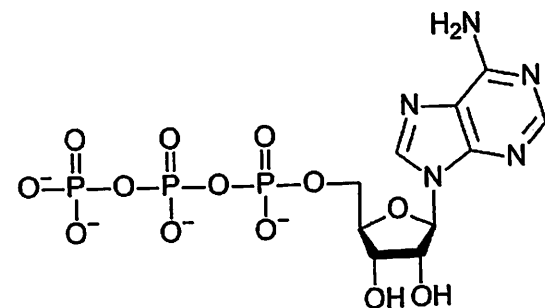
Чтобы определить количество фруктозы в образцах, оптическую плотность дифосфата фруктозы умножают в 1,9 раза. Затем на графике рассчитывается количество фруктозы в экспериментальных образцах и делается вывод о том, как протекала реакция гликолиза в образцах.

Определение уровня АТФ в тканях

АТФ - важный компонент, богатый энергией. Когда макроэргические связи, то есть пирофосфатные связи между ортофосфатами разрываются, каждая выделяет 7000-8000 калорий на 1 моль.

АТФ в клетке участвует во многих метаболических процессах. Например, в присутствии АТФ протекают многие ферментативные реакции: фосфофруктокиназа, цитратсинтаза, НАД-изоцитратдегидрогеназа и другие. АТФ также участвует в процессах окисления, фосфорилирования.

Принцип метода. Определение уровней АТФ в тканях основано на методе Лампрехта и Тратшолда (1965). АТФ фосфорилирует глюкозу в присутствии гексокиназы. В результате реакции образуется глюкозо-6-фосфат. Образовавшийся глюкозо-6-фосфат является субстратом для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г₆ФДГ).



Аденозин трифосфат, АТФ



Из уравнения реакции видно, что количество АТФ, израсходованное на реакцию, эквивалентно количеству НАДФН, образующемуся под действием фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, т.е. эквимольному. Он измеряется спектрофотометром на длине волны 340 нм. С помощью этого метода также можно измерить промежуточный продукт реакции, глюкозо-6-фосфат.

Необходимые инструменты: центрифуга; спектрофотометр; жидкий азот; ледяная ванна; ступка; пипетки 0,1 и 2 мл.

Реактивы. 1. 6%-ный раствор HClO₄ кислоты. 2. 5 М раствор K₂SO₄. 3. триэтаноламиновый буфер 0,05 М (рН 7,5). 4. 0,1 М раствор MgCl₂. 5. 7,5 М раствор НАДФ. 6. 0,5 М раствор глюкозы. 7. Гексокиназа: возьмите 10-15 мг из кристалла гексокиназы и растворите в 1 мл дистиллированной воде. 8. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу разбавляют 5-10 раз дистиллированной водой перед использованием суспензии фермента в 3,3 М сульфата аммония. 9. Ткань.

Ход работы. Ткань замораживают в жидком азоте и измельчают в ступке. Берут 500 мг измельченной ткани, предварительно заполненной 1 мл 6%-ным раствором HClO₄ кислоты для центрифуги, и помещают в ледяную баню. Ткань в образцах: кислота должно быть в соотношении

1: 3,35. Жидкости в растворах смешивают, и реакционные метаболиты помещают в ледяную баню на 10 мин для хорошей экстракции. Затем белки центрифугируют 10 минут при 3000 об / мин и осаждают.

Безбелковый экстракт помещают в центрифужный раствор. Для отделения избытка кислоты HClO_4 0,05 мл 0,5 М раствора K_2CO_4 добавляют к 1 мл кислотного экстракта, затем образец помещают в ледяную баню на 10 минут и образовавшийся осадок центрифугируют со скоростью 3000 об / мин в течение 5 минут. Нейтрализованный тканевый экстракт хранят при комнатной температуре и используют для ферментативной реакции.

Для ферментативного анализа кювета спектрофотометра (1 см) заполняется 2,5 мл буфера триэтаноламина, 0,05 мл раствора НАДФ и 0,35 мл раствора MgCl_2 , затем смешивается с 0,1 мл тканевого экстракта и через 3 минуты измеряется начальная оптическая плотность. (E_1). Затем к образцу добавляют 0,05 мл суспензии глюкозо-6-фосфат-гидрогеназы и через 5 мин измеряют оптическую плотность (E_2). Увеличение оптической плотности образца после добавления глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы связано с окислением глюкозо-6-фосфата в тканевом экстракте.

В кювету добавляют 0,4 мл раствора глюкозы, и через 30 секунд измеряют оптическую плотность, оптическая плотность уменьшается, поскольку образец разбавляется при добавлении раствора глюкозы. Добавляют 0,05 мл суспензии гексокиназы и после завершения реакции (12-15 мин) измеряют оптическую плотность (E_4). Увеличение оптической плотности при добавлении гексокиназы к образцу указывает на то, что количество АТФ в экстракте участвует в ферментативной реакции.

Количество АТФ в пробе рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{\Delta \varepsilon / K}{6,22}$$

Изменение оптической плотности образца в формуле изменяет оптическую плотность с расходом АТФ в ферментативной реакционной системе, т.е. $\Delta \varepsilon = E_4 - E_3$, V - конечному объему образца в кювете (3.5). K - коэффициент разбавления на 1 г ткани, в этом случае коэффициент разбавления составляет 41,6.

Коэффициент разбавления рассчитывается следующим образом. 9 г кислоты HClO_4 добавляют для осаждения 1 г тканевого белка.

Также учитывается среднее количество воды в ткани. Коэффициент микромолярной экстинкции обратимых форм пиридиновых нуклеотидов на длине волны 6,22–340 нм. Ширина кюветы 1 см. В зависимости от разницы в экстинкции $\Delta \varepsilon = E_2 - E_1$ можно вычислить количество глюкозо-6-фосфата в образце. Ниже указано количество АТФ в тканях крысы, рассчитанное в мкмоль.

Головной мозг 2,65 ± 0,19

Печень 2,51 ± 0,31

Сердце 2,31 ± 0,30

Контрольные вопросы

1. Расскажите общие свойства углеводов.
2. Каково биологическое значение углеводов?
3. Объясните классификацию углеводов.
4. Моносахариды. Расскажите их физико-химические свойства.
5. Напишите циклические формы моносахаридов.
6. Олигосахариды. Напишите представителей олигосахаридов.
7. Напишите представителей дисахаридов.
8. Структура и свойства дисахаридов.
9. Полисахариды. Приведите примеры.
10. Крахмал. Строение и его свойства.
11. Состав, строение и биологическое значение целлюлозы.
12. Биологическое значение гликогена.

1: 3,35. Жидкости в растворах смешивают, и реакционные метаболиты помещают в ледяную баню на 10 мин для хорошей экстракции. Затем белки центрифугируют 10 минут при 3000 об / мин и осаждают.

Безбелковый экстракт помещают в центрифужный раствор. Для отделения избытка кислоты HClO_4 0,05 мл 0,5 М раствора K_2CO_3 добавляют к 1 мл кислотного экстракта, затем образец помещают в ледяную баню на 10 минут и образовавшийся осадок центрифугируют со скоростью 3000 об / мин в течение 5 минут. Нейтрализованный тканевый экстракт хранят при комнатной температуре и используют для ферментативной реакции.

Для ферментативного анализа кювета спектрофотометра (1 см) заполняется 2,5 мл буфера триэтаноламина, 0,05 мл раствора НАДФ и 0,35 мл раствора MgCl_2 , затем смешивается с 0,1 мл тканевого экстракта и через 3 минуты измеряется начальная оптическая плотность. (E_1). Затем к образцу добавляют 0,05 мл суспензии глюкозо-6-фосфат-гидрогеназы и через 5 мин измеряют оптическую плотность (E_2). Увеличение оптической плотности образца после добавления глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы связано с окислением глюкозо-6-фосфата в тканевом экстракте.

В кювету добавляют 0,4 мл раствора глюкозы, и через 30 секунд измеряют оптическую плотность, оптическая плотность уменьшается, поскольку образец разбавляется при добавлении раствора глюкозы. Добавляют 0,05 мл суспензии гексокиназы и после завершения реакции (12-15 мин) измеряют оптическую плотность (E_4). Увеличение оптической плотности при добавлении гексокиназы к образцу указывает на то, что количество АТФ в экстракте участвует в ферментативной реакции.

Количество АТФ в пробе рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{\Delta \epsilon / K}{6,22}$$

Изменение оптической плотности образца в формуле изменяет оптическую плотность с расходом АТФ в ферментативной реакционной системе, т.е. $\Delta \epsilon = E_4 - E_3$, V - конечному объему образца в кювете (3.5). K - коэффициент разбавления на 1 г ткани, в этом случае коэффициент разбавления составляет 41,6.

Коэффициент разбавления рассчитывается следующим образом. 9 г кислоты HClO_4 добавляют для осаждения 1 г тканевого белка.

Также учитывается среднее количество воды в ткани. Коэффициент микромолярной экстинкции обратимых форм пиридиновых нуклеотидов на длине волны 6,22–340 нм. Ширина кюветы 1 см. В зависимости от разницы в экстинкции $\Delta \epsilon = E_2 - E_1$ можно вычислить количество глюкозо-6-фосфата в образце. Ниже указано количество АТФ в тканях крысы, рассчитанное в мкмоль.

Головной мозг 2,65 ± 0,19

Печень 2,51 ± 0,31

Сердце 2,31 ± 0,30

Контрольные вопросы

1. Расскажите общие свойства углеводов.
2. Каково биологическое значение углеводов?
3. Объясните классификацию углеводов.
4. Моносахариды. Расскажите их физико-химические свойства.
5. Напишите циклические формы моносахаридов.
6. Олигосахариды. Напишите представителей олигосахаридов.
7. Напишите представителей дисахаридов.
8. Структура и свойства дисахаридов.
9. Полисахариды. Приведите примеры.
10. Крахмал. Строение и его свойства.
11. Состав, строение и биологическое значение целлюлозы.
12. Биологическое значение гликогена.

ГЛАВА VI. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Ключевые слова: азотистые основания, углеводные компоненты, нуклеозиды, нуклеотиды, рибонуклеиновая кислота, дезоксирибонуклеиновая кислота, структуры нуклеиновых кислот, конформация, денатурация, ренатурация.

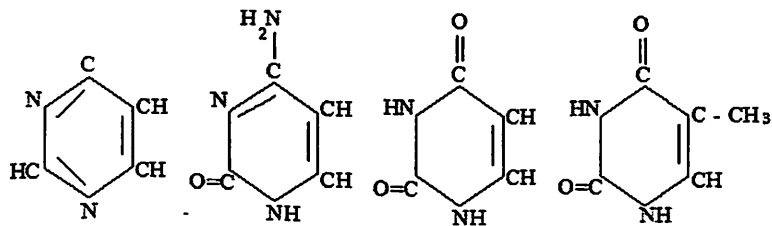
Нуклеиновые кислоты - ДНК (дезоксирибонуклеиновая) и РНК (рибо-нуклеиновая) кислоты играют ключевую роль в сохранении всех генетических маркеров в организме и в синтезе белка. Дезоксирибонуклеиновая кислота находится в основном в ядре эукариот (животных и растений).

Митохондрии также содержат ДНК. Ядро эукариот содержит несколько пикограмм (пг) ДНК: 6 пг у млекопитающих и 2 пг у птиц.

Существует три типа рибонуклеиновых кислот: информационная РНК (и-РНК), транспортная РНК (т-РНК) и рибосомальная РНК (р-РНК). Они отличаются друг от друга в зависимости от их состава, размера, функциональных свойств и расположения в клетке. РНК в основном находится в цитоплазме клетки, в меньшей степени в ядре. Функция, выполняемая РНК в клетке, заключается в участии в синтезе белковых молекул.

Нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды) - это полимеры, состоящие из нуклеотидов. Нуклеотиды состоят из трех компонентов: азотистых оснований (пуринов или пиримидинов), углеводных компонентов - пентозы (рибоза или дезоксирибоза) и остатка фосфорной кислоты.

Пиримидиновые основания:



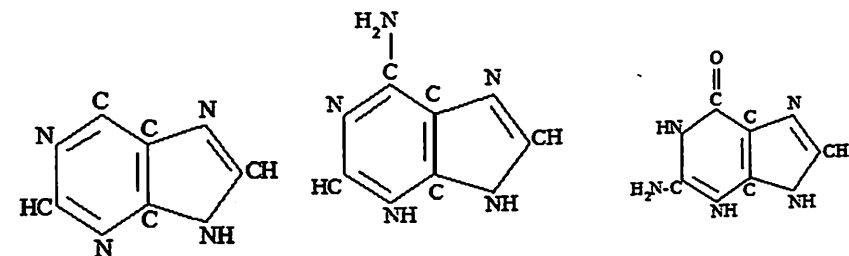
Пиримидин

Цитозин

Урацил

Тимин

Пуриновые основания:

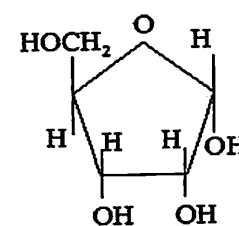


Пуринов

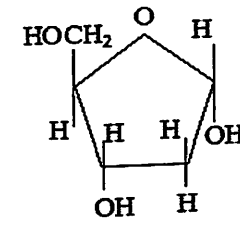
Аденин

Гуанин

В зависимости от содержания пентозы нуклеиновые кислоты делятся на две группы: РНК и ДНК. Молекула РНК содержит рибозу, а молекула ДНК - дезоксирибозу.



Д-рибоза

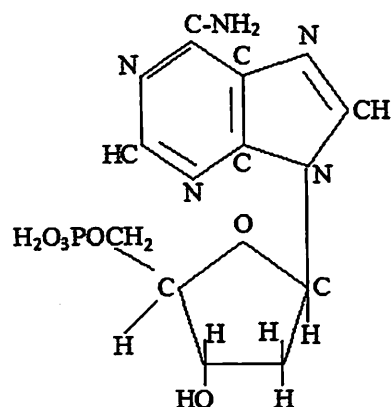


Д-2-дезоксирибоза

РНК содержит аденин, гуанин, цитозин и рибозу из азотистых оснований, и рибозу из углеводных компонентов. ДНК содержит из азотистых оснований - аденина, гуанина, цитозина и тимина, дезоксирибозу из углеводных компонентов. ДНК состоит из двух полинуклеотидов со спиральной цепью, а РНК состоит из одной спиральной цепи.

Нуклеотиды содержат аденин, который называется аденилат, гуанин, который называется гуанилат, и цитозин, который называется цитидиловой кислотой.

Когда сами нуклеиновые кислоты подвергаются гидролизу, они распадаются на нуклеотиды, нуклеотиды на нуклеозиды и фосфорную кислоту, нуклеозиды на азотистые основания и углеводы (рибоза, дезоксирибоза).



Качественная реакция ДНК

ДНК обнаруживается в результате характерной качественной реакции на дезоксирибозу. Дифениламин ($C_6H_5-NH-C_6H_5$) часто используется для этой реакции. Дифениламин образует синее соединение с дезоксирибозой и ДНК. Рибоза и РНК становятся зелеными под действием дифениламина.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки; водяная баня.

Реактивы. 1. Реактив дифениламина: 1 г дифениламина растворяют в 100 мл уксусной кислоте, к раствору добавляют 2,75 мл концентрированной серной кислоты. 2. 0,4%-ный раствор гидроксида натрия.

Ход работы. В пробирку добавляют небольшое количество осадка ДНК (осаждение ДНК описано выше) и растворяют, добавляя 1 мл раствора гидроксида натрия. Добавляют 2 мл из реактива дифениламина до растворения осадка и помещают в кипящую водяную баню на 15-20 минут. В результате получается синий цвет. Гидролиз нуклеиновых кислот и цветные реакции продуктов гидролиза полностью описаны в разделе, посвященном нуклеопротеинам.

Определение общего количества нуклеиновых кислот в тканях животных

Метод основан на том, что пуриновые и пиримидиновые основания поглощают часть ультрафиолетового света с длиной волны 260-280 нм. Метод определения общего количества нуклеиновых кислот в тканях животных разработан А.С. Спириным. Оптическая плотность определяется на длинах волн 270 и 290 нм и рассчитывается по формуле.

Гидролизат охлаждают, центрифугируют и измеряют на спектрофотометре при длине волны 270 и 290 нм относительно 0,5 Н раствора $HClO_4$, определяют оптическую плотность. Количество фосфора в нуклеиновой кислоте 1 мл исследуемого раствора рассчитывается в мкг.

$$C_{\text{мкг}} P_i = \frac{D_{270} - D_{290}}{0,19}$$

В этом случае оптическая плотность фосфора (1 мкг) в содержании нуклеиновой кислоты 0,19 - 1 мл раствора.

Количество нуклеиновых кислот рассчитывается в зависимости от содержания в них фосфора со средним расчетным коэффициентом 10,3.

$$C_{\text{мкг}} \text{НК} = C_{\text{мкг}} P_i \cdot 10,3$$

10,3 - средний расчетный коэффициент

Контрольные вопросы

1. Химический состав нуклеиновых кислот.
2. Какое биологическое значение имеют нуклеиновые кислоты?
3. Напишите пуриновые и пиримидиновые основания.
4. Напишите минорные основания в составе нуклеиновых кислот.
5. Из чего состоят нуклеозиды?
6. Напишите формулы нуклеозидов, состоящих из пуриновых и пиримидиновых оснований.

7. Какие соединения называются нуклеотидами? Приведите примеры.

8. Расскажите о биологическом значении нуклеотидтрифосфатов и напишите их формулы.

9. Напишите химический состав ДНК и расскажите о локализации в клетке, о выполняемой функции.

10. Типы РНК, химический состав, локализация в клетке, выполняемые функции.

11. Какова разница между РНК и ДНК?

12. Как связаны нуклеотиды между собой в составе нуклеиновых кислот?

13. Напишите правила Чаргаффа.

14. Расскажите о первичной и вторичной структуре ДНК.

15. Третичная структура ДНК, биологическое значение суперспирализации.

ГЛАВА VII. ФЕРМЕНТЫ

Ключевые слова: энзимы, субстрат, активный центр, аллостерический центр, специфичность, ингибирование, активаторы, ингибиторы, термолабильность

Ферменты - это специфические белки, которые проникают во все клетки и ткани живых организмов и действуют как биологические катализаторы. Активность живых организмов зависит от ферментов. Ферменты играют жизненно важную роль в обмене веществ между телом и окружающей средой.

Группа ферментов, состоящая из простых белков, то есть только аминокислот, называется однокомпонентными ферментами. Например, рибонуклеаза, трипсин, папаин и другие. Ферменты называются двухкомпонентными ферментами, если они состоят из сложных белков, то есть содержат соединения, отличные от аминокислот. Ферменты, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях, представляют собой двухкомпонентные ферменты.

Ферменты обладают рядом уникальных свойств. К ним относятся термолабильность, специфичность ферментов, чувствительность к изменениям pH окружающей среды, чувствительность к активаторам и ингибиторам, восприимчивость к активаторам и ингибиторам. Действие ферментов и их активность определяется уменьшением количества вещества, участвующего в реакции (вещество называется субстратом), или увеличением количества образовавшегося вещества. Известные до сих пор ферменты делятся на 6 классов.

1. Оксидоредуктазы - катализируют реакции окисления и восстановления.

2. Трансферазы - обеспечивают перенос определенных химических групп от одного соединения к другому.

3. Гидролазы - катализируют реакции разложения сложных органических соединений с помощью воды.

4. Лиазы катализируют отделение определенных групп от субстрата в отсутствие воды. Благодаря активности этих ферментов либо образуется двойник, либо к нему присоединяются определенные группы.

5. Изомеразы - катализируют реакции изомеризации различных органических соединений.

6. Лигазы - образование сложных соединений из простых молекул за счет энергии АТФ или подобных нуклеозидтрифосфатов катализируют реакции.

Помимо химических методов определения активности ферментов широко используются спектрофотометрические, хроматографические и другие методы.

Влияние амилазы на крахмал

Фермент амилаза расщепляет крахмал на сахар. Фермент амилаза содержится в слюне, соке поджелудочной железы, крови, печени. Злаки - один из важнейших источников фермента амилазы.

Фермент амилаза расщепляет крахмал на сахар. Одним из важных источников фермента амилазы являются злаки. В большом количестве они накапливаются в сухом зерне и особенно в составе проросшего зерна. Ферменты проросших зерен обладают наибольшей активностью.

Крахмал с йодом дает синий цвет, в зависимости от размера частиц декстрина, образовавшихся в результате его разложения, йод меняется на фиолетовый, коричнево-красный желтый и желтый (цвет йода в воде). Следовательно, если фермент амилазы добавлен к раствору крахмала, смесь сначала изменится на синий, затем на пурпурный, красновато-желтый и желтоватый цвет под действием йода в пределах определенного времени.

Ход работы. Взять 9 пробирок и влить в каждую по 2-3 мл дистиллированной воды и по одной капле 1%-ного раствора йода. Отдельно взять в пробирку №10 2-3 мл 0,5%-ного раствора крахмала и залить 1 мл фермента. Установить время и хорошо встряхнуть смесь в пробирке. Затем с помощью пипетки добавить 1 каплю смеси в первый раствор. Жидкость в растворе дает синий цвет. Таким образом, каждые 30 секунд, 2, 3, 4 ... и т. В 9-ю пробирку добавляется одна капля из смеси в 10-й пробирке. Жидкости в растворах хорошо перемешиваются и образуются соответствующие цвета. Если жидкость во втором растворе посинела, следующий раствор нужно добавлять немного позже,

например, каждую минуту. Если вторая пробирка станет пурпурной или красноватой, необходимо ускорить время, то есть ставить каждые 15 секунд.

Если желтый цвет в одном из растворов не меняется, это означает, что гидролиз крахмала завершился. Результаты эксперимента записаны в таблице ниже.

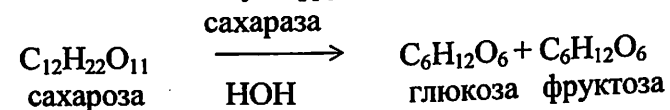
Реактивы: Слюна (слюна, разбавленная в 10 раз дистиллированной водой); ферментный сок (5-10 грамм проросшей или 5-дневной травы мелко измельчают и заливают в колбу 100 мл дистиллированной воды). Хорошо перемешивают, настаивают 30 минут, затем фильтруют. Отфильтрованная жидкость - ферментный сок. 1%-ный раствор йода, 0,5%-ный раствор крахмала.

Влияние фермента амилазы на крахмал

Пробирки	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Название продукта, из которого образуется окраска жидкости									

Определение активности фермента сахаразы

Фермент сахараза (инвертаза) гидролизует сахарозу и расщепляет ее на глюкозу и фруктозу.



Фермент сахараза содержится в большинстве растений. Особенно много его у дрожжевых грибов. Для определения активности ферментов используется ряд методов. Один из них основан на восстановительных свойствах вышеуказанных продуктов реакции, в которых глюкоза и фруктоза окисляются до соответствующих кислот, а ионы меди возвращаются.

Влияние pH окружающей среды на активность ферментов

Характерные особенности ферментов включают их чувствительность к изменениям pH окружающей среды. Активность ферментов резко меняется в зависимости от значения pH. Оптимальное значение pH не одинаково для разных ферментов. Например: оптимальное значение pH 1,5-2,0 для пепсина; амилаза слюны - 6,8-7,0; трипсин - 7,8. Большинство ферментов проявляют наибольшую активность в нейтральной, слабощелочной или слабокислой реакции. Ферменты обладают наибольшей активностью в изоэлектрическом состоянии. В кругах оптимальной активности частицы фермента в электрическом поле обычно не движутся ни к катоду, ни к аноду. Изменение pH приводит к снижению или полному прекращению активности фермента. В результате структура активного центра фермента нарушается.

Реактивы: 1,1%-ный раствор йода в йоде калия. 2. 1%-ный раствор крахмала. 3. 0,2 Н раствор соляной кислоты.

Ход работы. К 8 пробиркам добавить по 1 мл дистиллированной воды, затем к первой пробирке добавить 1 мл 0,2 Н раствора соляной кислоты и перемешать. Затем взять 1 мл жидкости из этой же пробирки, добавить ко второй пробирке и перемешать, затем взять 1 мл, влить в третью пробирку и так далее. Взять 1 мл раствора из восьмой пробирки и вылить. Таким образом, образуются разные концентрации соляной кислоты, которые соответствуют разным значениям pH среды. Затем к каждому раствору добавить 2 мл 1%-ного раствора крахмала и 1 мл разбавленного раствора слюны, растворы встряхнуть и слить в термостат при 37 °С на 20 минут. После охлаждения во все растворы добавить 1-2 капли 1%-ного раствора йода калия. В растворах 5 и 6 определяется, что произошел полный гидролиз крахмала, в этих растворах pH среды раствора составляет около 6,8-7,2, поэтому амилаза имеет оптимальную активность.

Специфичность ферментов

Ферменты - это биологические катализаторы, обладающие определенным действием. Их уникальность - одна из важных

особенностей живых организмов. Образование комплекса фермент-субстрат в каталитических процессах зависит от структуры белковой молекулы фермента, образования химических связей между его активными частями и соответствующими группами субстрата. Каждый фермент влияет только на определенный субстрат или конкретный тип химической связи в молекуле. Таким образом, специфическая природа ферментов должна соответствовать ферменту субстрату, поскольку ключ заблокирован.

Принцип метода. Исследовано влияние ферментов амилазы и сахаразы на различные субстраты, то есть крахмал и сахарозу.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки; термостат, спиртовая лампа.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор крахмала. 2. 2%-ный раствор сахарозы. 3. Разбавленная слюна; Ферментный сок амилазы. 4. Сахараза (10 г дрожжей гомогенизируют в 100 мл дистиллированной воде). 5. 20%-ный раствор гидроксида натрия. 6. 5%-ный раствор медного купороса.

Ход работы. В первую и во вторую пробирку добавляют по 2-4 мл раствора крахмала; в третьи и четвертые пробирки заливают 2-4 мл разбавленной слюны (амилазы), во вторую и в четвертую пробирку добавляют 2-4 мл фермента сахаразы, затем растворы встряхивают и сливают в инкубатор в термостате при 37 °С на 20 минут. После инкубации к растворам 1 и 2 добавляют 1-2 капли йода из раствора йода калия. Нагревают, добавив 2-4 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия и 2-4 капли 5%-ного раствора сульфата меди в пробирках 3 и 4. Результаты реакции заносятся в таблицу и суммируются.

№	Субстрат	Фермент	Инкубация	Окраска сформированный с йодом	Результаты реакции Троммер
1	Крахмал	Амилаза	20 мин. 37°С		
2	Крахмал	Сахараза	20 мин. 37°С		
3	Сахароза	Амилаза	20 мин. 37°С		
4	Сахароза	Сахараза	20 мин. 37°С		

Влияние pH окружающей среды на активность ферментов

Характерные особенности ферментов включают их чувствительность к изменениям pH окружающей среды. Активность ферментов резко меняется в зависимости от значения pH. Оптимальное значение pH не одинаково для разных ферментов. Например: оптимальное значение pH 1,5-2,0 для пепсина; амилаза слюны - 6,8-7,0; трипсин - 7,8. Большинство ферментов проявляют наибольшую активность в нейтральной, слабощелочной или слабокислой реакции. Ферменты обладают наибольшей активностью в изoeлектрическом состоянии. В кругах оптимальной активности частицы фермента в электрическом поле обычно не движутся ни к катоду, ни к аноду. Изменение pH приводит к снижению или полному прекращению активности фермента. В результате структура активного центра фермента нарушается.

Реактивы: 1,1%-ный раствор йода в йоде калия. 2. 1%-ный раствор крахмала. 3. 0,2 Н раствор соляной кислоты.

Ход работы. К 8 пробиркам добавить по 1 мл дистиллированной воды, затем к первой пробирке добавить 1 мл 0,2 Н раствора соляной кислоты и перемешать. Затем взять 1 мл жидкости из этой же пробирки, добавить ко второй пробирке и перемешать, затем взять 1 мл, влить в третью пробирку и так далее. Взять 1 мл раствора из восьмой пробирки и вылить. Таким образом, образуются разные концентрации соляной кислоты, которые соответствуют разным значениям pH среды. Затем к каждому раствору добавить 2 мл 1%-ного раствора крахмала и 1 мл разбавленного раствора слюны, растворы встряхнуть и слить в термостат при 37 °С на 20 минут. После охлаждения во все растворы добавить 1-2 капли 1%-ного раствора йода калия. В растворах 5 и 6 определяется, что произошел полный гидролиз крахмала, в этих растворах pH среды раствора составляет около 6,8-7,2, поэтому амилаза имеет оптимальную активность.

Специфичность ферментов

Ферменты - это биологические катализаторы, обладающие определенным действием. Их уникальность - одна из важных

особенностей живых организмов. Образование комплекса фермент-субстрат в каталитических процессах зависит от структуры белковой молекулы фермента, образования химических связей между его активными частями и соответствующими группами субстрата. Каждый фермент влияет только на определенный субстрат или конкретный тип химической связи в молекуле. Таким образом, специфическая природа ферментов должна соответствовать ферменту субстрату, поскольку ключ заблокирован.

Принцип метода. Исследовано влияние ферментов амилазы и сахаразы на различные субстраты, то есть крахмал и сахарозу.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки; термостат, спиртовая лампа.

Реактивы. 1. 1%-ный раствор крахмала. 2. 2%-ный раствор сахарозы. 3. Разбавленная слюна; Ферментный сок амилазы. 4. Сахараза (10 г дрожжей гомогенизируют в 100 мл дистиллированной воде). 5. 20%-ный раствор гидроксида натрия. 6. 5%-ный раствор медного купороса.

Ход работы. В первую и во вторую пробирку добавляют по 2-4 мл раствора крахмала; в третье и четвертые пробирки заливают 2-4 мл разбавленной слюны (амилазы), во вторую и в четвертую пробирку добавляют 2-4 мл фермента сахаразы, затем растворы встряхивают и сливают в инкубатор в термостате при 37 °С на 20 минут. После инкубации к растворам 1 и 2 добавляют 1-2 капли йода из раствора йода калия. Нагревают, добавив 2-4 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия и 2-4 капли 5%-ного раствора сульфата меди в пробирках 3 и 4. Результаты реакции заносятся в таблицу и суммируются.

№	Субстрат	Фермент	Инкубация	Окраска сформированный с йодом	Результаты реакции Троммер
1	Крахмал	Амилаза	20 мин. 37°С		
2	Крахмал	Сахараза	20 мин. 37°С		
3	Сахароза	Амилаза	20 мин. 37°С		
4	Сахароза	Сахараза	20 мин. 37°С		

Вещества, влияющие на активность ферментов (ингибиторы и активаторы)

На активность ферментов также влияет ряд химических веществ, участвующих в реакционной среде. Присутствие определенных ионов в реакционной среде увеличивает скорость ферментативной реакции. Такие вещества называют активаторами. Активаторами часто являются катионы металлов, такие как Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} . Вещества, снижающие активность ферментативной реакции, называют ингибиторами. Примерами ингибиторов являются цианиды, соли тяжелых металлов.

Реактивы: слюна или ферментный сок амилазы (солод), 0,04%-ный раствор хлорида натрия, 0,1%-ный раствор медного купороса, 1%-ный раствор крахмала, 1%-ный раствор йода.

Ход работы. Подготовить пробирки в три ряда (по 6 в каждый ряд) и добавьте во все по 1 мл воды. Затем в первую пробирку каждого ряда налить по 1 мл сока фермента амилазы. С помощью пипетки смешать жидкость в первой пробирке, потом смесь налить во вторую пробирку и снова перемешать, так далее переливают со второго к третьему. Удалить 1 мл лишней смеси из последних шести пробирок. То же самое проделать в остальных рядах.

К растворам первого ряда добавить 1 мл воды, к растворам второго ряда - 1 мл 0,04%-ного раствора хлорида натрия, 1 мл 0,1%-ного раствора медного купороса к растворам третьего ряда. Затем ко всем растворам добавить 2 мл крахмала и инкубировать при 40°C в течение 10 мин. В конце акта во все пробирки добавить по 2–3 капли йода и определить действие активаторов и ингибиторов.

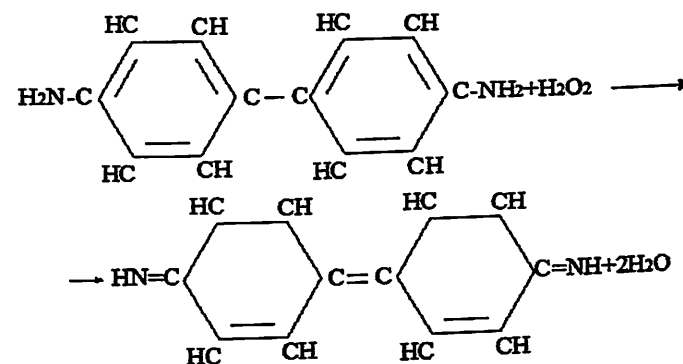
Определение активности пероксидазы

Пероксидаза представляет собой гемопротейн, химически по своей природе распространенный в тканях животных и растений, и его простетическая группа состоит из порфирина железа. Фермент катализирует реакции окисления ряда органических соединений (фенолов, полифенолов, ароматических аминов) в присутствии перекиси водорода.

Принцип метода. Пероксидаза катализирует реакции окисления бензидина до дифенохинондиимина:

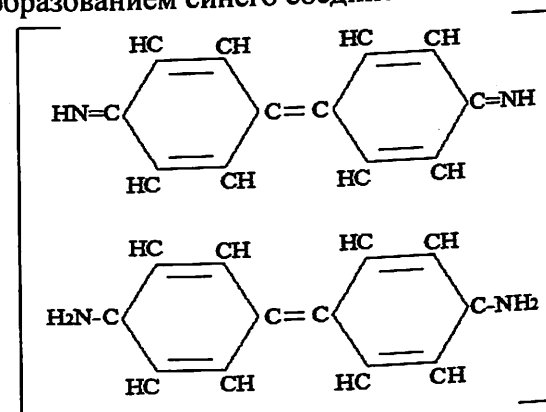
Необходимые инструменты: колбы 25 мл; пипетки; спектрофотометр.

Реактивы. 1. Новая кровь. Разбавлено 1: 1000. 2. Раствор 1%-ного бензидина в уксусной кислоте.



Дифенохинондиимин

Молекула дифенохинондиимина конденсируется с молекулой бензидина с образованием синего соединения.



Бензидиновый синий

3. 3%-ный раствор перекиси водорода. 4. 30%-ный раствор гидроксида натрия. 5. Этиловый спирт. 6. 0,01 Н раствор перманганата калия. 7. В колбу на 25 мл добавляют стандартный

раствор с 2 мл 1%-ного раствора бензидина, 3 мл 0,01 Н раствора перманганата калия и оставляют на 10 минут, затем добавляют 10 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и доливают спирт до метки колбы. Этот раствор готовят перед определением активности фермента.

Ход работы. В колбу на 25 мл добавляют 2 мл раствора бензидина, 2 мл 3%-ного перекиси водорода и 1 мл разбавленной крови. После встряхивания пробирки через 3 мин добавляют 10 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и снова встряхивают пробирку. Образуется окрашенный осадок, который растворяют в спирте и добавляют спирт к метке колбы. Интенсивность окраски в исследуемых и стандартных растворах измеряют с помощью спектрофотометра.

Активность фермента рассчитывается по следующей формуле.

$$X = \frac{h_2 \cdot 25}{h_1 \cdot 5}$$

Здесь h_1 - эксцентриситет оптической плотности стандартного раствора; h_2 - эксцентриситет оптической плотности исследуемого раствора; 25 - Объем раствора в пробирке, мл; 5 - объем бензидина, перекиси водорода и крови в пробирке, мл.

Определение активности фермента глутаматдегидрогеназы

Глутаматдегидрогеназа (α -глутамат: НАДФ-оксидоредуктаза) находится во внутренней мембране и матриксе митохондрий. Этот фермент катализирует реакции, протекающие при окислении субстрата, с выделением водорода. Освобождающийся от донора водород переносится на различные акцепторы. Определение активности фермента измеряется по скорости окисления или восстановления НАДФ⁺, НАДФН.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; центрифуга; гомогенизатор; ледяная ванна; спектрофотометр; пипетки.

Реактивы. 1. 0,25 М раствор сахарозы. 2. 0,05 М Na, К - фосфатный буфер, pH 8,2. 3. 0,5%-ный раствор тритона X-100 готовят в буфере с Na₂HPO₄. 4. 0,25 М сахарозный трис-НСl-

буфер, pH 8,2. 5. 10³ М раствор ЭДТА. 6. Раствор НАДФ 18·10⁻⁴ М. 7. 0,75 М раствор глутаминовой кислоты. 8. Ткань.

Ход работы. Активность глутаматдегидрогеназы определяется во фракциях митохондрий. Для отделения митохондрий берут 0,5 г ткани и измельчают ножницами. Для гомогенизации ткани используют 0,1 М раствор ЭДТА 0,25 М сахарозы. Гомогенат ткани готовят в соотношении 1:10 потом центрифугировали в течение 10 минут при 1200 об/мин. Осадок сбрасывается, жидкая часть центрифугировали при 12000 об / мин. в течение 10 минут. Осадок дважды промывают 0,25 М раствором сахарозы, затем разрушают митохондриальную мембрану раствором Тритона X-100, гомогенизируют 1 мл раствора тритона X-100 и 1 мл фракции митохондрий и затем помещают на лед на 20 минут. Применить митохондриальную суспензию на 30 минут при 12000 об / мин. центрифугировали. Осадок отбрасывают и определяют активность глутаматдегидрогеназы с жидкостью.

Для определения активности фермента инкубационную смесь готовят следующим образом (в мл на образец):

0,25 М сахароза, буфер трис HCl	0,6
ЭДТА	0,3
Вода	1,7
НАДФ	0,1

Кювета спектрофотометра заполнена 2,7 мл инкубационной смеси и 0,1 мл экстракта митохондрий. Реакцию инициируют добавлением к инкубационной смеси 0,2 мл 0,75 М глутаминовой кислоты. Оптическая плотность образца измеряется каждые 15 секунд в течение 1,5–2 мин.

Активность глутаматдегидрогеназы (мкмоль НАДФ / мин. / 1 мг белка) рассчитывают по следующей формуле.

$$X = \frac{\Delta E \cdot V \cdot 1000}{6,22a}$$

В этом случае ΔE - изменение оптической плотности раствора за 1 минуту; V - общий объем пробы (3 мл); a - количество белка в пробе, мг;

6.22 - микромолярный коэффициент экстинкции пиридиновой нуклеотидной формы на длине волны 340 нм.

раствор с 2 мл 1%-ного раствора бензидина, 3 мл 0,01 Н раствора перманганата калия и оставляют на 10 минут, затем добавляют 10 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и доливают спирт до метки колбы. Этот раствор готовят перед определением активности фермента.

Ход работы. В колбу на 25 мл добавляют 2 мл раствора бензидина, 2 мл 3%-ного перекиси водорода и 1 мл разбавленной крови. После встряхивания пробирки через 3 мин добавляют 10 мл 30%-ного раствора гидроксида натрия и снова встряхивают пробирку. Образуется окрашенный осадок, который растворяют в спирте и добавляют спирт к метке колбы. Интенсивность окраски в исследуемых и стандартных растворах измеряют с помощью спектрофотометра.

Активность фермента рассчитывается по следующей формуле.

$$X = \frac{h_2 \cdot 25}{h_1 \cdot 5}$$

Здесь h_1 - эксцентриситет оптической плотности стандартного раствора; h_2 - эксцентриситет оптической плотности исследуемого раствора; 25 - Объем раствора в пробирке, мл; 5 - объем бензидина, перекиси водорода и крови в пробирке, мл.

Определение активности фермента глутаматдегидрогеназы

Глутаматдегидрогеназа (α -глутамат: НАДФ-оксидоредуктаза) находится во внутренней мембране и матриксе митохондрий. Этот фермент катализирует реакции, протекающие при окислении субстрата, с выделением водорода. Освобождающийся от донора водород переносится на различные акцепторы. Определение активности фермента измеряется по скорости окисления или восстановления НАДФ⁺, НАДФН.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; центрифуга; гомогенизатор; ледяная ванна; спектрофотометр; пипетки.

Реактивы. 1. 0,25 М раствор сахарозы. 2. 0,05 М Na, К - фосфатный буфер, pH 8,2. 3. 0,5%-ный раствор тритона X-100 готовят в буфере с Na₂HPO₄. 4. 0,25 М сахарозный трис-HCl-

буфер, pH 8,2. 5. 10³ М раствор ЭДТА. 6. Раствор НАДФ 18·10⁻⁴ М. 7. 0,75 М раствор глутаминовой кислоты. 8. Ткань.

Ход работы. Активность глутаматдегидрогеназы определяется во фракциях митохондрий. Для отделения митохондрий берут 0,5 г ткани и измельчают ножницами. Для гомогенизации ткани используют 0,1 М раствор ЭДТА 0,25 М сахарозы. Гомогенат ткани готовят в соотношении 1:10 потом центрифугировали в течение 10 минут при 1200 об/мин. Осадок сбрасывается, жидкая часть центрифугировали при 12000 об / мин. в течение 10 минут. Осадок дважды промывают 0,25 М раствором сахарозы, затем разрушают митохондриальную мембрану раствором Тритона X-100, гомогенизируют 1 мл раствора тритона X-100 и 1 мл фракции митохондрий и затем помещают на лед на 20 минут. Применить митохондриальную суспензию на 30 минут при 12000 об / мин. центрифугировали. Осадок отбрасывают и определяют активность глутаматдегидрогеназы с жидкостью.

Для определения активности фермента инкубационную смесь готовят следующим образом (в мл на образец):

0,25 М сахароза, буфер трис HCl	0,6
ЭДТА	0,3
Вода	1,7
НАДФ	0,1

Кювета спектрофотометра заполнена 2,7 мл инкубационной смеси и 0,1 мл экстракта митохондрий. Реакцию инициируют добавлением к инкубационной смеси 0,2 мл 0,75 М глутаминовой кислоты. Оптическая плотность образца измеряется каждые 15 секунд в течение 1,5–2 мин.

Активность глутаматдегидрогеназы (мкмоль НАДФ / мин. / 1 мг белка) рассчитывают по следующей формуле.

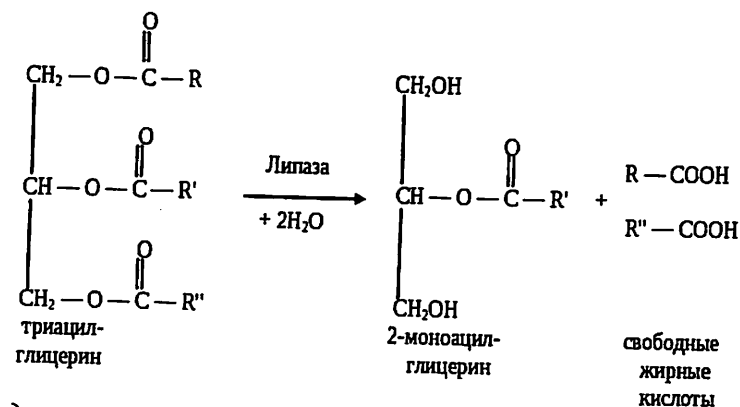
$$X = \frac{\Delta E \cdot V 1000}{6,22a}$$

В этом случае ΔE - изменение оптической плотности раствора за 1 минуту; V - общий объем пробы (3 мл); a - количество белка в пробе, мг;

6,22 - микромолярный коэффициент экстинкции пиридиновой нуклеотидной формы на длине волны 340 нм.

Влияние желчи на активность липазы

В молоко добавляют небольшое количество липазы и щелочной фенолфталеин до тех пор, пока смесь не приобретет розовый цвет, затем жидкость постепенно обесцвечивается при помещении в водяную баню с температурой 37 °С. Обесцвечивание ускоряется при добавлении желчи. Это свидетельствует о том, что липаза активируется под действием солей желчных кислот.



Необходимые инструменты: штатив с пробирками; водяная баня.

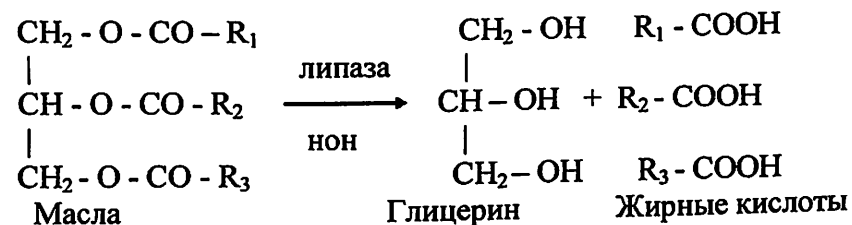
Реактивы. 1. Сваренное молоко разводят в воде. 2. 10%-ный раствор карбоната натрия. 3. 0,5%-ный раствор фенолфталеина в спирте. 4. Желчь. 5. Экстракт липазы - то есть экстракт поджелудочной железы - очищают от жира поджелудочной железы, мелко измельчают и растирают в ступке с добавлением экстракта липазы. В первый раствор также добавляется 1-2 капли желчи. Жидкости в растворах встряхивают и выливают в водяную баню при 37 °С, при этом наблюдается обесцвечивание фенолфталеина в экспериментах с желчью и без желчи в 5 раз большего количества воды. Полученный экстракт процеживают через марлю.

Ход работы. В две пробирки залить 1 мл молока и добавить 1-2 капли раствора фенолфталеина. К каждому раствору по каплям добавляют из раствора карбоната натрия до образования розовой окраски, и одновременно добавляют 2-4 капли.

Определение активности фермента липазы

Ферменты липазы широко распространены в растениях, особенно в семенах маслянистых растений. Активность фермента липазы также наиболее высока в проросших семенах.

Фермент липаза расщепляет жиры на жирные кислоты и глицерин.



Под действием фермента липазы количество жирных кислот увеличивается, поэтому активность фермента определяется титрованием кислотности реакционной среды.

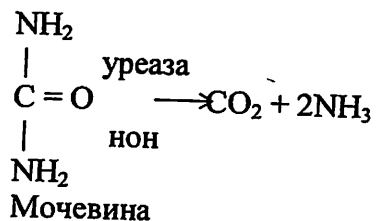
Реактивы: 2-3 дня набухшего семенного ядра, ацетатный буфер, 0,2М раствор (рН - 4,8) хлопкового масла, 96% - ный раствор этилового спирта, эфир, фенолфталеин, 0,1 Н раствор гидроксида калия.

Ход работы. Чтобы получить фермент липазу, взять 2 грамма семян 2-3 дневного клеверицы, измельчить их в фарфоровой ступке с использованием молотого стекла до образования однородной массы и добавьте 5 мл 0,2 М ацетатного буфера (рН - 4,8) размещен в колбу объемом 100 мл. Добавить в колбу 2 мл чистого хлопкового масла и инкубировать при 40 °С в течение 2 часов. За это время 3-4 раза встряхнуть колбу. По истечении времени добавить в колбу 20 мл 96%-ного этилового спирта и 20 мл эфира. Добавить 2-3 капли фенолфталеина и титруйте 0,1 Н гидроксидом калия.

Контроль готовится так же, как и эксперимент, за исключением того, что его сразу титруют без инкубации.

Определение активности уреазы

Фермент уреазы расщепляет мочевины на диоксид углерода и аммиак.



Реактивы: семена сои и арбуза, 1%-ный раствор мочевины, фенолфталеин.

Ход работы. Взять 5 г ядер семян сои или арбуза и хорошо размолоть их в фарфоровой ступке до образования муки. Затем взять 2 пробирки и добавить в каждый по 1 г муки из семян сои или арбуза. Добавить 1 мл воды к первой пробирке и 1 мл 1%-ного раствора мочевины ко второй пробирке. Растворы инкубируют при 40 °С в течение 15 мин. Затем к обоим растворам добавить 1-2 капли фенолфталеина. Среда во втором растворе является щелочной средой из-за аммиака, образующегося под действием фермента, и имеет розовый цвет.

Ферментативный гидролиз белка

Пепсин - самый важный протеолитический фермент, который вызывает изменения белков в желудке и содержится в желудочном соке. Клетки слизистой оболочки желудка вырабатывают пепсиноген, пепсиноген превращается в активный протеолитический фермент - пепсин - под действием соляной кислоты желудочного сока. Оптимальная концентрация ионов водорода для пепсина - pH -1,5-2,5. В кислой среде (pH-1,5-2,5) расщепляет белки на гидролитические пептоны. Внутри белковой молекулы пепсин разрывает пептидные связи между ними. Пепсин разрывает связи, образованные в основном аминокетонами ароматических аминокислот и пептидными связями, такими как Ala-Ala, Ala-Ser.

Клетки слизистой оболочки желудка вырабатывают пепсиноген, превращение пепсиногена в пепсин в физиологических

условиях является автокаталитическим процессом. Молекулярная масса пепсиногена составляет 42500, а пепсина - 34500. Во время активации из пепсиногена высвобождается 6 полипептидов.

Таким образом, соляная кислота создает оптимальные условия для действия пепсина. Кроме того, под действием этой кислоты белки набухают и денатурируются, что облегчает пищеварение. Переваривание белков под действием пепсина наблюдается на примере фибрина, т.е. под действием пепсина образуется водорастворимый пептон.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; водяная баня; пипетка 5 мл.

Реактивы. 1. Фибрин. 2. 0,1% - ный раствор пепсина в 0,2%-ной соляной кислоте. 3. 0,25%-ный раствор соляной кислоты. 4. 10%-ный раствор карбоната натрия. 5. 1%-ный раствор медного купороса. 6. 10%-ный раствор гидроксида натрия.

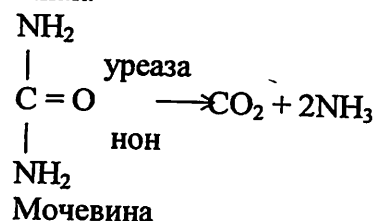
Ход работы. Взять четыре пробирки, в первую добавить 4 мл раствора соляной кислоты, во вторую - 4 мл раствора пепсина соляной кислоты, в третью - 4 мл с содой нейтрализованного раствора пепсина в соляной кислоте, а в четвертую - 4 мл кипяченого и охлажденного раствора пепсина в соляной кислоте.

Каждую пробирку заполняют небольшими кусочками фибрина, затем все пробирки одновременно помещают в водяную баню при 37-40 °С. Через 30 минут проверяется результат реакций, в первой пробирке фибрин набухает под действием соляной кислоты, во второй пробирке видно, что фибрин растворяется после инкубации под действием раствора пепсина в соляной кислоте. Фибрин в третьей пробирке не изменяется, поскольку пепсин не активен в нейтральной среде. Фибрин в четвертой пробирке набухает под действием соляной кислоты, потому что при кипячении пепсин теряет свое биологическое состояние.

Жидкости во всех растворах фильтруют, с каждым фильтратом проводят реакцию биурета и на основании полученных данных делают заключение.

Определение активности уреазы

Фермент уреазы расщепляет мочевины на диоксид углерода и аммиак.



Реактивы: семена сои и арбуза, 1%-ный раствор мочевины, фенолфталеин.

Ход работы. Взять 5 г ядер семян сои или арбуза и хорошо разомнуть их в фарфоровой ступке до образования муки. Затем взять 2 пробирки и добавить в каждый по 1 г муки из семян сои или арбуза. Добавить 1 мл воды к первой пробирке и 1 мл 1%-ного раствора мочевины ко второй пробирке. Растворы инкубируют при 40 °С в течение 15 мин. Затем к обоим растворам добавить 1-2 капли фенолфталеина. Среда во втором растворе является щелочной средой из-за аммиака, образующегося под действием фермента, и имеет розовый цвет.

Ферментативный гидролиз белка

Пепсин - самый важный протеолитический фермент, который вызывает изменения белков в желудке и содержится в желудочном соке. Клетки слизистой оболочки желудка вырабатывают пепсиноген, пепсиноген превращается в активный протеолитический фермент - пепсин - под действием соляной кислоты желудочного сока. Оптимальная концентрация ионов водорода для пепсина - pH -1,5-2,5. В кислой среде (pH-1,5-2,5) расщепляет белки на гидролитические пептоны. Внутри белковой молекулы пепсин разрывает пептидные связи между ними. Пепсин разрывает связи, образованные в основном аминоклассами ароматических аминокислот и пепидными связями, такими как Ala-Ala, Ala-Ser.

Клетки слизистой оболочки желудка вырабатывают пепсиноген, превращение пепсиногена в пепсин в физиологических

условиях является автокаталитическим процессом. Молекулярная масса пепсиногена составляет 42500, а пепсина - 34500. Во время активации из пепсиногена высвобождается 6 полипептидов.

Таким образом, соляная кислота создает оптимальные условия для действия пепсина. Кроме того, под действием этой кислоты белки набухают и денатурируются, что облегчает пищеварение. Переваривание белков под действием пепсина наблюдается на примере фибрина, т.е. под действием пепсина образуется водорастворимый пептон.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; водяная баня; пипетка 5 мл.

Реактивы. 1. Фибрин. 2. 0,1% - ный раствор пепсина в 0,2%-ной соляной кислоте. 3. 0,25%-ный раствор соляной кислоты. 4. 10%-ный раствор карбоната натрия. 5. 1%-ный раствор медного купороса. 6. 10%-ный раствор гидроксида натрия.

Ход работы. Взять четыре пробирки, в первую добавить 4 мл раствора соляной кислоты, во вторую - 4 мл раствора пепсина соляной кислоты, в третью - 4 мл с содой нейтрализованного раствора пепсина в соляной кислоте, а в четвертую - 4 мл кипяченого и охлажденного раствора пепсина в соляной кислоте.

Каждую пробирку заполняют небольшими кусочками фибрина, затем все пробирки одновременно помещают в водяную баню при 37-40 °С. Через 30 минут проверяется результат реакций, в первой пробирке фибрин набухает под действием соляной кислоты, во второй пробирке видно, что фибрин растворяется после инкубации под действием раствора пепсина в соляной кислоте. Фибрин в третьей пробирке не изменяется, поскольку пепсин не активен в нейтральной среде. Фибрин в четвертой пробирке набухает под действием соляной кислоты, потому что при кипячении пепсин теряет свое биологическое состояние.

Жидкости во всех растворах фильтруют, с каждым фильтратом проводят реакцию биурета и на основании полученных данных делают заключение.

Определение активности фермента тирозиназы

Фермент тирозиназа - это фермент, который катализирует окислительно-восстановительные реакции и широко распространен в растениях. Они играют важную роль в образовании цветных веществ меланинов в растительных продуктах.

Реактивы: картофель, 0,1%-ный раствор тирозина (0,1 г тирозина растворяют в 100 мл 0,01 Н раствора Na_2CO_3 на медленном огне).

Ход работы. Картофель измельчить на терке и отжать сок через 2–3 слоя марли. Добавить в две пробирки по 1 мл картофельного сока. В первую пробирку добавить 2–3 капли воды, ко второй пробирке добавить 2–3 капли 0,5%-ного раствора тирозина. Жидкость в растворе хорошо перемешать и инкубировать при 40 °С в течение 60 мин. Время от времени растворы 3–4 раза хорошо перемешать. Со временем в растворе, в который добавлен тирозин, образуется черный цвет. Этот цвет характерен для меланина, который образуется из тирозина под действием фермента тирозиназы.

Определение активности фермента фосфатазы

Фермент фосфатаза широко распространен в растительном мире и играет важную роль в метаболическом процессе. Этот фермент относится к классу гидролаз и участвует в гидролизе сложных эфиров фосфорной кислоты.

Ферменты фосфатазы, обнаруженные в разных частях хлопка, делятся на «щелочные фосфатазы» (оптимум pH выше 8) и «кислые фосфатазы» (оптимум pH ниже 6), в зависимости от их воздействия в различных средах.

Реактивы: раствор трис-буфера (см. Приложение), 0,05%-ный раствор глицерофосфата натрия, 10% -ный раствор трихлоруксусной кислоты.

Ход работы. 1–3 г экстрагированных (3–5 суток) семян экстрагируют и измельчают в фарфоровой ступке с помощью 1–5 мл трис-буфера (pH -5,5 или pH- 9,0) до образования однородной массы. Полученный гомогенат центрифугируют 10 минут при скорости 1500–3000 оборотов в минуту. Затем объем -

центрифугата увеличивают до 10 мл. Этот раствор является источником фермента фосфатазы.

Взять 2 пробирки, по 1 мл буферного раствора и 1 мл 0,05%-ного раствора глицерофосфата натрия. В первую пробирку добавить 2 мл раствора фермента и поместить на водяную баню при 37 °С на 30 минут. Ко второй пробирке добавить 2 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и добавить 2 мл раствора фермента. Второй раствор тоже поместить в водяную баню. По истечении времени к первому раствору добавить 2 мл 10%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Обе пробирки затем центрифугируют при 3000 об / мин в течение 10 минут. Количество фосфора в центрифугате определяется колориметрическим методом. Разница в количестве фосфора в опытном и контрольном растворах является признаком активности фермента.

Контрольные вопросы

1. Общее понятие о ферментах.
2. Отличие биологических катализаторов от неорганических.
3. Строение ферментов.
4. Что такое активный центр ферментов?
5. Коферменты и их функции.
6. Действие температуры на активность ферментов.
7. Как действует pH среда на ферменты?
8. Какие соединения являются активаторами ингибиторами ферментов?
9. Приведите примеры на специфичность действия ферментов.
10. Механизм ингибирования ферментов.
11. Одно- и двухкомпонентные ферменты.
12. Понятие о классификации ферментов и коферментов.

ГЛАВА VIII. ВИТАМИНЫ

Ключевые слова: родопсин, ретинол, токоферол, кальцитанин, фолевая кислота, биотин, никотинамид, флавинамидадениндинуклеотид, водорастворимые витамины, жирорастворимые витамины

Витамины - это вещества с небольшой молекулярной массой, относящиеся к разным классам органических соединений. Витамины участвуют в важнейших физиологических и биохимических процессах животных, микроорганизмов, растений. Многие из них относятся к простетической группе двухкомпонентных ферментов - коферментов.

Полное отсутствие каких-либо витаминов в организме приводит к авитаминозу, то есть заболеванию всего организма с симптомами, характерными для отсутствия того или иного витамина. Часто встречаются случаи частичного дефицита витаминов - гиповитаминозы, которые могут быть первичными и вторичными. При избыточном потреблении витаминов происходит интоксикация организма, которая называется гипервитаминозом.

В настоящее время некоторых витаминов и их разновидностей приближается к тридцати. Витамины делятся на две основные группы, основанные исключительно на их растворимости, в зависимости от различных компонентов пищи; делятся на водорастворимые и жирорастворимые витамины.

В группу жирорастворимых витаминов входят витамины А, D, Е и К.

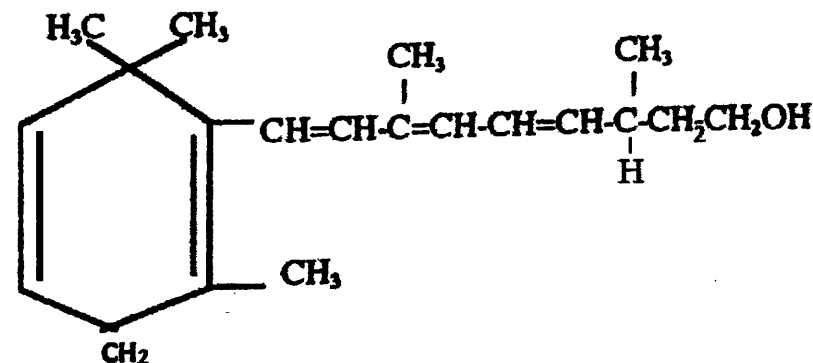
К группе водорастворимых витаминов группа витаминов В: В₁ - тиамин, В₂ - рибофлавин, РР-никотинамид, В₆ - пиридоксин, N - биотин, пантотинат и парааминобензойная кислота, холин, инозитол, фолиевая кислота, В₁₂ - цианкобаламин, В₁₅ - пангамат. : Витамин С (аскорбиновая кислота); Включены витамины Р.

Жирорастворимые витамины. В эту группу витаминов входят витамины групп А, D, Е, К и другие. Витамины включают ряд соединений со схожими биологическими эффектами, химическая структура которых близка каждой группе. Например, витамины А₁, А₂ и др. к группе витамина А; 4 витамина к группе витамина Е; в группе витамина D относится около 10 витаминов.

Витамины группы А

Витамин А содержится в тканях животных, особенно в печени. Растения вообще не содержат витамин А, но они содержат каротин, жирорастворимое соединение желтого цвета, которое в организме животного превращается в витамин А. Они расщепляются на слизистой оболочке кишечника животного, превращаются в витамин А, а затем накапливаются в печени.

При отсутствии витамина А в рационе могут наблюдаться характерные симптомы авитаминоза, а именно прекращение роста, сухость роговицы, ксерофтальмия, а затем ее размягчение, некротический распад - появление кератомалиции. Витамин А является структурным компонентом биологических мембран, стимулирует биосинтез белков в печени, участвует в синтезе мукополисахаридов, участвует в развитии костной ткани и светочувствительных процессах.



Витамин А (ретинол)

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки.

Реактивы. 1. Рыбий жир. 2. Хлороформ. 3. Насыщенный SbCl_3 (33% раствор). 4. Концентрированная серная кислота.

Ход работы. 1. Реакция с хлоридом сурьмы (III). В пробирку добавляют несколько капель рыбьего жира, растворяют в 2 мл хлороформа и добавляют 2 мл раствора насыщенного хлорида сурьмы (III). Образовавшийся в результате реакции продукт становится синим.

2. Реакция с серной кислотой. В раствор добавить 3-4 капли рыбьего жира, растворить 20-25 капель в хлороформе и взболтать с добавлением 1 капли концентрированной серной кислоты. Результат реакции сине-фиолетовый оттенок.

Определение общих каротиноидов

Общие каротиноиды определяют по методу Рачевского.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками, пипетки; фарфоровая посуда; водяная баня 40 °С, бюретка.

Реактивы. 1. Сыворотка крови или опухолевый материал. 2. Алкоголь. 3. Петропейиновый эфир.

Ход работы. Добавить в делительную воронку 0,1 мл сыворотки крови и 2 мл спирта и перемешать, затем добавить 2 мл петролейного эфира, встряхнуть и добавить 2 мл воды по каплям, пока не произойдет разделение на два слоя. Затем водный слой полностью отделяют, и объем петролейно-эфирного слоя доводят ровно до 2 мл. Затем этот раствор выливают в микробюретку и по каплям капают в фарфоровую посуду, помещенную на водяную баню при 40 °С. Капли добавляют до тех пор, пока в посуде не образуется окрашенное кольцо. Когда образуется цветное кольцо, количество каротина в осадке составляет 0,05 мкг. Также определяется количество петролейного эфира в бюретке. Если для придания кольцу специфичности используется 0,5 мл эфирного раствора, то общее количество каротина в 100 мл сыворотки будет следующим:

$$\frac{0,05 \cdot 2 \cdot 100}{0,5 \cdot 1,0} = 200 \text{ мкг} (0,2 \text{ мкг}\%)$$

Витамины группы D

По химической структуре витамины группы D (кальциферолы) представляют собой стероидоподобные соединения, которые широко распространены в природе и обладают наивысшей биологической активностью (D₂ и D₃).

Эргостерин и холестерин являются провитаминами витаминов D₂ и D₃. Витамины в организме животного синтезируются из

стеринов под воздействием ультрафиолета. Недостаток витамина D в организме приводит к рахиту. Потому что он нарушает метаболизм фосфора и кальция в костной ткани. Это нарушает всасывание кальция и фосфора в желудочно-кишечном тракте. В результате из-за отсутствия в кости неорганических солей она размягчается и теряет форму.

При облучении эргостерола образуется ряд изомеров стерина. Один из них - кальциферол, который оказывает сильное действие против рахита.



Цветные реакции витаминов группы D

Реактивы. 1. Анилин. 2. Концентрированная соляная кислота. 3. Раствор SbCl₃ в 21-23%-ном хлороформе. 4. Уксусный ангидрид. 5. Раствор обогащенного рыбьего жира в 10%-ном хлороформе. 6. Раствор брома в хлороформе.

Ход работы. К 1 мл рыбьего жира добавляют 0,5 мл концентрированной соляной кислоты с 4-5 мл анилина. Когда эмульсия становится желтой, она нагревается и становится красной.

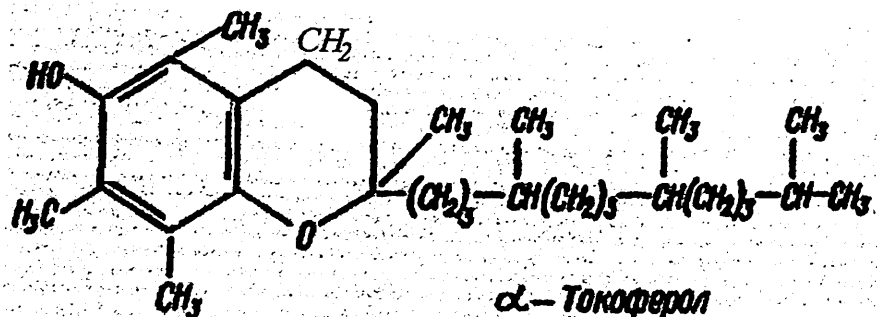
Реакция с хлоридом сурьмы (III). К сухому раствору добавляют 3-6 мл раствора рыбьего жира в хлороформе, 8-10 капель уксусного ангидрида и такое же количество SbCl₃ в растворе хлороформа. Жидкость желтого или оранжевого цвета.

Реакция с бромом. В раствор добавляют 8-10 капель рыбьего жира и 4-8 капель раствора брома в хлороформе. Через некоторое время образуется хорошо различимый зеленый или сине-зеленый цвет.

Витамин Е (токоферол)

В природе в большом количестве присутствуют токоферолы (витамин Е), α , β и γ токоферолы которые имеют биологическое значение.

Все они сохраняют метильную и гидроксильную группы, а также боковую фитольную группу в бензольном кольце хромовой структуры.

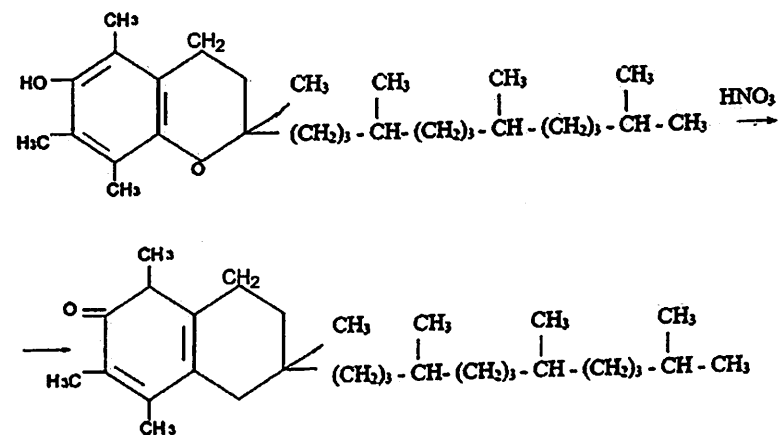


Витамин Е содержится в растениях, особенно в кукурузе, хлопчатнике, пшенице и шиповнике, и его много в их зеленых частях, а также в семяпочках растений. Витамин Е называют репродуктивным витамином. Витамин Е не растворяется в воде. Он особенно устойчив к нагреванию, а также к кислотам, легко обнаруживается и повреждается ультрафиолетом. Это, в свою очередь, приводит к различным патологическим изменениям половых органов мужчин и женщин. Когда животным не хватает витамина Е, нарушается их метаболизм белков, жиров и углеводов. Одним из характерных симптомов авитаминоза Е является явление дистрофии, наблюдаемое в мышцах сфинктера. В этом случае исчезают линии мускулов, волокна истончаются, они разрушаются и отмирают, и в результате возникают определенные нарушения в их обмене веществ. Витамин Е защищает многие соединения от окисления и используется в качестве антиоксидантов.

Цветные реакции витамина Е

1. Реакция с азотной кислотой.

Принцип метода. Витамин Е взаимодействует с концентрированной азотной кислотой с образованием О-токоферилхинона из α -токоферола, что приводит к красному цвету.



О-токоферилхинон

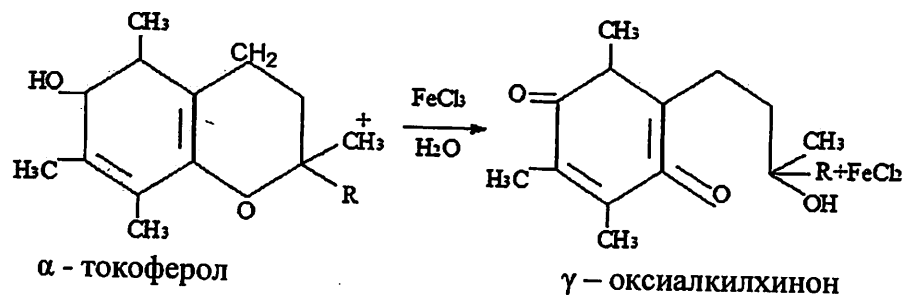
Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки; водяная баня.

Реактивы. 1. Концентрированная азотная кислота. 2. Раствор витамина Е в жире. 3. Дистиллированная вода.

Ход работы. Две пробирки наполнены 2-3 каплями раствора витамина Е в масле. В первую пробирку добавляют 1-2 мл дистиллированной воды, а во вторую пробирку такое же количество концентрированной азотной кислоты. Обе пробирки нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут. Масляный слой витамина в растворе, содержащем азотную кислоту, окрашивается в красный или желто-красный цвет.

2. Реакция с хлоридом железа. Когда токоферолы окисляются хлоридом железа, то есть, III-хлорид железа восстанавливается до II-хлорида железа, железо образует комплексный ион ортофенантропина с валентным ионом II, в результате чего раствор

становится красным. Когда токоферолы окисляются хлоридом железа, пирановое кольцо разрывается и образуется оксиалкилхинон.

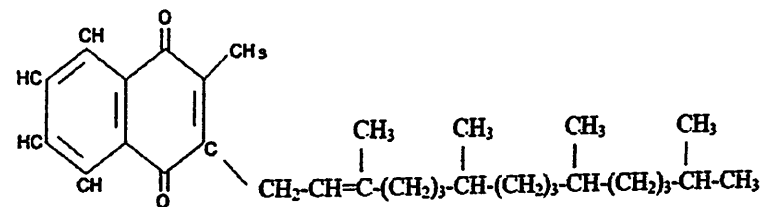


Реактивы. 1. Раствор витамина Е в жире. 2. 0,2%-ный спиртовой раствор хлорида железа. 3. Спиртовой раствор 0,5%-ного ортофенантролина.

Ход работы. К раствору добавляют 1-2 мл раствора витамина Е в масле, 1 мл раствора ортофенантролина и каплю раствора хлорида железа до образования красной окраски.

Витамин К

Когда в организме не хватает витамина К, кровь перекачивается между кожей и мышцами (кровоизлияния), и скорость свертывания крови снижается. Дефицит витамина К в основном характеризуется уменьшением количества протромбина в крови. При авитаминозе прекращается синтез в печени ряда других белков, участвующих в свертывании крови. Если животным с дефицитом витамина К вводить витамины, количество протромбина в плазме шахты увеличивается, и геморрагические явления исчезают. Витамин К в организме животного не синтезируется. Синтезируется в микроорганизмах и растениях. Особенно их много в листьях люцерны, шпината, капусты.



Витамин К₁ (2-метил-3-фитил-1,4-нафтахинон)

Витамины группы К являются производными 2-метил-1,4-нефтохинонов.

Качественные реакции витамина К

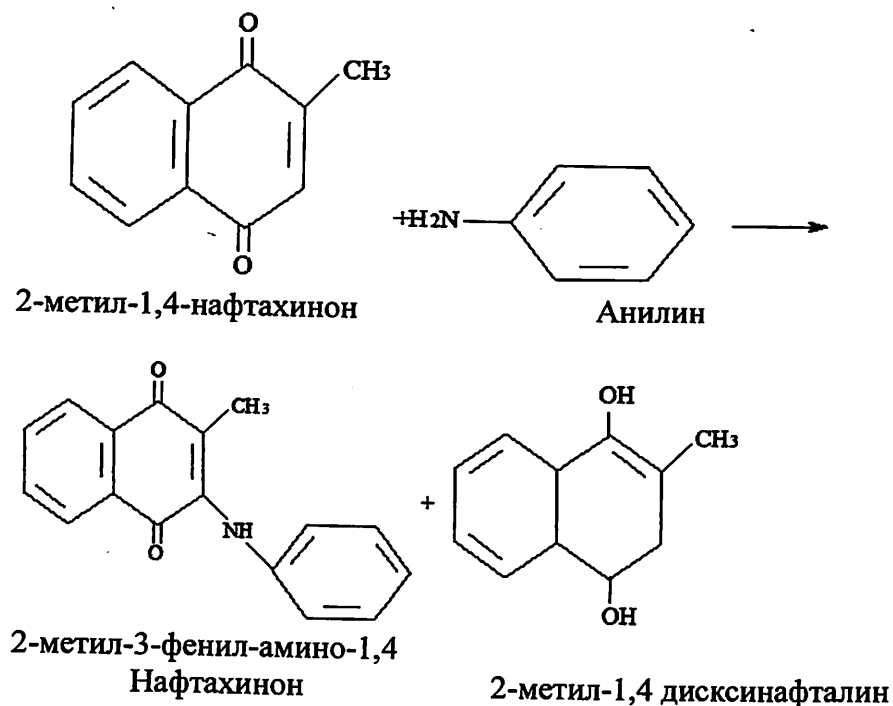
Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки.

Реактивы. 1. 0,1%-ный раствор викасола в спирте. 2. Синтетические аналоги витамина К. 3. 0,25%-ный раствор цистеина. 4. 10%-ный раствор гидроксида натрия. 5. 1%-ный раствор диэтилового эфира. 6. 1%-ный раствор гидроксида калия. 7. Анилин.

1) Реакция с цистеином. Добавить в раствор 1 мл 0,1%-ного спиртового раствора викасола. Затем добавить 2 капли 0,25%-ного раствора цистеина и 2 капли 10%-ного смеси гидроксида натрия. В результате получится желтый цвет.

2) Реакция с диэтимелоновым эфиром. Раствор добавляют к 2 мл спиртового раствора 0,1%-ного викасола и смешивают с 0,5 мл 1%-ном эфиром диэтилмалона и 0,1 мл 1%-ного гидроксида калия. Реакция приобретает пурпурно-красный цвет.

3) Реакция с анилином. Добавить к раствору 2 мл 0,2%-ного раствора 2-метил-1,4-нафтахинона и 1 мл раствора анилина и перемешать. Смесь становится красной.



Водорастворимые витамины

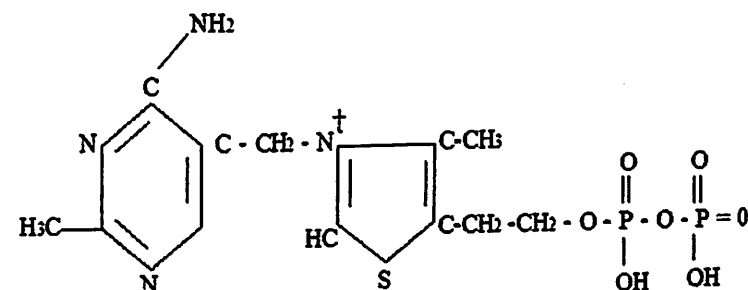
В группу водорастворимых витаминов входят комплекс витаминов В, витамины С и Р. Состав и свойства этих соединений различны, и их общая биологическая роль сходна, они действуют как коферменты в метаболических ферментных системах.

Витамин В₁

Этот витамин (тиамин) содержит серу (греч. Thio) и аминогруппу, поэтому его называют тиамин. Наиболее характерными и специфическими симптомами авитаминоза витамина В₁ являются: полиневрит, нарушение сердечной функции, нарушение водного обмена, нарушение секреторной функции желудочно-кишечного тракта.

Витамин В₁ не встречается в тканях животных в свободной форме, он находится в форме пиррофосфата тиамина. Свободный

витамин, абсорбируемый в кишечнике, фосфорилируется в тканях с образованием тиаминпиррофосфата, образуя кофермент карбоксилазы, фермента кокарбоксилазы, который катализирует декарбоксилирование пировиноградной кислоты.



Пиррофосфат тиамина (кокарбоксилаза)

Витамин В₁ часто встречается в растениях (неочищенный рис, гороховая мука и т. д.). Витамин В₁ содержится в дрожжах, в которых тиамин присутствует в форме пиррофосфатного эфира.

У животных витамин В₁ в больших количествах содержится в печени, почках, сердечной мышце и головном мозге.

Качественная реакция витамина В₁. Под действием диазобензолсульфокислоты тиамин образует соединение, которое приобретает розовый или желто-розовый цвет.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки.

Реактивы. 1. Молоко. 2. 0,001% - ный водный раствор витамина В₁. 3. 5%-ный раствор гидроксида натрия. 4. А-раствор (0,9 г серной кислоты в 100-миллилитровой колбе растворяют в 9 мл концентрированной соляной кислоты и доливают воду до метки колбы. Раствор хранят в темной емкости. 5. Б-раствор (5%-ный раствор нитрата натрия). 6. Диазореактивный (это подготовленный перед реакционным тестом) мерную колбу на 50 мл помещают в ледяную баню, к 7,5 мл раствора В по каплям добавляют 1,5 мл раствора А, и его можно использовать через 15 минут.

Ход работы. Залить в раствор 2 мл гидроксида натрия и 3 мл диазореактивного раствора. В полученную смесь добавить 24 мл молока. В результате раствор становится желто-розовым.

Витамин В₂

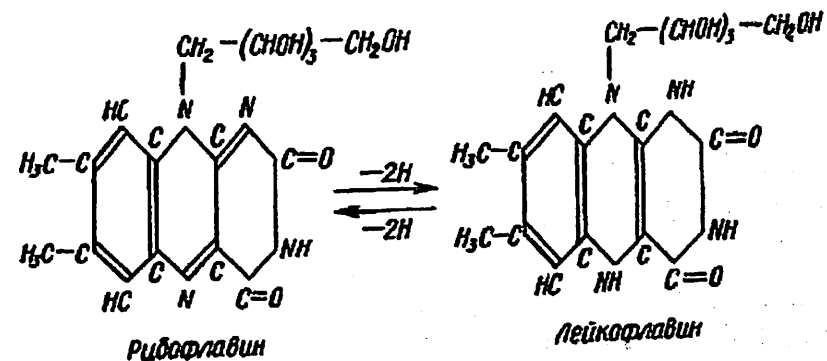
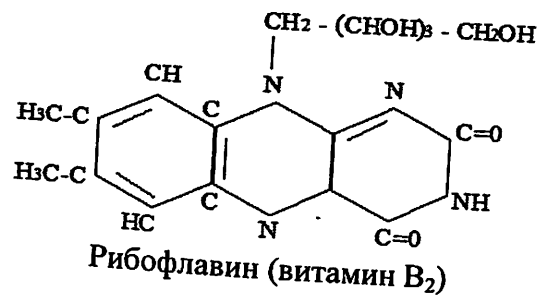
Витамин В₂ (рибофлавин) входит в состав активных групп ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах в организме, обеспечивая перенос атомов водорода от субстратов к системе цитохрома или молекулярному кислороду. Эти ферменты участвуют в катализе реакций окисления органических кислот, аминокислот и других соединений.

Витамин В₂ основан на диметилизоаллоксацине и связан с остатком риботального спирта, поэтому его можно назвать рибофлавином или 6,7-диметил-9 (1-d-рибитил) изоальпоксазином.

Рибофлавин часто встречается в продуктах растительного и животного происхождения. Рибофлавиновый авитаминоз проявляется прекращением роста организма, воспалением кожи - дерматитом, васкуляризацией роговицы (разрастание кровеносных сосудов в роговице), выпадением волос, истончением пульса, параличом нервной системы.

Качественные реакции рибофлавина

Обратный захват рибофлавина. Рибофлавин легко окисляется и восстанавливается. Когда он восстанавливается водородом, образуется бесцветное соединение, лейкофлавин, а при окислении оно превращается в рибофлавин.



Реактивы. 1. 0,015% - ный раствор рибофлавина (хранится в емкостях, окрашенных в черный цвет). 2. Концентрированная соляная кислота. 3. Металл цинка.

Ход работы. Взять 1 мл раствора рибофлавина и добавить к раствору 10 капель концентрированной соляной кислоты и кусок цинка, затем закрыть раствор пробкой. Выделяющийся водород вступает в реакцию с витамином, возвращает его и меняет цвет раствора (желтый, красный и розовый), а затем обесцвечивается.

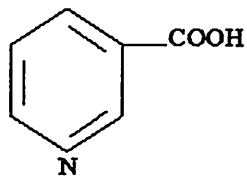
Реакция серебра с нитратом. Когда нитрат серебра подвергается воздействию нейтрального или слабокислого раствора рибофлавина (рН 6,5-7,2), образующееся соединение становится розовым или красным.

Реактивы. 1. 0,015% - ный раствор рибофлавина. 2. 0,1% - ный раствор нитрата серебра.

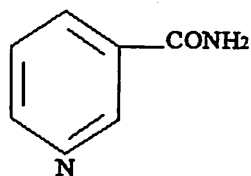
Ход работы. В раствор заливают 1 мл раствора рибофлавина и 0,5 мл раствора нитрата серебра. В результате получается розовый или красный цвет.

Витамин В₅

Никотиновая кислота или ее амид - это антипеллагрический витамин. Никотиновая кислота - это белое кристаллическое вещество, хорошо растворяющееся в воде и спирте.



Никотиновая кислота



Амид никотиновой кислоты

Недостаток в организме витамина B_5 (витамин PP, никотинимид) приводит к дерматиту, желудочно-кишечным расстройствам и воспалениям слизистых оболочек рта и языка, нарушению нервной деятельности. Этого витамина больше в дрожжах и пшеничных отрубях, в печени крупного рогатого скота и свиней. Растения и некоторые микробы, а также некоторые животные (крысы) также могут синтезировать витамин B_5 .

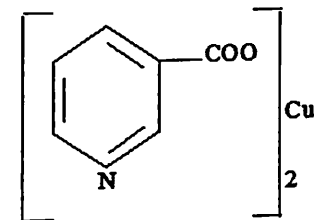
Никотиновая кислота, ее амид, играет важную роль в метаболизме. Несколько коферментных групп (НАД, НАДФ), которые катализируют тканевое дыхание, включают амиды никотиновой кислоты.

Качественные реакции витамина B_5

Реакция с ацетатом меди. Никотиновая кислота под действием солей меди в условиях уксусной кислоты образует медную соль никотиновой кислоты (синий).

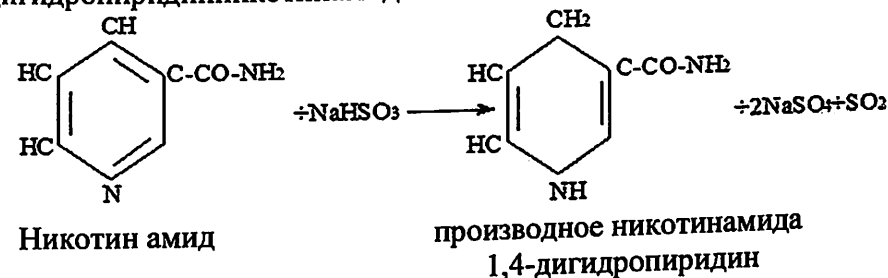
Реактивы. 1. 0,75% - ный раствор никотиновой кислоты. 2. 15% - ный раствор уксусной кислоты. 3. 5% - ный раствор ацетата меди.

Ход работы. К раствору добавить 2 мл раствора никотиновой кислоты, добавить 1 мл 15%-ного раствора уксусной кислоты и нагреть до кипения, затем добавить 1,5 мл раствора ацетата меди. В растворе сначала появляется голубоватая муть, затем образуется медная соль никотиновой кислоты.



Никотинат меди

Реакция с гидросульфитом натрия. Когда никотинамид подвергается действию гидросульфита, образуется производное 1,4-дигидропиридинникотинамида желтого цвета.



Реактивы. 1. Никотиновая кислота или амид никотиновой кислоты (в виде порошка). 2. 10% - ный раствор гидрокарбоната натрия. 3. 5% - ный раствор гипосульфита натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (приготовленный перед использованием).

Ход работы. Раствор заливается никотиновой кислотой или порошком ее амида и смешивается с 1-2 мл раствора бикарбоната натрия, затем добавляется 1-2 мл раствора гипосульфита натрия. Жидкость в растворе желтого цвета.

Витамин С

Витамин С называется L-аскорбиновой кислотой. L - аскорбиновая кислота хорошо растворяется в воде. L-аскорбиновая кислота и ее дегидроформа образуют окислительно-восстановительную систему, способную как принимать, так и отдавать атомы водорода, то есть электроны и протоны.

Дегидроформа аскорбиновой кислоты - это необратимый процесс, при котором соединения с высокой устойчивостью

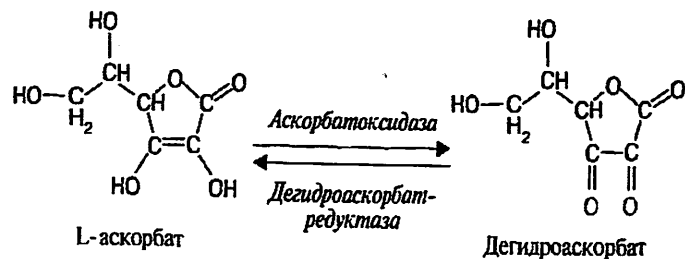
превращаются в дикетоглюконовую кислоту, что завершается окислением и разложением. Витамин С очень быстро разлагается при нагревании в нейтральной или щелочной среде в присутствии окислителей.

Витамин С синтезируется в растениях и у большинства животных (кроме людей, обезьян и морских свинок). Млекопитающие содержат 25 мг% витамина С в печени и 12 мг% в почках. Недостаток витамина С в организме животного приводит к нарушениям белкового обмена, непереносимости различных заболеваний желудочно-кишечного тракта и дыхательных путей, образованию тромбов во внутренних органах и потере зубов.

Качественные реакции витамина С

Реакция с метиленовым синим. Аскорбиновая кислота превращает метиленовый синий в бесцветное соединение (лейкоформ), которое само окисляется с образованием дегидроаскорбиновой кислоты.

Реактивы. 1. 0,01%-ный раствор метиленового синего. 2. 5%-ный раствор карбоната натрия. 3. Картофельный или капустный сок.

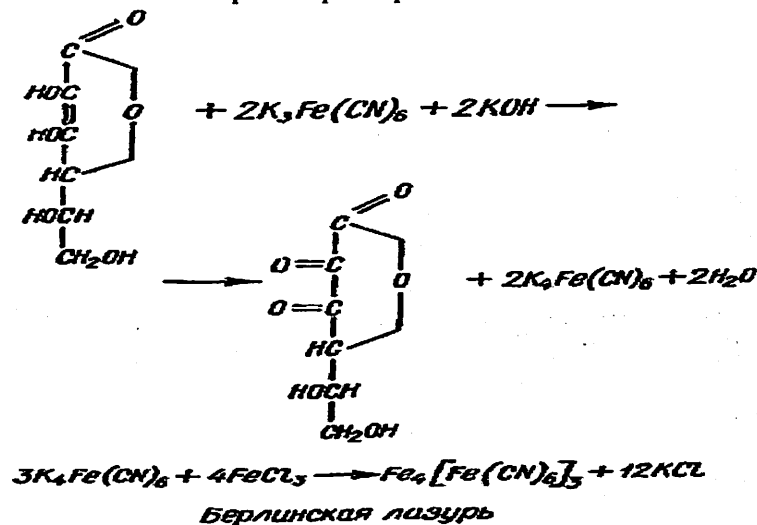


Ход работы. В растворе разогреть 1-2 мл свежеприготовленного сока картофеля или капусты, добавить 1-2 капли раствора метиленового синего и 2-3 капли раствора карбоната натрия. В результате интенсивность синего цвета снижается.

Реакция феррицианида калия с $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Аскорбиновая кислота окисляется с превращением феррицианида калия

$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ в ферроцианид калия $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ и железа ((III) - гексацианоферроат $\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) в кислых условиях с ионом трехвалентного железа, то есть образует берлинскую синь.

Реактивы. 1. Картофельный или капустный сок. 2. 5% - ный раствор феррицианида калия. 3. 5% - ный раствор гидроксида калия. 4. 1% - ный раствор хлорного железа.



Ход работы. Добавить в раствор 1 мл сока картофеля или капусты, 2 капли гидроксида калия и такое же количество раствора феррицианида калия. Затем добавить 6-8 капель 10% - ной соляной кислоты и 1-2 капли раствора хлорида железа (III). В результате получается синий или сине-зеленый осадок, образующий берлинскую синь.

Определение содержания витамина С в пищевых продуктах

Витамин С - важнейший компонент рациона животных и человека. Ниже указано количество витамина С в растительных продуктах (мг,%).

Укроп 135
Капуста 30
Лук зеленый 60

Лимон 40
Картофель свежий 35
Морковь 5

Черная смородина 300 Шиповник (во фруктах) 3000

Чтобы определить количество аскорбиновой кислоты в пище, витамин С экстрагируют разбавленными кислотами (устойчивыми к кислой среде). Затем раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола титруют. Если в экстракте содержится аскорбиновую кислоту, тогда он восстанавливает 2,6-дихлорфенолиндофенола.

После того, как все аскорбиновые кислоты в экстракте были окислены, 2,6-дихлорфенолиндофенол не может быть возвращен, и раствор становится красным (т.е. 2,6-дихлорфенолиндофенол становится синим в нейтральных условиях и красным в кислых условиях). Количество аскорбиновой кислоты в продукте рассчитывается путем определения количества 2,6-дихлорфенолиндофенола, используемого для титрования, и его нормальности.

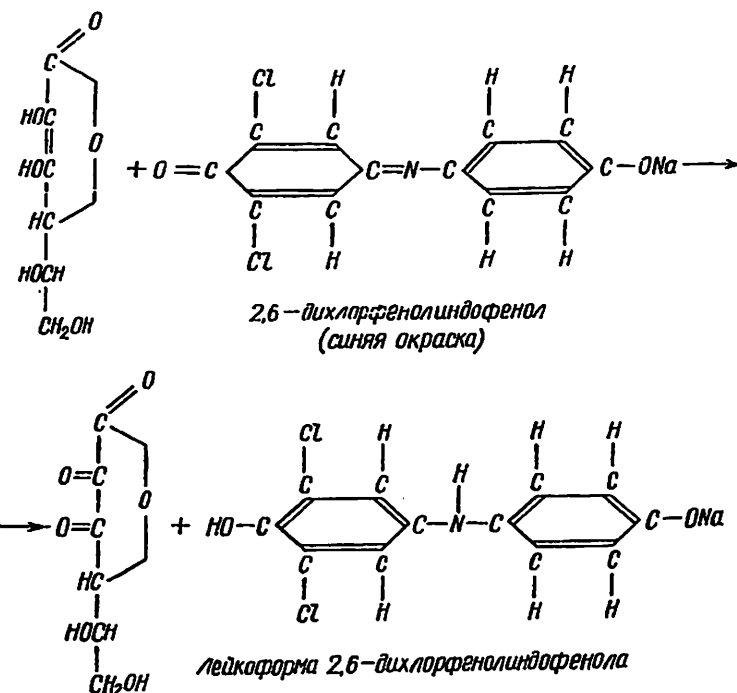
Необходимые инструменты: микробюретка; колбы по 25 и 100 мл; пипетки 1 и 10 мл; ступка; весы; воронка; фильтровальная бумага.

Реактивы. 1. 25% - ный раствор соляной кислоты. 2. 0,001 Н раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола. 3. Картофель, капуста.

Определение витамина С в картофеле. 5 г картофеля растирают в ступке с добавлением 16 мл соляной кислоты. Образовавшуюся в колбе жидкость переливают в колбу и фильтруют. Фильтрат титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до образования розовой окраски. Количество витамина С в 100 г картофеля рассчитывается по следующей формуле.

$$X = \frac{0,088 \cdot \alpha \cdot 100}{5}$$

Здесь: X - количество витамина С в 100 г продукта, мг; 0,088 - количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, мг; α - объем раствора дихлорфенолиндофенола, использованный для титрования; 5 - масса проверяемого продукта, г.



Определение количества витамина С в крахмале. 2 г кочанной капусты растирают в ступке с 10 мл уксусной кислоты, полученный экстракт процеживают. Берут 3 мл фильтрата, переносят в колбу и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розового цвета. Количество витамина С (X) в 100 г капусты определяется по следующей формуле:

$$X = \frac{0,088 \cdot \alpha \cdot 10 \cdot 100}{3}$$

Здесь: 10 - объем экстракта уксусной кислоты; α - объем раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, использованного для титрования; 3 - количество экстракта, полученного для титрования.

Определение цитрина (витамин Р)

Вещества с Р-витаминной активностью включают фенольные соединения. К ним относятся рутин, гесперидин, кварцетин и

другие. В больших количествах они содержатся в цветках и плодах растения.

Реактивы: плод лимона, 80% - ный раствор этилового спирта, 1% - ный раствор хлорида железа, концентрированный раствор серной кислоты.

Ход работы. Взять 2-5 граммов цедры лимона и измельчить в фарфоровой ступке со стеклянным порошком до образования однородной массы со спиртом. Массу промыть небольшой порцией спирта до обесцвечивания. Фильтрат довести до объема 50 или 100 мл с помощью спирта. Затем спирт в смеси отделить в трубке Вюрца. Остаток (3-5 мл) со дна пробирки вылить в фарфоровую чашку и спирт полностью выпарить на водяной бане. Затем налить в миску 3-5 мл воды и растворить остаток. Следующие реакции провести с водным раствором.

1. Добавьте к раствору 1 мл раствора и добавьте к порошку 4-5 капель раствора хлорида железа до получения зеленого цвета.

2. Добавьте в раствор 1 мл раствора. Осторожно нанесите 1 мл концентрированной серной кислоты вдоль стенки пробирки. Между двумя жидкостями образуется желтый круг.

Контрольные вопросы

1. Какое биологическое значение имеют витамины?
2. Перечислите представителей водорастворимых витаминов.
3. Биологическое значение витамина С.
4. Химический состав витамина В₁, к каким последствиям приводит его недостаток.
5. Перечислите жирорастворимые витамины.
6. Авитаминоз витамина приводит, к каким заболеваниям.
7. При каком гиповитаминозе развивается пеллагра.
8. Расскажите о биологическом значении витамина Д.
9. Биохимическое значение витамина Е.
10. В каких процессах участвует витамин С?

ГЛАВА IX. ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

Ключевые слова: органические кислоты, эфиры, фильтрат, лимонная кислота, янтарная кислота

Органические кислоты - очень распространенные вещества, содержащиеся в других важных соединениях растений, таких как углеводы и белки. Они содержатся в семенах, листьях, корнях, цветках и плодах растений. В кислых фруктах органические кислоты встречаются свободно и частично в виде кислотных солей. Некоторые растения, такие как ревень, листья и стебли хвоща, накапливают большое количество свободных органических кислот или их кислотных солей. В разных частях растений содержится разное количество органических кислот.

В семенах они составляют около 0,5%, в листьях и плодах - 8-12%. Особенно их много в фасоли, лимонах.

Количество органических кислот, содержащихся в растениях, варьируется в зависимости от типа растений, почвенно-климатических условий и других факторов. Например, минеральные удобрения, особенно его нитратные формы, вызывают увеличение количества органических кислот в растениях. Примеры органических кислот, имеющих практическое значение, включают лимонную, малатную, щавелевую и янтарную кислоты. Качество большинства сельскохозяйственных продуктов определяется количеством содержащихся в них органических кислот.

Разделение органических кислот из растений основано на их растворимости в воде, спирте и эфире. Наиболее удобный способ разделения органических кислот - извлечение их в эфире, подкисленном минеральными кислотами.

Определение общей кислотности растений

Определение общей или титруемой кислотности растений основано на титровании всех свободных органических кислот и их солей в щелочных экстрактах. Это достигается за счет использования определенных индикаторов. Обычно результат титрования выражается в процентах от основной органической кислоты, обычно содержащейся в этом объекте.

Ход работы. 10-20 г растительного материала (листьев, плодов, семян или других органов) экстрагируют и измельчают в фарфоровой ступке с 2-10 мл воды с использованием стеклянного порошка до образования однородной массы. Полученную массу переливают в мерную колбу на 200 мл с использованием 50 мл воды, заливают дистиллированной водой до отметки и оставляют на 1 час. По истечении этого времени 50 мл экстракта удаляют из фильтра и помещают в колбу на 100 мл. Добавить в колбу несколько капель спиртового раствора фенолфталеина и титровать 0,1 Н раствором гидроксида натрия до образования светло-розового цвета. Если фильтрат окрашен, титрование тимолфталеином дает хорошие результаты. Он вибрирует, пока не приобретет синий цвет. Цветные фильтры также можно титровать фенолфталеином, но не титровать до образования розового цвета, а зеленым или бесцветным, пока цвет не изменится полностью. Изменение цвета при нейтрализации хорошо видно. Рекомендуется титровать окрашенные экстракты по сравнению с соседней пробиркой, наполненной таким же объемом фильтрата и наполненной фенолфталеином.

Если фильтраты слишком темные и их невозможно титровать по изменению цвета, то титрование можно проводить с помощью рН-метров. Потенциометрическое титрование прекращается при достижении значения рН. Общая кислотность (кислотность) тестируемого растительного материала выражается как количество 0,1 Н щелочи, использованное для титрования 100 г сухого растительного материала, или миллиграммовое количество органической кислоты, обнаруженной в большом количестве в этом продукте.

$$X = \frac{a \cdot T \cdot K \cdot V \cdot 100}{H \cdot 50}$$

X-кислотность исследуемого растительного материала, в %, а-количество 0,1 Н едкого натрия, использованного для титрования, мл; T-коррекция титрования. V - общий объем экстракта, мл. Количество фильтрата, полученного для титрования, составляет 50 мл. H - масса растительного сырья, г. K - Расчетный коэффициент органических кислот.

Например. 20 г экстракта растительного материала добавляли к 200 мл. Для титрования получали 50 мл прозрачного фильтрата. Для этого было использовано 3,5 мл щелочи. Титр щелочи 0,9900. Кислотность определяли по яблочной кислоте. Тогда приведенная выше формула будет иметь следующий вид.

$$X = \frac{3,50 \cdot 0,9900 \cdot 200 \cdot 0,0067 \cdot 100}{20,0 \cdot 50} = 0,469\%$$

Реактивы. 0,1 Н раствор едкого натрия, фенолфталеиновый индикатор (1 г фенолфталеина растворяют в 60 мл этилового спирта и сливают с водой).

Определение лимонной кислоты

Лимонная кислота - обычная органическая кислота группы трикарбонов в растениях. Лимонная кислота накапливается в плодах и листьях растений. Это особенно часто встречается на листьях хлопка. Извлечение лимонной кислоты из листьев хлопчатника в Узбекистане разработал академик О. Садиков.

Ход работы. В растительном сырье соки лимонной кислоты разделяют следующим образом. Взять 50-100 г (5-10 г сухого) растительного сырья, растолочь в фарфоровой ступке до образования однородной массы и перелить в колбу объемом 250 мл, в которую наливают 100 мл дистиллированной воды. Затем залить 10 мл (1:10) 20% раствора серной кислоты и настаивать 15-30 минут, доведя общий объем до 200 мл дистиллированной водой. Смесь в колбе хорошо встряхнуть и оставить на 2 часа. По истечении времени добавить 5-10 мл 5%-ного раствора фосфорвольфрамата или метафосфатной кислоты, перемешать, центрифугировать или перенести из фильтра в сухую колбу (250 мл). Весь объем довести до линии с дистиллированной водой.

Определение содержания лимонной кислоты

Взять 50 мл фильтрата или центрифугата, приготовленного в указанной выше работе, перелить в колбу на 200 мл и добавьте 5 мл 30% - ного раствора бромида калия, 10 мл раствора серной кислоты 1:1, смешанного с водой. Смесь хорошо взбалтывать и в

Ход работы. 10-20 г растительного материала (листьев, плодов, семян или других органов) экстрагируют и измельчают в фарфоровой ступке с 2-10 мл воды с использованием стеклянного порошка до образования однородной массы. Полученную массу переливают в мерную колбу на 200 мл с использованием 50 мл воды, заливают дистиллированной водой до отметки и оставляют на 1 час. По истечении этого времени 50 мл экстракта удаляют из фильтра и помещают в колбу на 100 мл. Добавить в колбу несколько капель спиртового раствора фенолфталеина и титровать 0,1 Н раствором гидроксида натрия до образования светло-розового цвета. Если фильтрат окрашен, титрование тимолфталеином дает хорошие результаты. Он вибрирует, пока не приобретет синий цвет. Цветные фильтры также можно титровать фенолфталеином, но не титровать до образования розового цвета, а зеленым или бесцветным, пока цвет не изменится полностью. Изменение цвета при нейтрализации хорошо видно. Рекомендуется титровать окрашенные экстракты по сравнению с соседней пробиркой, наполненной таким же объемом фильтрата и наполненной фенолфталеином.

Если фильтраты слишком темные и их невозможно титровать по изменению цвета, то титрование можно проводить с помощью рН-метров. Потенциометрическое титрование прекращается при достижении значения рН. Общая кислотность (кислотность) тестируемого растительного материала выражается как количество 0,1 Н щелочи, использованное для титрования 100 г сухого растительного материала, или миллиграммовое количество органической кислоты, обнаруженной в большом количестве в этом продукте.

$$X = \frac{a \cdot T \cdot K \cdot V \cdot 100}{H \cdot 50}$$

X-кислотность исследуемого растительного материала, в %, а-количество 0,1 Н едкого натрия, использованного для титрования, мл; Т-коррекция титрования. V - общий объем экстракта, мл. Количество фильтрата, полученного для титрования, составляет 50 мл. Н - масса растительного сырья, г. К - Расчетный коэффициент органических кислот.

Например. 20 г экстракта растительного материала добавляли к 200 мл. Для титрования получали 50 мл прозрачного фильтрата. Для этого было использовано 3,5 мл щелочи. Титр щелочи 0,9900. Кислотность определяли по яблочной кислоте. Тогда приведенная выше формула будет иметь следующий вид.

$$X = \frac{3,50 \cdot 0,9900 \cdot 200 \cdot 0,0067 \cdot 100}{20,0 \cdot 50} = 0,469\%$$

Реактивы. 0,1 Н раствор едкого натрия, фенолфталеиновый индикатор (1 г фенолфталеина растворяют в 60 мл этилового спирта и сливают с водой).

Определение лимонной кислоты

Лимонная кислота - обычная органическая кислота группы трикарбонов в растениях. Лимонная кислота накапливается в плодах и листьях растений. Это особенно часто встречается на листьях хлопка. Извлечение лимонной кислоты из листьев хлопчатника в Узбекистане разработал академик О. Садиков.

Ход работы. В растительном сырье соки лимонной кислоты разделяют следующим образом. Взять 50-100 г (5-10 г сухого) растительного сырья, растолочь в фарфоровой ступке до образования однородной массы и перелить в колбу объемом 250 мл, в которую наливают 100 мл дистиллированной воды. Затем залить 10 мл (1:10) 20% раствора серной кислоты и настаивать 15-30 минут, доведя общий объем до 200 мл дистиллированной водой. Смесь в колбе хорошо встряхнуть и оставить на 2 часа. По истечении времени добавить 5-10 мл 5%-ного раствора фосфорвольфрамата или метафосфатной кислоты, перемешать, центрифугировать или перенести из фильтра в сухую колбу (250 мл). Весь объем довести до линии с дистиллированной водой.

Определение содержания лимонной кислоты

Взять 50 мл фильтрата или центрифугата, приготовленного в указанной выше работе, перелить в колбу на 200 мл и добавить 5 мл 30% - ного раствора бромиды калия, 10 мл раствора серной кислоты 1:1, смешанного с водой. Смесь хорошо взбалтывать и в

нее добавить 20 мл 5% - ного раствора перманганата калия. Пробирку оставить в шкафу для пробирок на 10 минут. Если цвет коричневого осадка оксида марганца (II), образовавшегося в результате реакции, начинает тускнеть, рекомендуется повторить эксперимент и принять еще раствор перманганата калия. В конце реакции избыток окислителя возвращается в бесцветное состояние путем добавления 20 мл насыщенного раствора оксида сульфата железа (II). Колбу оставить в холодильнике на 12-18 часов для осаждения пентобромистого ацетата, что характерно для реакции. Затем его фильтровать, и осадок на фильтре промыть 3-4 раза ледяной водой до тех пор, пока вода не станет нейтральной (с использованием метила оранжевого). Хорошо промытый осадок будет иметь белый или слегка окрашенный вид.

Осадок пентабромацетата вылить в фарфоровую тигелью заданной массы и сушить в эксикаторе, содержащем серную кислоту. Если высушенный осадок взвешивается в тигле и из него снимается вес тигля, вес осадка известен. 1 мг пентабромацетата соответствует 0,483 мг лимонной кислоты.

Реактивы. 30% - ный раствор бромиды калия, 48% - ный раствор серной кислоты, 5% - ный раствор перманганата калия, насыщенный раствор сульфата железа (II).

Определение янтарной кислоты

Поскольку эта кислота была первоначально выделена из янтаря, одноименная янтарная кислота содержится в большинстве растений. Особенно много его в незрелых плодах.

Ход работы. 5-10 г сухого растительного сырья растирают в фарфоровой ступке и добавляют 4 мл смеси серной кислоты с водой (1: 4). Через 1,5-2 часа в ступку добавляют 4-5 граммов обезвоженного сульфата натрия и тщательно измельчают до образования однородной массы. Смесь переливают в колбу объемом 200 мл и добавляют к муке 100 мл эфира. Устье ручки плотно закрывают (герметично закрывают) и встряхивают на механическом вибрационном устройстве в течение 15-30 минут. Затем смесь эфиров выливают в делительную воронку и добавляют к ней 100 мл воды. Воронку время от времени

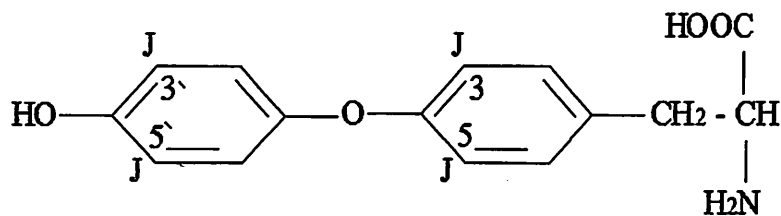
встряхивают. Через 30 минут водную фазу органических кислот отделяют. Остатки эфира в воде отделяют упариванием. Водную смесь охлаждают до комнатной температуры, переливают в мерную колбу на 200 мл и доводят до линии с дистиллированной водой, отбирают 100 мл смеси, помещают в мерную колбу на 200 мл и нейтрализуют 1 Н раствором щелочи бария и 1 мл 10% -ного раствора хлорида бария. Затем трубку нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут. К колбе необходимо подсоединить воздухоохладитель. Затем смесь из колбы переливают в фарфоровую посуду и упаривают до температуры кипения на водяной бане. Оставшуюся густую смесь в фарфоровой посуде растворяют в 20 мл воды и оставляют на 1-2 часа, добавляя 80 мл этилового спирта. По окончании времени спирт отделяется через воронку Бухнера. Остаток, оставшийся на фильтре, промывают водой и переливают в колбу. Смесь очищают от нагретого на кипящей водяной бане спирта, затем колбу продолжают нагревать и постепенно добавляют из 5% - ного раствора перманганата калия до образования устойчивой красной окраски.

Смесь подкисляют серной кислотой, а избыток перманганата удаляют перекисью водорода.

Полученный раствор переливают в фарфоровую посуду и упаривают на водяной бане до 10-15 мл. Затем добавляют 5 г дегидратированной соли сульфата натрия и оставляют на 1-2 часа. Затем его упаковывают в бумажные пакеты и экстрагируют диэтиловым эфиром в течение 1 часа в аппарате Сокслета или в колбе. Затем эфир перегоняют и титруют фенолфталеином 0,1 Н едким калием, добавляя 20 мл дистиллированной воды. В этом случае израсходованный 1 мл щелочи эквивалентен 5,9 мг янтарной кислоты. Количество янтарной кислоты определяется следующим образом.

$$X = \frac{a \cdot 5,9 \cdot V \cdot 100}{c \cdot V_1}$$

X - количество янтарной кислоты, в мг%; a - количество едкого калия, использованное для титрования, мл; V - объем смеси, отделенной от исследуемого материала, мл; V₁ - смесь, полученная для анализа, мл; c- масса исследуемого материала, г.



Тироксин, 3,5', 5', 5, - тетраiodтиронин

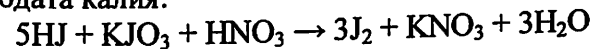
Белком щитовидной железы является тиреоглобулин, имеющий гормональные свойства с молекулярной массой 600 000.

Ряд заболеваний может возникнуть в результате нарушения выработки гормонов в щитовидной железе. Когда функция железы снижается, гормон вырабатывается в небольших количествах, что приводит к состоянию гипотиреоза в организме. В таких случаях в организме возникают микседема и кретинизм. Распространенной эндемической формой заболевания щитовидной железы является зоб, основным признаком которого является гиперактивность щитовидной железы (гипертрофия). Появление фурункулов связано с недостатком йода во внешней среде (почва, вода, растения, продукты питания). Если функция щитовидной железы повышена, возникает состояние гипертиреоза. У больных тиреотоксикозом из-за ускорения метаболизма наблюдаются случаи похудения, частые вибрации, увеличения частот сердцебиения. При тиреотоксикозе метаболизм йода в щитовидной железе ускоряется, и железа поглощает йод из крови. Гормоны щитовидной железы влияют на все типы обмена веществ. Количество тироксина в крови строго регулируется гормоном щитовидной железы гипофиза. Тиреотропная функция гипофиза обратно пропорциональна количеству тироксина в крови. В нем по мере увеличения количества тироксина высвобождение тиреотропного гормона уменьшается, и наоборот, когда количество тироксина уменьшается, вырабатывается больше гормона гипофиза и стимулирует щитовидную железу, в результате чего тироксин потребляется больше и его количество в крови. Центральная нервная система оказывает регулирующее влияние на эти процессы через гипоталамус.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки; стекло; водяная баня.

Реактивы. 1) Таблетка тироидина (0,1 г массы на таблетку содержит 0,17-0,23 мг йода). 2) Разбавленная азотная кислота (1:1). 3) Йодат калия (10% - ный раствор KIO_3). 4) Хлороформ.

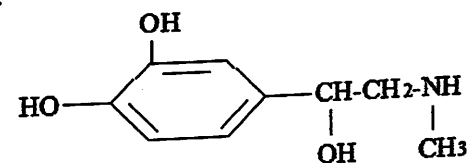
Ход работы. Таблетку щитовидной железы измельчить, и полученный порошок разлить в пробирки. Затем добавить 2 мл азотной кислоты и нагревать на кипящей водяной бане 3-4 минуты. Затем раствор охладить, добавить 2 мл раствора йодата калия, несколько раз встряхнуть и раствор охладить погружением в стакан с водой. Через несколько минут нижний слой 1-1,5 мл из хлороформа приобретает розовато-пурпурный цвет. Причина этого цвета заключается в том, что образующаяся в результате гидролиза йодистая кислота окисляется до йода, не содержащего йодата калия:



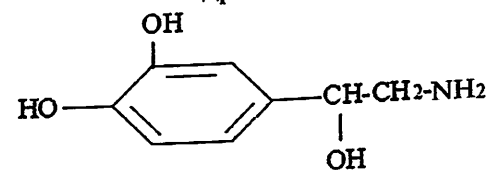
Йод в слое хлороформа имеет розово-пурпурный цвет.

Гормоны коры надпочечников

Мозговой слой надпочечников производит гормоны адреналин и норадреналин.



Адреналин



Норадреналин

Адреналин и норадреналин обладают одинаковым биологическим действием, действие которого отличается только количеством. Важнейшая биологическая функция этих гормонов -

повышение артериального давления. Этот эффект норадреналина сильнее, чем у адреналина.

Адреналин оказывает сильное влияние на метаболизм углеводов в организме и усиливает обмен веществ. Адреналин усиливает распад гликогена в печени и увеличивает количество глюкозы в крови.

Адреналин - очень летучее вещество, легко окисляется и проявляет восстановительные свойства. Например, он имеет свойство восстанавливать раствор нитрата серебра до металлического серебра. Адреналин легко окисляется в нейтральных и щелочных условиях. Продукты, образующиеся в результате окисления адреналина (дегидроадреналин, адренохром и др.), участвуют в окислительных процессах в организме.

Качественные реакции адреналина

1. Реакция с хлоридом железа(III): при добавлении адреналина к раствору хлорида железа образуется зеленая окраска, в которой пирокатехиновое кольцо адреналина образует зеленый комплекс с хлоридом железа. Пирокатексин вызывает аналогичную реакцию.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки 1,2 мл.

Реактивы. 1. 0,01% - ный раствор адреналина (в ампулах) 2. 3% - ный раствор хлорида железа-III. 3. 0,05% - ный раствор пирокатехина.

Ход работы. Первая пробирка наполнена 1-2 мл воды, вторая пробирка - 1-2 мл раствора адреналина, третья пробирка - 1-2 мл раствора пирокатехина. Затем ко всем растворам добавляют 2 капли раствора хлорида железа. В растворах адреналина, пирокатехина образуется зеленая окраска.

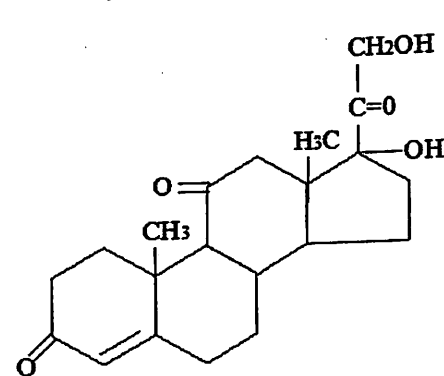
2. Реакция с йодатом калия (KIO_3). 1. 0,01% - ный раствор адреналина. 2. 1% - ный раствор йодата калия. 3. 10% - ный раствор уксусной кислоты.

Ход работы. Взять 0,5 мл раствора адреналина и добавить 1 мл 1% - ного йодата калия и 10 капель 10% - ного раствора уксусной кислоты. В результате получается красновато-зеленый цвет.

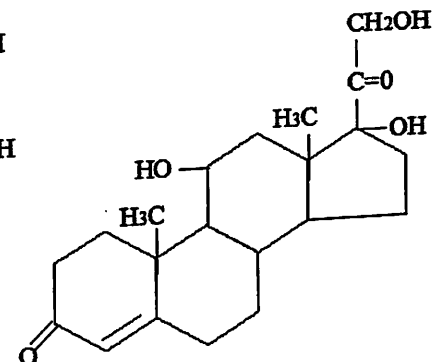
Гормоны коры надпочечников

Корковый слой надпочечников вырабатывает несколько важных гормонов, растворимых в жирах. В экстракте коры головного мозга содержится более 34 стероидов, некоторые из которых обладают гормональной активностью, остальные являются промежуточными соединениями, участвующими в синтезе гормонов, а некоторые - продуктами распада активных веществ. В основном это цикlopentanопергидрофенантрен с тетрадной структурой, т.е. стероиды также распространены для холестерина, желчных кислот, провитаминов, половых гормонов, поэтому такие вещества называются кортикостероидами. Минералокортикоиды отвечают за электролитный и водный баланс, в основном дезоксикортикостерон. Глюкокортикоиды, которые реагируют на регуляцию углеводного и белкового обмена, включают гормоны альдостерон, кортизон и кортизол. Когда функция этой железы снижается, происходит снижение сывороточного Na^+ , Cl^- , бикарбоната и глюкозы, уменьшение мышечного

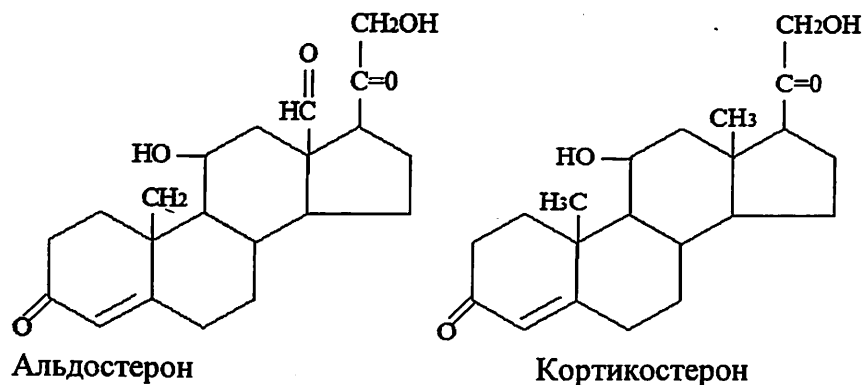
Na^+ , увеличение K^+ и воды, увеличение сывороточного K^+ и азота. Снижение уровня гликогена в печени и мышцах. Повышенная экскреция Na^+ , Cl^- и бикарбоната с мочой снижает K^+ и общую экскрецию азота.



Кортизон
(гидрокортизон)



Кортизол



Качественные реакции кортизона

1. Реакция фенилгидразина с сульфатом.

Кортизон образует гидрозон и озон с фенилгидразином за счет карбонильной группы.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетка 1,10 мл, водяная баня.

Реактивы. 1. Раствор фенилгидразина сульфата: 0,1 г фенилгидразина растворяют в 100 мл 50%-ном растворе серной кислоты. 2. Препараты «Кортизон-ацетат». 3. Метиловый спирт.

Ход работы. Растворить 1 мг ацетата кортизона в 1 мл метилового спирта, добавить 5 мл раствора фенилгидразина и нагреть на водяной бане. Через несколько минут образуется желтая окраска.

2. Реакция с реактивом Фелинга. Кортизон имеет свойство восстанавливать соли меди до оксида меди.

Реактивы. 1. Препараты кортизона ацетата. 2. Реактив Фелинга. 1. Растворите 34,64 г сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в колбе на 500 мл и долейте дистиллированную воду до метки. 2. Растворить 173 г соли сегнета в 200–250 мл дистиллированной воды в колбе объемом 500 мл, затем добавить 100 мл 50% - ного раствора гидроксида натрия и довести водой до метки. Перед использованием реагент смешивают с первым и вторым растворами в равных объемах.

Ход работы. Добавить к раствору 10 мг ацетата кортизона, растворить в 1 мл метилового спирта и добавить 1 мл реактива Фелинга, затем нагреть на водяной бане. В результате в оксиде меди образуется красный осадок.

Гормон поджелудочной железы - инсулин

Гормон поджелудочной железы - инсулин - вырабатывается в β -клетках островков Лангерганса. Когда в организме не хватает инсулина, количество сахара в крови уменьшается (гипергликемия), и кровь выводится с мочой, что называется глюкозурией, что приводит к заболеванию, называемому диабетом.

Кристаллический инсулин имеет молекулярную массу 36 000 и состоит из двух полипептидных цепей: А (21 аминокислотный остаток) и В (30 аминокислотных остатков). Эти полипептидные цепи связаны дисульфидными связями. Биологическое значение инсулина состоит в том, что он создает условия для синтеза гликогена.

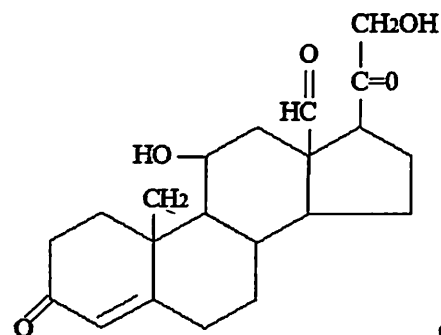
Качественные реакции инсулина. Инсулин реагирует на биурет и серосодержащие аминокислоты, характерные для всех белков.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; 1,2 мл пипетки; спиртовая лампа.

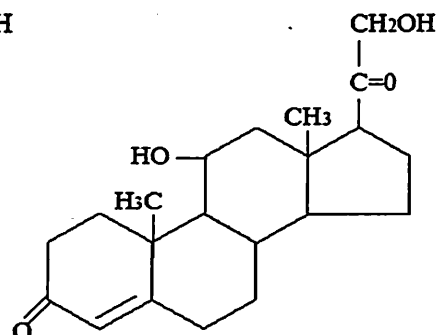
Реактивы: 1. Раствор инсулина (в ампуле). 2. 10% -ный раствор гидроксида натрия. 3. 1% - ный раствор медного купороса. 4. 0,5% - ный раствор ацетата свинца.

1. Биуретовая реакция. Добавить в раствор 1-2 мл раствора инсулина. Затем добавить равное количество раствора гидроксида натрия и 1-2 капли раствора медного купороса. Результат фиолетовый.

2. Реакция на серосодержащие аминокислоты. Добавить к раствору 1-2 мл раствора инсулина и равный объем раствора гидроксида натрия и нагреть до кипения. Затем добавить 2-3 капли раствора ацетата свинца и нагреть. В результате в растворе образуется черный осадок.



Альдостерон



Кортикостерон

Качественные реакции кортизона

1. Реакция фенилгидразина с сульфатом.

Кортизон образует гидрозон и озон с фенилгидразином за счет карбонильной группы.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетка 1,10 мл, водяная баня.

Реактивы. 1. Раствор фенилгидразина сульфата: 0,1 г фенилгидразина растворяют в 100 мл 50%-ном растворе серной кислоты. 2. Препараты «Кортизон-ацетат». 3. Метиловый спирт.

Ход работы. Растворить 1 мг ацетата кортизона в 1 мл метилового спирта, добавить 5 мл раствора фенилгидразина и нагреть на водяной бане. Через несколько минут образуется желтая окраска.

2. Реакция с реактивом Фелинга. Кортизон имеет свойство восстанавливать соли меди до оксида меди.

Реактивы. 1. Препараты кортизона ацетата. 2. Реактив Фелинга. 1. Растворите 34,64 г сульфата меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) в колбе на 500 мл и долейте дистиллированную воду до метки. 2. Растворить 173 г соли сегнета в 200–250 мл дистиллированной воды в колбе объемом 500 мл, затем добавить 100 мл 50% - ного раствора гидроксида натрия и довести водой до метки. Перед использованием реagent смешивают с первым и вторым растворами в равных объемах.

Ход работы. Добавить к раствору 10 мг ацетата кортизона, растворить в 1 мл метилового спирта и добавить 1 мл реактива Фелинга, затем нагреть на водяной бане. В результате в оксиде меди образуется красный осадок.

Гормон поджелудочной железы - инсулин

Гормон поджелудочной железы - инсулин - вырабатывается в β -клетках островков Лангерганса. Когда в организме не хватает инсулина, количество сахара в крови уменьшается (гипергликемия), и кровь выводится с мочой, что называется глюкозурией, что приводит к заболеванию, называемому диабетом.

Кристаллический инсулин имеет молекулярную массу 36 000 и состоит из двух полипептидных цепей: А (21 аминокислотный остаток) и В (30 аминокислотных остатков). Эти полипептидные цепи связаны дисульфидными связями. Биологическое значение инсулина состоит в том, что он создает условия для синтеза гликогена.

Качественные реакции инсулина. Инсулин реагирует на биурет и серосодержащие аминокислоты, характерные для всех белков.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; 1,2 мл пипетки; спиртовая лампа.

Реактивы: 1. Раствор инсулина (в ампуле). 2. 10% -ный раствор гидроксида натрия. 3. 1% - ный раствор медного купороса. 4. 0,5% - ный раствор ацетата свинца.

1. Биуретовая реакция. Добавить в раствор 1-2 мл раствора инсулина. Затем добавить равное количество раствора гидроксида натрия и 1-2 капли раствора медного купороса. Результат фиолетовый.

2. Реакция на серосодержащие аминокислоты. Добавить к раствору 1-2 мл раствора инсулина и равный объем раствора гидроксида натрия и нагреть до кипения. Затем добавить 2-3 капли раствора ацетата свинца и нагреть. В результате в растворе образуется черный осадок.

Контрольные вопросы

1. Общее понятие о гормонах.
2. Классификация гормонов.
3. Гормоны щитовидной железы.
4. Расскажите о гормонах поджелудочной железы.
5. Гормоны мозгового слоя надпочечников.
6. Гормоны коркового слоя надпочечников.
7. Расскажите о половых гормонах.
8. Гормоны передней доли гипофиза.
9. Гормоны средней доли гипофиза.
10. Гормоны задней доли гипофиза.
11. Расскажите о стероидных гормонах.
12. Расскажите о фитогормонах.

ГЛАВА XI. КРОВЬ

Ключевые слова: *кровь, гормоны, витамины, минералы, белки, жиры, углеводы, плазма, эритроциты, лейкоциты, тромбоциты*

Кровь - это жидкость, которая постоянно циркулирует в артериях, венах и капиллярах и выполняет различные сложные физиологические функции: 1. Обеспечивает кислородом органы и ткани и уносит выделяемый углекислый газ. 2. Переносит питательные вещества из кишечника в ткани и органы. 3. Переносит конечные продукты метаболизма в органы выделения (легкие, почки, кишечник, кожу). 4. Чрезвычайно важна регуляторная функция крови, она регулирует процессы осмотического давления, pH окружающей среды, кислотно-щелочного баланса, транспорта гормонов, витаминов, минералов, воды и теплообмена. 5. Выполняет защитную функцию.

Кровь составляет около 8-10% от общей массы тела животного. Кровь состоит из плазмы и элементов формы: эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов.

Кровь содержит белки, жиры, углеводы, различные промежуточные продукты обмена, гормоны, витамины и минеральные соли. Нарушения тканевого обмена приводят к изменению состава крови. Поэтому о здоровье организма можно судить по количественному анализу компонентов крови.

Определение белковых фракций сыворотки крови

Определение фракций сывороточного белка экспресс-методом основано на осаждении белков фосфатными растворами разной концентрации. Оптическую плотность растворов известных белковых фракций определяют фотоэлектроколориметром и спектрофотометром.

Экспресс-метод определения белковых фракций используется для определения изменений белкового обмена у животных, которых кормят в определенных условиях.

Необходимые инструменты: бюретка; пипетки, штатив с пробирками, баллоны; пробирки, фотоэлектроколориметр или спектрофотометр.

Реактивы. 1. Основной раствор. - Для приготовления этого раствора взять 226,8 г $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ и полностью растворить его в 400 мл растворе, содержащего 33,5 NaOH. Затем раствор охладить до комнатной температуры и добавить дистиллированную воду до 500 мл.

2. Для приготовления первого раствора взять 92,6 мл (или 123,5 г) основного раствора, перенести в колбу на 100 мл и долить до отметки дистиллированной водой. 3. Для приготовления второго, третьего и четвертого раствора в колбы на 100 мл добавить 75,0 мл (100 г), 50,8 мл (78,5 г) и 48,7 мл основного раствора и довести до отметки водой.

Ход работы. 1. Взять шесть пробирок и отметить их цифрами 0,1,2,3,4,5. 2. 10 мл дистиллированной воды к пробирке №0, 5 мл разбавленных фосфатных растворов, к пробиркам 1, 2, 3, 4 по 0,5 мл сыворотки крови, к пробирке 5, 0,75 мл дистиллированной воды и 3,75 мл основного фосфатного раствора. 3. Жидкость в растворе 5 перемешивают, затем 0,5 мл этого раствора добавляют к растворам 1,2,3,4, к раствору № 0 добавляют 1 мл смеси и растворы встряхивают. 4. Через 15 минут определяют оптическую плотность растворов в 1,2,3,4 растворах на фотоэлектроколориметре - с фильтром красного света. Пробирка №0 используется в качестве контроля. 5. После определения оптической плотности смесей в растворах 1,2,3,4 - рассчитываются белковые фракции. Оптическая плотность смеси в первом растворе вычитается из оптической плотности смеси во втором растворе. Разница в оптических плотностях соответствует оптической плотности альбумина. Оптическая плотность смеси во втором растворе вычитается из оптической плотности смеси во втором растворе. Эта разница указывает на оптическую плотность альфа-глобулинов. Оптическая плотность смеси в третьем растворе вычитается из оптической плотности смеси в четвертом растворе. Эта разница в оптических плотностях указывает на оптическую плотность β -глобулинов. Затем добавляются различия в оптических плотностях смесей в растворах 1 и 4, и относительный процент каждой фракции белка

принимается как сумма 100%. Каждая фракция - это грамм-процент. Для этого методом рефрактометрии определяется общее количество белков. Предполагая, что общее количество белков составляет 100%, каждый белок рассчитывается из относительного процента фракций, абсолютного процента фракций.

Примерный расчет белковых фракций в сыворотке крови

Фракции белков	№	Оптическая плотность	Разница оптической плотности	Относительный%	Абсолютный	Количество общего белка в сыворотке крови, %
Альбумины	1	0,685	0,364	53,14	4,65	
α -глобулины	2	0,321	0,049	7,15	0,65	
β -глобулины	3	0,272	0,082	11,97	1,05	
γ -глобулины		0,190	0,190	27,74	2,48	
Сумма		1,468				8,76

Определение глюкозы в крови и моче с помощью реактива ортотолуидина

Принцип метода. Под воздействием высоких температур в кислой среде глюкоза образует сине-зеленый комплекс с ортотолуидином, интенсивность окраски которого зависит от концентрации глюкозы, оптическая плотность которой измеряется спектрофотометром.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки 1,2 мл, центрифуга, спектрофотометр; водяная баня.

Реактивы. 1. Реактив ортотолуидин: растворить 0,15 г тиомочевин в 94 мл уксусной кислоте и добавить 6 мл ортотолуидина. Хранить в струйном холодильнике. 2. 5% - ный раствор трихлоруксусной кислоты. 3. стандартный раствор глюкозы, 100 мг%; Для приготовления этого раствора 100 мг

глюкозы растворяют в растворе 0,2%-ной бензойной кислоте в колбе на 100 мл. Хранить в струйном холодильнике.

Ход работы. В центрифужную пробирку добавить 0,9 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты в раствор и добавить 0,1 мл крови или мочи. Раствор встряхивают и центрифугируют 10 минут при 2500 об / мин. Затем к раствору добавляют 0,5 мл прозрачной жидкости и 4,5 мл орто-толуидинового реактива. Пробирки закрывают пробкой и выдерживают на кипящей водяной бане 8 минут.

Затем растворы охлаждают и измеряют при длине волны 630 нм на спектрофотометре. При этом такая же работа проводится с контрольными и стандартными образцами. Для приготовления контрольного образца добавляют 0,5 мл трихлоруксусной кислоты и 4,5 мл реактива ортотолуидина. Для приготовления стандартной пробы вместо крови берется стандартный раствор 0,1 мл глюкозы, и работа проводится как с экспериментальной пробой. Контрольные и стандартные образцы не центрифугируются.

В случаях высокой концентрации глюкозы, особенно при анализе мочи, образец разбавляют от 2 до 10 раз в дистиллированной воде. Полученный результат умножается на количество разведений.

Количество глюкозы рассчитывается по следующей формуле.

$$C_{on} = C_{cm} \frac{E_{on}}{E_{cm}} \text{ мг\% глюкозы.}$$

C_{on} - концентрация глюкозы в растворе, мг%; C_{cm} - концентрация глюкозы в стандартном образце, мг%; E_{on} - оптическая плотность образца;

E_{cm} - плотность стандартного образца.

Определение количества кальция в сыворотке крови

Кальций играет очень важную роль в организме. Чаще встречается в костной ткани в виде фосфора, карбоната, соединений фтора. Когда его концентрация в костной ткани снижается, он снова поступает через кровь. Около 40% кальция в сыворотке находится в форме комплексных соединений, связанных с

альбуминами. Кальций - двухвалентный катион, снижающий возбудимость нервной системы, активирует актомиозин, АТФазу, лецитиназу и подавляет дегидрогеназу, депептидазу и другие ферменты, также влияет на свертываемость крови.

Количество кальция в сыворотке крови является важным показателем того, что организм снабжается катионами через сыворотку крови. Поэтому за количеством кальция в сыворотке крови животного постоянно следят.

Количество кальция в сыворотке крови животных разных видов (мг%).

Лошадь 12-14; Свинья 12-14;

Крупно рогатый скот 10-13; Собака 10-12;

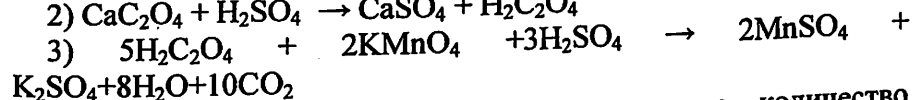
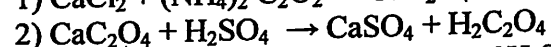
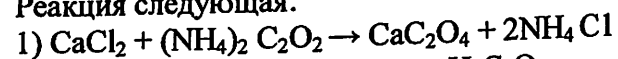
Верблюд II - 12,5; Курица 12-22; Козы 23 - 26;

Обмен кальция в организме зависит от ряда факторов. Его метаболизм зависит от соотношения кальция и фосфора в продуктах питания, физиологического состояния витамина D и щитовидной железы, надпочечников. При ряде заболеваний изменяется количество кальция в сыворотке крови. Снижение кальция в крови (гипокальциемия) наблюдается при таких заболеваниях, как недоедание, рахит, паралич.

При гиперпаратиреозе, опухолях костной ткани количество кальция в крови увеличивается при применении больших доз витамина D.

Принцип метода. Кальций в сыворотке выпадает в виде оксалатов. Осадок промывают, затем растворяют в серной кислоте, а выделившуюся щавелевую кислоту титруют раствором перманганата калия.

Реакция следующая:



Из приведенной выше реакции видно, что количество перманганата калия, необходимое для окисления щавелевой кислоты, эквивалентно количеству кальция.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; центрифуга, пипетки на 2 и 10 мл; стеклянный стержень; микробуретка; водяная баня.

Реактивы. 1. 4% - ный раствор аммониевой соли щавелевой кислоты. 2. 2% - ный раствор аммония. 3. 5% - ный раствор серной кислоты. 4. 0,01 Н раствор перманганата калия.

Ход работы. 1. Добавить по 2 мл дистиллированной воды в 2 центрифужные пробирки.

2. Добавить к этим растворам по 1 мл сыворотки и хорошо перемешайте.

3. Затем в пробирку добавить пипеткой 0,5 мл насыщенного раствора аммониевой соли щавелевой кислоты. Жидкости в растворах хорошо перемешать и оставить на 15 минут для полного осаждения кальция.

4. Затем пробирки центрифугируют и центрифугируют при 3000 об / мин в течение 10-15 минут.

5. Пробирки вынимают из центрифуги, жидкость в пробирках осторожно сливают, а осадок кальция остается на дне пробирки.

6. Добавить к осадку кальция в пробирках 4 мл дистиллированной воды или 4 мл 2%-ного раствора аммиака и перемешать бюреткой и центрифугировать при 3000 обр / мин в течение 10-15 минут.

7. Слить жидкость, оставив осадок, добавить к осадку оксалата кальция 1 мл 50% -ной серной кислоты, перемешать осадок стеклянной палочкой и поместить раствор в кипящую водяную баню на 2-3 минуты.

8. Горячий раствор титруют раствором 0,01 Н перманганата калия до образования пурпурной окраски (полученная окраска не должна исчезать в течение 30 секунд или 1 минуты).

9. Одновременно с определением кальция в сыворотке крови проводится контрольный эксперимент, т.е. определяется количество кальция в воде и реактивах. Для этого в центрифужную пробирку добавляют 3 мл дистиллированной воды и 0,5 мл раствора аммониевой соли щавелевой кислоты, и через 15 минут в центрифуге, промытой аммиаком, в контрольном опыте проделывают ту же работу, что и в сыворотке.

Из количества перманганата калия, использованного для титрования исследуемого образца (сыворотка крови), вычитается количество перманганата калия, использованного для титрования контрольного образца (1 мл 0,01 Н раствора MnO_4 соответствует 0,2 мг кальция).

Пример расчета количества кальция. Количество кальция рассчитывается по следующей формуле:

$$X = 0,2 (a-b) 100.$$

Где: X - количество кальция, в мг%, 0,2 мг количество данных кальция, что соответствует 1 мл 0,001 Н перманганата калия; а - количество перманганата, использованное для титрования экспериментального образца, в - количество перманганата, использованное для титрования контрольного образца; 100 - для расчета мг%.

0,95 мл 0,01 Н раствора $KMnO_4$ использовали для титрования сыворотки, а 0,3 мл 0,01 Н раствора $KMnO_4$ использовали для титрования контрольного образца. Количество кальция в сыворотке крови следующее:

$$(0,95 - 0,3) * 0,2 * 100 = 13 \text{ мг\%}$$

Определение фосфора в сыворотке крови

Фосфор - важнейший структурный элемент в структуре тканей. Фосфор составляет около 85% костной ткани в организме. Фосфор является необходимым компонентом для синтеза нуклеиновых кислот, нуклеопротеидов, фосфопротеинов, ряда коферментов НАД, НАДФ, ФМН, ФАД пиридоксальфосфат, ТПФ и эфиров фосфора, углеводов.

Соединения фосфора участвуют в гликолизе, гликогенолизе, окислительное фосфорилирование и ряде других метаболических процессов. Соли фосфорной кислоты попадают в буферные системы и поддерживают относительно постоянный рН крови.

Изменения количества неорганического фосфора в сыворотке крови животных зависят от физиологического состояния организма, возраста, характера питательных веществ. Количество неорганического фосфора в сыворотке животных обычно составляет (в мг%):

4,6-5,5 у коров

6-7,0 у быка

3,0-4,0 у свиней

Снижение количества неорганического фосфора в сыворотке крови обычно можно увидеть при недостатке витамина D

(гиповитаминозе D) в питании, а также при нарушении соотношения кальция и фосфора.

Оптимальное соотношение кальция и фосфора в рационе животных следующее: 1,5:1; 2:1, летом 2,5:1. Это соотношение зависит от вида, возраста, продуктивности животных и их физиологического состояния. Пониженное содержание неорганического фосфора в сыворотке крови свидетельствует о нарушении фосфорного обмена в организме.

Суть метода заключается в том, что молибденовая кислота с неорганическим фосфором в сыворотке крови образует фосфорные комплексы молибденовой кислоты, которые при возвращении в результате реакции придают продукту характерный синий цвет. Скорость цветообразования зависит от количества фосфора в исследуемом объекте.

В качестве восстанавливающего агента можно использовать эйконоген, гидрохинон, аскорбиновую кислоту и другие.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки по 1, 2, 5 и 10 мл; фильтровальная бумага; воронка; колба Кьельдаля 25 мл; водяная баня; фотоколориметр или спектрофотометр.

Реактивы. 1. 20% - ный раствор трихлоруксусной кислоты. 2. Готовят 2,5% - ный раствор молибдата аммония в растворе 5 Н серной кислоты. 3. Стандартный раствор KN_2PO_4 содержит 0,04 мг фосфора в 1 мл раствора. Приготовление раствора: 0,1755 г KN_2PO_4 растворяют в дистиллированной воде и доводят до общего объема 1 л. 4. Концентрированная серная кислота. 5. Пергидрол.

Ход работы. 1. 2 мл сыворотки крови в сухом чистом растворе; Добавить 6 мл дистиллированной воды и 2 мл 20% - ного трихлоруксусной кислоты и хорошо перемешать.

2. Через 5-10 минут профильтровать через фильтровальную бумагу. Чистый фильтрат используется для определения неорганического фосфора.

3. Взять 5 мл фильтрата и добавить к раствору, добавить 1 мл молибдата аммония и 0,5 мл аскорбиновой кислоты, затем довести объем вещества в растворе до 10 мл водой и поместить на водяную баню при 37°C на 5 минут.

4. Через 30 минут строят спектрофотометр на длине волны 750 нм.

Определение общего фосфора. Перенести 0,05 мл крови в колбу микрокельдаля, добавить 0,2 мл 5 Н серной кислоты и минерализовать до полного обесцвечивания. Определение содержания фосфора проводят в условиях, описанных выше.

Определение растворимого в кислоте фосфора. 0,25-0,5 мл фильтрата трихлоруксусной кислоты экстрагируют из вышеуказанного препарата для определения неорганического фосфора и минерализуют в колбе микрокельдаля. Фосфор определяют описанным выше методом определения неорганического фосфора.

В откалиброванной структуре графика для расчета количества фосфора. Для этого готовят основной стандартный раствор KN_2PO_4 , который содержит 0,04 мг фосфора в 1 мл раствора. Взять шесть пробирок и добавить в них реагенты, указанные в таблице ниже.

Реактивы	№					
	1	2	3	4	5	6
Стандартный раствор фосфора, мл						
Дистиллированная вода, мл	2,95	2,9	2,8	2,7	2,6	3
Реактив молибдата, мл	1	1	1	1	1	1
Аскорбиновая кислота, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Через 30 минут его смотрят на спектрофотометре на длине волны 750 нм.

Для построения графика величина оптической плотности по оси ординат и количество фосфора по оси абсцисс выражены в мг. Для определения количества фосфора в 1 мл анализируемой сыворотки используется следующая формула:

$$X = \frac{C \cdot 100}{V}$$

X - количество неорганического фосфора (мг%); C - количество фосфора, обнаруженное на калиброванном графике

(мг); 100 - коэффициент для расчета результатов в мг%; V - объем сыворотки в фильтрате.

Определение общих фосфолипидов на основе количества общего фосфора в сыворотке крови

Принцип метода. Под действием трихлоруксусной кислоты фосфолипиды выпадают в осадок вместе с белками крови. Количество фосфора в образовавшемся осадке определяют спектрофотометрическим методом.

Реактивы. 1. 10% - ный раствор трихлоруксусной кислоты. 2. 57% - ный раствор хлорной кислоты. 3. 4% - ный раствор молибдата аммония. 4. Основной раствор аминафтосульфоновой кислоты (эйконогенный раствор) готовят из 30 г бисульфита натрия или метабисульфита натрия, 6 г сульфита натрия и 0,5 г эйкогеногена. Бисульфит натрия растворяют в 100-150 мл дистиллированной воде, затем в раствор добавляют эйконоген. Эйконоген растворяют путем перемешивания стеклянной палочкой, взяв небольшого количества воды и растворения сульфита натрия. Затем два реагента смешивают и доводят до 250 мл (с водой). Через 2-3 часа его процеживают, раствор помещают в темную емкость и хранят в прохладном помещении. Перед применением разбавить раствор основы в 1:2,5 раза. 5. Приготовить основной стандартный раствор. Для приготовления этого раствора взять 4,39 г KH_2PO_4 и растворить в 1 литре дистиллированной воды. 1 мл этого раствора содержит 1 мг фосфора.

Для использования этот стандартный раствор разводят в 100 раз, который содержит 0,01 мг фосфора в 1 мл раствора. Из этого раствора готовятся стандартные растворы (образцы).

Необходимые инструменты: колбы на 1000 и 250 мл; Пипетки 1,2,10 мл; песочная ванна; стеклянная палочка, фильтровальная бумага, воронка; спектрофотометр.

Ход работы. Приготовление экспериментального образца.

В раствор добавить 0,2 мл сыворотки крови и 2,8 мл дистиллированной воды. Затем добавляют 3 мл 10% -ного раствора трихлоруксусной кислоты и встряхнуть, через 5 минут центрифугировать 15 минут при скорости 2500 об / мин.

Жидкость слить, а осадок залить 1 мл 57% - ного раствора хлорной кислоты. Раствор помещают на песчаную баню при 180°C на 20-30 минут и оставляют смесь до изменения цвета. После охлаждения довести объем исследуемой пробы до 7 мл дистиллированной воды.

Для приготовления контрольного образца взять 0,8 мл 57% - ного раствора перхлоруксусной кислоты и увеличить объем до 7 мл водой.

Приготовление стандартных образцов. Готовят три стандартных образца. Для этого добавляют 2 мл стандартного раствора и 0,8 мл 57% - ного раствора перхлоруксусной кислоты. Объем каждой стандартной пробы доводят до 7 мл водой. В каждую пробирку добавляют 1 мл 4% - ного раствора молибдата аммония и перемешивают, добавляют 1 мл аминафтосульфоновой кислоты и доводят объем до 10 мл водой. Затем жидкости в пробирках хорошо перемешивают и оставляют на 20 минут. Его измеряют на спектрофотометре при длине волны 630-690 нм относительно контроля.

Количество фосфора рассчитывается по следующей формуле:

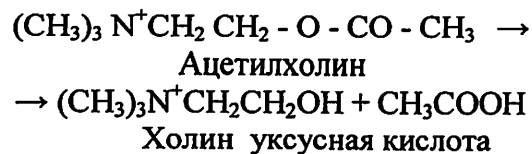
$$\frac{E_{on}}{E_{cm}} \cdot \frac{0,02 \cdot 100}{0,2} = \frac{E_{on}}{E_{cm}}$$

Здесь: 0,02 - количество фосфора (мг) в 2 мл стандартного раствора. 0,2 - объем сыворотки в экспериментальной пробе. E_{on} - оптическая плотность экспериментального образца (сыворотки крови). E_{cm} - оптическая плотность стандартного раствора.

Липоидный фосфор составляет 4% от молекулы фосфолипида, и для расчета общей концентрации фосфолипидов концентрацию липоидного фосфора умножают на 25.

Определение активности фермента холинэстеразы

Ацетилхолин играет посредническую роль в проведении нервных импульсов. Холинэстераза расщепляет ацетальхолин на холин и уксусную кислоту:



Эта реакция приводит к образованию кислой среды из-за накопления уксусной кислоты, что можно обнаружить с помощью индикатора. В данном исследовании, в зависимости от условий, используется индикатор бромтимолового синего, формирующий цвет. Зона изменения цвета находится в диапазоне pH 7,6-6,0. Желтый в кислой среде, зеленый в синем в щелочной среде.

Субстрат с ферментом инкубируют при разных температурах. Ферментативный гидролиз ацетилхолина определяется цветом инкубационной смеси.

Оптимальная температура для ферментов, выделенных из большинства тканей животных, составляет 37–40°C. При понижении температуры ферментативный катализ замедляется, и при 0°C реакция не происходит.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки, водяная баня; ледяная ванна.

Реактивы. 1. 0,5% - ный раствор ацетилхолина, источника сывороточного фермента холинэстеразы. 0,2% - ный раствор бромтимолового синего разбавленный 1:50 (2,5 г индикатора бромтимоловый растворяют 4,5 мл 0,1 н гидроксида натрия, полученный раствор переносят в колбу на 50 мл и 12,5 мл 0,1 н раствора. добавляется из раствора борной кислоты, затем объем раствора доводится до метки колбы раствором 0,1 М КС1. Перед использованием раствор разбавляют в 2,5 раза).

Ход работы. Берут три пробирки, каждая из которых заполнена 2,5 мл сыворотки и 0,5 мл индикатора бромтимолового синего. Первый раствор выливают на водяную баню при 40 °С, второй - на водяную баню комнатной температуры, третий - на ледяную баню. Через 10 минут добавляют ко всем растворам 0,5 мл раствора ацетилхолина, перемешивают жидкости и снова хранят при той же температуре. Через 10–15 минут определяется цвет, сформированный в пробирках, и определяется, что он зависит от температуры фермента.

ГЛАВА XII. МОЛОКО

Ключевые слова: катаболизм, метаболизм, анаболизм, молоко, каратин, плазма, жиры, ферменты, лактоза, казеин

Молоко - непрозрачная жидкость, имеет более сладкий вкус и более слабый запах. Цвет молока в некоторой степени зависит от количества в нем провитамина А, то есть каротин придает молоке желтоватый оттенок.

Молоко состоит из молочной плазмы и жира. Приведен состав молока следующих животных (%):

Животные	Вода	Белки	Жиры	Лактоза	Минеральные соли
Корова	87,3	3,4	3,6	5,0	0,7
Коза	87,0	3,7	4,0	4,5	0,9
Овца	84,0	5,1	6,1	4,2	1,0
Свинья	82,0	6,1	6,4	4,0	1,1
Собака	77,0	9,7	9,3	3,1	0,9
Заяц	70,0	15,5	1,9	2,9	
Олень	66,0	14-20	17,0	2,8	1,5

Молоко в основном содержит следующие белки: казеиноген, лактоальбумины, лактоглобулины, липопроотеины, ферменты и другие. Самый важный молочный белок - казеиноген. Фосфорная кислота связывается с оксиаминокислотами в белке - остатками серина и треонина. Казеиноген - это полноценный белок, то есть он содержит сумму всех аминокислот. Он хорошо усваивается организмом за счет наличия достаточного количества кальция и фосфора. Другие молочные белки также являются биологически полноценными. При кипячении они не свертываются. Казеиноген денатурируется при ферментации молока, его изоэлектрическая точка (ИЭТ) составляет - 4,7. Основным компонентом липидов молока являются триглицериды. Жиры содержатся в молоке в виде эмульсий. Состав углеводов молока лактоза 99,9% и 0,1% глюкоза. Лактоза (1,4-галактозид <глюкоза) является дисахаридом и специфична для молочных желез. В организме лактоза участвует в переваривании кальция, магния, фосфора и синтезе витаминов группы В.

Молоко богато каротином и витамином А, а также витаминами С, D, В₁, В₂, В₅, В₆. В молоке содержатся ферменты (амилаза, каталаза, ксантиноксидаза, дегидраза и др.); пигменты (ксантофилл, каротин, лактооксидаза, дегидраза и другие); гормоны (пролактин, окситоцин и др.), а также иммуномодуляторы.

В молоке содержатся минеральные вещества - 140 мг %, фосфор 80-100 мг%, калий - 140 мг% и меньше железа. Состав молока зависит от индивидуальных особенностей животного, породы, времени лактации и характера корма. На количество и состав молока влияет также физиологическое и патологическое состояние организма.

Качественные реакции молока

1. Осаждение и отделение казеина. Казеин можно выделить путем воздействия молочной кислоты (например, уксуса, молока, хлорида) или насыщенных растворов сульфата аммония, хлорида натрия. Казеин не растворяется в воде и быстро растворяется в щелочных растворах. Когда казеин отделяется от молока, остается его сыворотка. Сыворотка содержит лактоальбумины и лактоглобулины, лактозу и минеральные соли. Жиры также выпадают в осадок вместе с осадком казеина.

Необходимые инструменты: колбы; чашки; цилиндр 100 мл ли пипетка; стеклянный стержень; фильтровальная бумага, воронка.

Реактивы. 1. 0,1% - ный раствор уксусной кислоты, 2. 1% - ный раствор гидроксида натрия. 3. 5% - ный раствор гидрокарбоната натрия. 4. молоко.

Ход работы. 20-30 мл молока в стакане разводят в 3-4 объемах воды и хорошо перемешивают с каплей 0,1% - ным раствором уксусной кислоты до образования белого осадка казеина, жиры осаждаются вместе с казеином. Кислота добавляется в необходимом количестве, потому что казеин хорошо растворяется в избытке кислоты. После фильтрации осадка его промывают 2-3 раза дистиллированной водой. Сливают осадок и фильтрат для последующего использования. Когда небольшая часть осадка (казеин, масло) подвергается воздействию раствора гидроксида натрия или бикарбоната натрия, казеин растворяется, а масло

остается взвешенным. Жидкость фильтруют через влажную фильтровальную бумагу. Масло остается на фильтровальной бумаге. Фильтрат создается путем проведения реакций на белок (реакции окраски и осаждения).

2. Разделение лактоальбуминов и лактоглобулинов.

Необходимые инструменты: колба 50 мл; штатив с растворами; фильтровальная бумага; воронка.

Реактивы. 1. Фильтр. 2. Насыщенный раствор хлорида натрия.

Ход работы. Из фильтрата казеина, выпавшего в осадок под действием уксусной кислоты, его смешивают с насыщенным раствором хлорида натрия (1:1) и кипятят. В результате лактоальбумины и лактоглобулин осаждаются и фильтруются. Осадок после промывания растворяют в дистиллированной воде. Полученный раствор считается цветной реакцией на белки.

3. Определение содержания казеина.

Необходимые инструменты: колба 50 мл; водяная баня с термометром; бюретка.

Реактивы. 1. 5% - ный водный раствор салицилата натрия. 2. 2% - ный раствор фенолфталеина. 3. 0,02 Н раствор гидроксида натрия.

Ход работы. Перенести казеиновый фильтрат (1. Осаждение и отделение казеина) в колбу и добавить к нему 10 мл горячего (60-70°C) раствора салицилата натрия. После помещения пробирки в водяную баню (75-80°C) казеин встряхивают до растворения. Затем раствор охлаждают, добавляют 2-3 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,02 Н гидроксидом натрия до образования розовой окраски. Количество казеина определяется количеством потребляемой щелочи. Для нейтрализации 0,1 г чистого казеина используют 4,1 мл 0,02 Н раствора гидроксида натрия:

$$X = \frac{a \cdot 0,1}{4,1}$$

Где: X - количество испытуемого казеина, а - количество 0,02Н гидроксида натрия, использованное для титрования.

4. Влияние солей тяжелых металлов на белки молока.

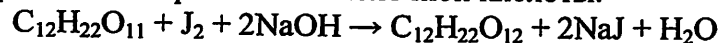
Необходимые инструменты: штатив с пробирками, пипетки.

Реактивы. 1. 0,5% - ный раствор ацетата свинца. 2. 5% - ный раствор медного купороса. 3. Молоко.

Ход работы. Взять две пробирки и добавить в первую 3-4 мл уацетата свинца, а во вторую - 3-4 мл раствора сульфата меди. К обоим растворам добавить 1-2 мл молока, в результате чего белки выпадают в осадок.

Качественные реакции молочного сахара

Принцип метода заключается в том, что свободная альдегидная группа в лактозе окисляется йодом в щелочных условиях, что приводит к образованию молочной кислоты.



Необходимые инструменты: колбы 50, 100 мл; пипетки по 5, 10 и 20 мл; бюретка; воронка; фильтровальная бумага.

Реактивы: 1. Молоко. 2. 7% - ный раствор медного купороса. 3. 2% - ный раствор гидроксида натрия. 4. 5% - ный раствор фторита натрия. 5. 5% - ный раствор соляной кислоты. 6. 0,1 Н раствор тиосульфата натрия. 7. 5% - ный раствор крахмала. 8. 0,1 Н раствор йода.

Ход работы. Две колбы по 50 мл наполняют 5 мл раствора сульфата меди, 5 мл раствора гидроксида натрия и 2,5 мл раствора фторита натрия. Затем в первую колбу (опытная) добавляют 5 мл молока, а во вторую (контрольная) 5 мл дистиллированной воды. Колбы встряхивают и фильтруют через 30 минут.

Налить 20 мл фильтрата в колбы по 100 мл и добавьте 20 мл раствора йода, затем добавить 10 мл раствора гидроксида натрия, постоянно помешивая. После закрытия обеих пробирок наложением швов через 20 мин добавить 10 мл раствора соляной кислоты, 5 капель раствора крахмала и титровать раствором тиосульфата натрия до обесцвечивания раствора. 1 мл 0,1 Н раствора тиосульфата натрия соответствует 18,01 мг лактозы. Расчет.

$$X = \frac{(a - b) \cdot K \cdot 18,01 \cdot 50 \cdot 100}{20 \cdot 5}$$

Здесь: X-100 мл лактозы в молоке, мг,%. а - объем раствора тиосульфата натрия, использованный для титрования контрольной пробы, мл; b - количество раствора тиосульфата натрия,

использованного для титрования исследуемой пробы, мл; К - поправочный коэффициент титрования 0,1 Н раствора тиосульфата натрия.

Среднее содержание лактозы в коровьем молоке составляет 4,6%.

Определение содержания витамина С в молоке

Необходимые инструменты: колбы на 50 и 100 мл; пипетки; бюретка.

Реактивы. 1. 2% - ный раствор соляной кислоты. 2. 0,001 Н 2,6 -раствор дихлорфенолиндифенола. 3. Молоко.

Ход работы. Развести 10 мл молока, добавив три объема дистиллированной воды. Колбу на 50-100 мл наполнить 1 мл раствора соляной кислоты и 5 мл разбавленного молока, затем долить водой до 15 мл. Для контрольного образца в колбу добавить 1 мл раствора соляной кислоты и 14 мл воды. Жидкости встряхнуть в колбах и затем титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндифенола до образования светло-розового цвета. Количество 2,6-дихлорфенолиндифенола определяется путем вычитания количества 2,6-дихлорфенолиндифенола, использованного для титрования контрольного образца, путем вычитания количества, использованного для титрования экспериментального образца. Вычисление:

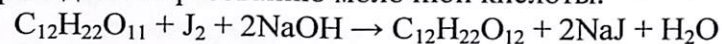
$$X = \frac{b \cdot K \cdot C \cdot 0,088 \cdot 100}{5}$$

Здесь: X - количество витамина С в молоке, мг%, b- 2,6 - поправочный коэффициент титра раствора дихлорфенолиндифенола; С - число, представляющее уровень разбавления молока; 0,088 - количество аскорбиновой кислоты (мг), то есть 0,001 Н используется для титрования 1 мл. 2,6 - соответствует раствору дихлорфенолиндифенола; 5 - количество молока, полученного на титрование, мл; Рассчитать на 100 - мг%.

Ход работы. Взять две пробирки и добавить в первую 3-4 мл ацетата свинца, а во вторую - 3-4 мл раствора сульфата меди. К обоим растворам добавить 1-2 мл молока, в результате чего белки выпадают в осадок.

Качественные реакции молочного сахара

Принцип метода заключается в том, что свободная альдегидная группа в лактозе окисляется йодом в щелочных условиях, что приводит к образованию молочной кислоты.



Необходимые инструменты: колбы 50, 100 мл; пипетки по 5, 10 и 20 мл; бюретка; воронка; фильтровальная бумага.

Реактивы: 1. Молоко. 2. 7% - ный раствор медного купороса. 3. 2% - ный раствор гидроксида натрия. 4. 5% - ный раствор фторита натрия. 5. 5% - ный раствор соляной кислоты. 6. 0,1 Н раствор тиосульфата натрия. 7. 5% - ный раствор крахмала. 8. 0,1 Н раствор йода.

Ход работы. Две колбы по 50 мл наполняют 5 мл раствора сульфата меди, 5 мл раствора гидроксида натрия и 2,5 мл раствора фторида натрия. Затем в первую колбу (опытная) добавляют 5 мл молока, а во вторую (контрольная) 5 мл дистиллированной воды. Колбы встряхивают и фильтруют через 30 минут.

Налить 20 мл фильтрата в колбы по 100 мл и добавьте 20 мл раствора йода, затем добавить 10 мл раствора гидроксида натрия, постоянно помешивая. После закрытия обеих пробирок наложением швов через 20 мин добавить 10 мл раствора соляной кислоты, 5 капель раствора крахмала и титровать раствором тиосульфата натрия до обесцвечивания раствора. 1 мл 0,1 Н раствора тиосульфата натрия соответствует 18,01 мг лактозы. Расчет.

$$X = \frac{(a-b) \cdot K \cdot 18,01 \cdot 50 \cdot 100}{20 \cdot 5}$$

Здесь: X-100 мл лактозы в молоке, мг%. а - объем раствора тиосульфата натрия, использованный для титрования контрольной пробы, мл; b - количество раствора тиосульфата натрия,

использованного для титрования исследуемой пробы, мл; К - поправочный коэффициент титрования 0,1 Н раствора тиосульфата натрия.

Среднее содержание лактозы в коровьем молоке составляет 4,6%.

Определение содержания витамина С в молоке

Необходимые инструменты: колбы на 50 и 100 мл; пипетки; бюретка.

Реактивы. 1. 2% - ный раствор соляной кислоты. 2. 0,001 Н 2,6-раствор дихлорфенолиндофенола. 3. Молоко.

Ход работы. Развести 10 мл молока, добавив три объема дистиллированной воды. Колбу на 50-100 мл наполнить 1 мл раствора соляной кислоты и 5 мл разбавленного молока, затем долить водой до 15 мл. Для контрольного образца в колбу добавить 1 мл раствора соляной кислоты и 14 мл воды. Жидкости встряхнуть в колбах и затем титровать раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до образования светло-розового цвета. Количество 2,6-дихлорфенолиндофенола определяется путем вычитания количества 2,6-дихлорфенолиндофенола, использованного для титрования контрольного образца, путем вычитания количества, использованного для титрования экспериментального образца. Вычисление:

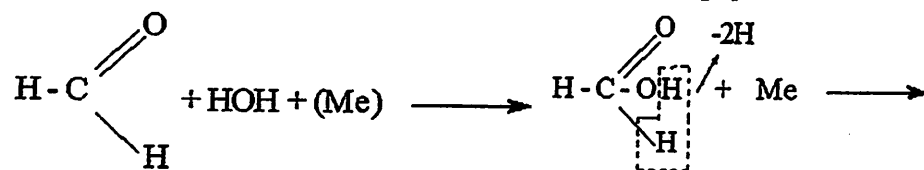
$$X = \frac{b \cdot K \cdot C \cdot 0,088 \cdot 100}{5}$$

Здесь: X - количество витамина С в молоке, мг%, b- 2,6 - поправочный коэффициент титра раствора дихлорфенолиндофенола; С - число, представляющее уровень разбавления молока; 0,088 - количество аскорбиновой кислоты (мг), то есть 0,001 Н используется для титрования 1 мл. 2,6 - соответствует раствору дихлорфенолиндофенола; 5 - количество молока, полученного на титрование, мл; Рассчитать на 100 - мг%.

Ферменты молока

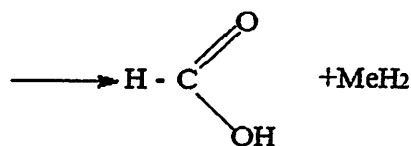
В молоке содержится много ферментов, которые попадают в молоко через молочные железы и микрофлору. В молоке различных животных содержатся ферменты гидролаза (амилаза, липаза, фосфатаза, лактаза и др.), Оксидоредуктаза (пероксидаза, анаэробные дегидрогеназы, каталаза и др.).

Определение фермента альдегиддегидрогеназы. По обесцвечиванию раствора метиленового синего, добавляемого в молоко, можно узнать, что в нем присутствует фермент альдегиддегидрогеназа. Под действием этого фермента метиленовый синий превращается в переработанный бесцветный лейкоформ:



Формальдегид

Метиленовый синий окисленная форма



Муравьиная кислота восстанавливается форма бесцветная

Альдегиддегидрогеназа в очень небольших количествах проникает в молоко через молочные железы. По мере увеличения микрофлоры в молоке увеличивается и количество ферментов.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; водяная баня, градусник; пипетки.

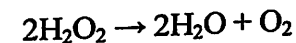
Реактивы: 1. 0,5% - ный раствор формальдегида. 2. Раствор метиленового синего (0,001%). 3. молоко.

Ход работы. В одну пробирку налить 2-3 мл кипяченого молока (контрольная), в другую - 2-3 мл свежего молока (опытная).

К обоим растворам добавить 1 мл раствора формальдегида и 1 мл раствора метиленового синего и поставить на водяную баню

70°C - реакция наблюдается. Смесь в растворе свежего молока обесцвечивается, а смесь в растворе кипяченого молока не обесцвечивается, так как в кипяченом молоке этот фермент теряет свою активность.

Определение фермента каталазы. Под действием каталитического фермента пергидрол распадается на воду и молекулярный кислород:



При добавлении пергидрола в молоко выделяется кислород, что указывает на присутствие фермента каталазы.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки.

Реактивы. 1. Молоко. 2. 1% - ный раствор пергидрола.

Ход работы. В одну пробирку наливают 2-3 мл молока и столько же 1% раствора пергидрола. Под действием каталазы выделяются пузырьки кислорода. Второй раствор заливают 2-3 мл кипяченого молока и 2-3 мл раствора пергидрола. В кипяченом молоке фермент денатурируется под воздействием высоких температур, поэтому ферментативная реакция в этом растворе отсутствует.

Определение содержания кальция в молоке

Около 1/6 всех минералов в молоке составляют соединения кальция. Среднее количество кальция в молоке животных составляет: 140 мг% у коров; 142 мг у коз и 83 мг% у лошадей.

Молоко - это пища, богатая кальцием и фосфором. 78% кальция в молоке содержится в виде неорганических солей, 22% - в виде кальция в сочетании с казеиновым белком.

Количество кальция в молоке основано на определении по методу -Ваарда.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками; пипетки; центрифуга; водяная баня; цилиндры 20, 25 мл.

Реактивы. 1. Молоко - разбавить в 10 раз, в цилиндр на 25 мл добавить 1 мл молока и 9 мл воды и перемешать. 2. 4% - ный раствор щавелевой кислоты. 3. 2% - ный раствор нашатырного

спирта. 4. 1 Н раствор серной кислоты. 6. 0,01 Н раствор перманганата калия (KMnO_4).

Ход работы. Добавить 1 мл разбавленного молока к одному центрифужной пробирке, 1 мл воды ко второму раствору, затем добавить 0,5 мл раствора оксалата аммония к обоим растворам, перемешать и оставить на 30 минут. Затем центрифугируют 10-15 минут (2500 об / мин). После слива фильтрата в обе пробирки добавляют к осадку по 4 мл 2% раствора аммиака и центрифугируют еще 8-10 минут. Осадок оксалата кальция не растворяется в щелочных условиях и хорошо растворяется в минеральных кислотах. Оба раствора заливаются 1 мл 1 Н раствора серной кислоты и хорошо перемешиваются стеклянной палочкой. Затем растворы (палочкой) помещают на кипящую водяную баню на 3-4 минуты. Горячий раствор титруют 0,01 Н раствором KMnO_4 до образования розовой окраски.

Количество кальция в молоке (мг%) рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{0,2 \cdot (0 - K) \cdot 100}{0,1}$$

Где: 0 - количество 0,01 Н раствора KMnO_4 , использованного для титрования экспериментального образца; K- Количество 0,01 раствора KMnO_4 , использованного для титрования контрольного образца; 0,2 -мл количество кальция, т.е. 1 мл соответствует раствору 0,01 Н KMnO_4 , мг; 100-для расчета мг%; 0,1- количество молока в разбавленном молоке, мл.

Определение кислотности молока

Определение кислотности молока имеет большое практическое значение, поскольку оно часто портится. Когда молоко хранится долгое время, оно становится горьким и в результате накапливается молочная кислота. Кислотность молока выражается в градусах. Объем данных на мл 0,1 Н щелочи, использованной для нейтрализации 100 мл исследуемого молока, соответствует 1°С. Свежее коровье молоко имеет температуру

15-18°С, стоячее молоко - 20-22 °, сгущенное молоко при кипячении - 24-27 °.

Необходимые инструменты: колбы 50-100 мл; пипетки; бюретка.

Реактивы. 1. Гидроксид натрия: 0,1 Н раствор. 2. 0,1% - ный раствор фенолфталеина в спирте. 3. молоко.

Ход работы. Заполнить колбу 10 мл исследуемого молока, 20 мл дистиллированной воды и 2-3 каплями раствора фенолфталеина, затем встряхнуть колбу и титровать раствором 0,1 Н гидроксида натрия до образования розовой окраски.

Расчет: количество щелочи, израсходованной на титрование, умножается на 10 (для расчета на 100 мл). Это число указывает на кислотность молока в градусах.

ГЛАВА XIII. МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ

Ключевые слова: мышечная ткань, миогены, креатин, глюкоза, гликолиз, аминокислоты, витамины, инозит, ферменты, белки, макро-микроэлементы

Мышечная ткань является важным компонентом мяса и делится на три типа: гладкая, поперечная полосатая: сердечная мышца и скелетная мышца. Мышцы выполняют жизненно важные физиологические функции, такие как циркуляция крови, дыхание, поддержание тонуса сосудов и другие процессы. Мышечный состав формируется следующим образом (%): вода - 72-82; белки 16,5-20,9; липиды (количество липидов варьируется, потому что зависит от грудного вскармливания); азотистые вещества (около 1% АТФ, АДФ, АМФ, креатин, креатинин, фосфокреатин, карнозин и др.), безазотистые вещества (ликоген - 0,3-0,4; глюкоза, продукты гликолиза, гликогенолиз и цикл трикарбоновых кислот), витамины макро и микроэлементы (-1, -1,5).

Белки являются одним из наиболее важных компонентов мышечной ткани и делятся на саркоплазматические, миофибриллярные и стромальные белки. Саркоплазматические белки включают миогены, миоалбумины, миоглобулины и миоглобин. Миогены - это белки, которые составляют 30% мышечных белков. Миогены делятся на два: миогены А и В. Миогены А являются частью фермента альдолазы, миогены В не могут иметь каталитического действия.

Миоглобулины нерастворимы в воде и выводятся в солевых растворах. Они входят в хромопротеины и состоят из белков и драгоценных камней. Молекулярная масса 17000. Миоглобин, как и гемоглобин, имеет свойство связывать и доставлять молекулярный кислород.

Миофибриллярные белки включают миозин, актин, тропомиозин и тропонин. Белки составляют 50% всех белков, участвующих в сокращении мышц. Миозин имеет свойство разрушать АТФ. Он связывается с актином, и восстановление восстанавливающего комплекса-актомиозина происходит за счет химической энергии, при которой АТФ расщепляется миозином в

присутствии иона магния с образованием АДФ и неорганической фосфатной кислоты.

Белок актина растворим в воде, образует комплекс с миозином и составляет 15% всех белков. Белки стромы составляют 10% мышечных белков и не растворяются в воде и физиологических растворах. В эту группу белков входят коллаген и эластины. При извлечении извлеченной мышцы вещества, не содержащие белков, легко превращаются в водный раствор.

Мышечная ткань содержит различные ферменты: например, катепсины, липазы, оксидоредуктазы.

Выделение миозина

Миозин (актомиозин) - это мышечный белок, который выделяется из мышечной ткани с помощью солевых растворов. Полученные экстракты разбавляют водой или подвергают диализу и осаждают. Миозин составляет 55% мышечного белка. Изoeлектрическая точка этого белка проявляется при pH 5,5.

Необходимые инструменты: ледяная баня; ножницы; колбы по 1000 мл; центрифуга; дока.

Реактивы. 1. 0,15 М фосфатный буфер готовят в 0,3 М растворе KCl с pH 6,5. 2. Дистиллированная вода, охлажденная до 0°C.

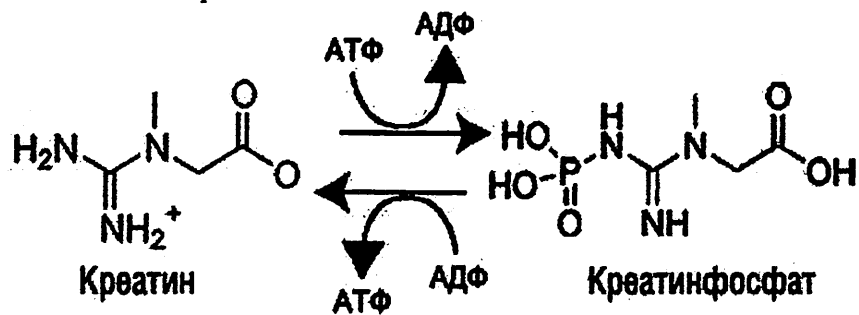
Ход работы. Свеже забитое животное отделяется от мышечной ткани. Этот процесс проводят при -2 °C. 100 г раздробленной мышцы экстрагируют, добавляя 300 мл 0,3 М раствора KCl в 0,15 М фосфатном буфере. Экстракцию проводят перемешиванием при 10°C в течение 10 минут. Затем к смеси добавляют воду комнатной температуры, доводят объем до 1000 мл и фильтруют через марлю. Затем фильтрат следует перемешать через сито до образования осадка актомиозина (от одного до двух часов). Осадок центрифугируют и отделяют.

Затем к жидкости добавляют 1500 мл дистиллированной воды, охлажденной до 0°C, при перемешивании в течение 10 минут и оставляют при 0 °C на 2 часа. В последнем процессе осадок миозина центрифугируется для отделения миозина и определения его изoeлектрической точки.

Определение креатина и креатинфосфата в мышечной ткани

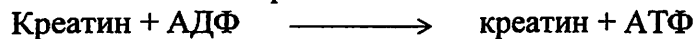
Креатин - важный компонент поперечной скелетной мышцы. Содержание креатина в скелетных мышцах 400-500 мг%, креатина в сердечной мышце в 2-3 раза меньше. Ткани головного мозга содержат около 100 мг%, креатинин в паренхиматозных органах 10-50 мг%.

В мышечной ткани креатин находится в свободном состоянии и в виде производных фосфора (креатинфосфат, фосфокреатин). Креатин-фосфат - макроэргическое соединение, являющееся источником энергии в клетке.



Сокращение мышц всегда происходит за счет энергии, то есть за счет АТФ - регенерация АТФ происходит за счет передачи богатой энергией группы креатинфосфата в присутствии фермента креатинкиназы. Количество креатинфосфата в мышцах составляет 30-70 мг%,

креатинкиназа



Количество свободного креатина и креатинфосфата в мышечной ткани зависит от физиологического состояния ткани.

Определение креатина. Определение свободного креатина проводится в растворе, не содержащем белков, в результате цветной реакции с диацетилом в присутствии α -нафтола.

Необходимые инструменты: штатив с пробирками, ледяная баня, центрифуга; термостат.

Реактивы. 1. HClO_4 - 0,5 М раствор, 2. KOH - 2 М раствор. 3. 0,05% - ный раствор диацетила; Для приготовления этого реагента берут 1,6 г диметилглиоксима, добавляют 200 мл 5 Н

раствора серной кислоты и нагревают колбу на песочной бане. После полного растворения жидкость переносят в колбу на 100 мл и доводят ее до 100 мл дистиллированной водой. 1% - ный раствор диацетила хранят в холодильнике, перед употреблением разбавляют водой.

Приготовление безбелкового экстракта (экстракта). Обнаружение соединений фосфора проводят при 0 - 4 °С. Взять 1-2 г мышечной ткани и заморозить в жидком азоте. Затем его измельчить в ступке и вылить в колбу на 200-300 мг. Объем предварительно охлажденного 0,5 М раствора HClO_4 доводят до 10 мл, после тщательного перемешивания его центрифугируют для осаждения белков. Взять 7-8 мл безбелкового раствора и нейтрализовать 2 М раствором KOH (с учетом количества KOH , использованного для нейтрализации). Затем раствор охлаждают и выпавший в осадок HClO_4 отфильтровывают. Этот фильтрат можно использовать для определения креатина и креатинфосфата.

Ход работы. Создан откалиброванный график для определения количества креатина. Для этого взять несколько пробирок и добавить 1 мл стандартного раствора, содержащего 0,1-0,5 мкмоль креатина: 1 мл 1% - ного раствора щелочи α -нафтола и 0,5 мл 0,05% - ного раствора диацетила. Объем образцов доводят до 5 мл дистиллированной водой, затем хорошо перемешивают и оставляют в темном месте при комнатной температуре на 30 минут. Затем спектрофотометр измеряет оптическую плотность на длине волны 540 нм. По полученным результатам строится график.

Та же процедура используется для определения креатина в тестируемых образцах. После определения оптической плотности образца количество креатина определяется по графику.

Определение креатинфосфата на основе креатина

Определение креатинфосфата основано на том факте, что он расщепляется на неорганическую фосфатную кислоту и креатин. Под действием кислого раствора молибдата аммония. Оптическую плотность цвета, образованного пикриновой кислотой в

щелочной среде, определяют путем измерения с помощью спектрофотометра.

Реактивы. 1. 1,4% - ный раствор молибдата аммония в 2 Н серной кислоте. 2. 0,7% - ный раствор молибдата аммония в 1 Н серной кислоте. 3. 2 Н раствор гидроксида натрия. 4. Насыщенный раствор пикриновой кислоты. 5. Стандартный раствор креатина (1 мл этого раствора содержит 5 мкмоль креатина). 6. Универсальный индикатор.

Ход работы. Берут 1-2 мл нейтрализованного безбелкового раствора, добавляют в пробирку и добавляют равный объем раствора 1,4% - ного молибдата аммония в 2 Н серной кислоте. После встряхивания раствор оставляют в термостате при 37°C на 40 минут. Затем его фильтруют, отбирают 1,5-3 мл фильтрата и нейтрализуют раствором 2 Н гидроксида натрия. К раствору добавляют 0,15 мл 2 Н раствора гидроксида натрия и 0,25 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты и доводят до 5 мл дистиллированной водой. Теперь нужно перемешать и оставить на 10-15 минут до образования цвета.

Затем спектрофотометр измеряет оптическую плотность на длине волны 540 нм. В зависимости от оптической плотности образца количество креатина можно определить по откалиброванному графику. Для построения откалиброванного графика добавить к раствору 1 мл 0,1-0,5 мкмоль стандартного раствора креатина и работать в условиях, описанных выше.

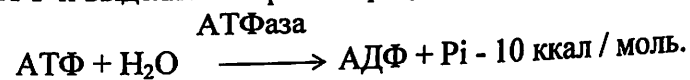
Концентрация креатинфосфата (X мг%) в мышцах рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{a \cdot 10 \cdot 100}{2 \cdot C}$$

Где: a - количество креатина в экспериментальной пробе, определенное по калиброванному графику, мг; 10 - объем гомогената ткани; 100 - коэффициент расчета в процентах; 2 - объем фильтрата, полученный для определения; C - масса мышечной ткани, мг.

Определение активности аденозинтрифосфатазы в мышечной ткани

Фермент Mg^{2+} АТФ-аза катализирует гидролитический распад АТФ и выделяет энергию в результате этой реакции:



Активность этого фермента указывает на количество потребляемого в тканях АТФ.

Принцип метода. Активность ферментативной реакции определяется количеством неорганической фосфатной кислоты, образующейся при разложении АТФ под действием АТФ-аза.

Необходимые инструменты: гомогенизатор, аналитические весы, ножничные пипетки на 1 и 2 мл, штатив с пробирками, воронки, фильтровальная бумага, термостат, спектрофотометр; центрифуга.

Реактивы. 1. Мышечная ткань. 2. Раствор 0,25 М сахарозы в трис-НСl (рН 7,4). 3. 20% - ный раствор трихлоруксусной кислоты. 4. Инкубационная смесь: Трис-НСl (рН-7,5) - 0,2 М, КСl - 0,05 М, NaCl - 0,58 М, ЭДТА - 0,01 М, $MgCl_2$ - 0,02 М, АТФ - 0,02 М. 5. Буферная смесь, рН 4 - эту буферную смесь готовят из раствора 0,2 М уксусной кислоты и 0,4 М $CH_3COONa \cdot 3H_2O$.

6. 1% - ный раствор молибдата аммония. 7. 1% - ный раствор аскорбиновой кислоты в 1 М купоросе.

Ход работы. 100 мг мышечной ткани измельчают и гомогенизируют с 5 мл 0,025 М раствора сахарозы трис - НСl (рН 7,4). Полученный гомогенат фильтруют через марлю. Добавляют 2 мл гомогената в две пробирки. Первая пробирка - это контрольный образец, в который добавлен 1 мл 20% - ного раствора трихлоруксусной кислоты. Затем к обоим растворам добавляют 2 мл инкубационной смеси и помещают в термостат при 37°C на 30 минут - инкубация.

По окончании инкубационного периода к исследуемой пробе добавляют 1 мл 20% - ного раствора уксусной кислоты. Затем объем жидкости в пробирках доводят до 10 мл раствором 0,25 М сахарозы и центрифугируют со скоростью 2500 обр / мин в

течение 10 минут. Осадок сливают и проводят окрашенную реакцию с жидкой частью.

Для этого берут 1 мл центрифуги и добавляют к ней 2 мл раствора молибдата аммония, 1 мл раствора аскорбиновой кислоты в сульфате меди и 6 мл ацетатного буфера. Как только растворы смешаются, оставьте на 30 минут. Полученную интенсивность цвета затем измеряют на спектрофотометре при длине волны 750 нм.

Активность фермента АТФ аза определяется количеством микромолей, которая показывает, сколько АТФ фермент в 1 г ткани может разрушить за 1 минуту. Активация фермента АТФазы рассчитывается следующим образом (мкмоль /Р_i / г / мин).

$$E = \frac{(a-b) \cdot 5}{0,031 \cdot C \cdot 30}$$

Где: а - количество фосфора в экспериментальной пробе (это количество находится на калиброванном графике), мг; b - количество фосфора в контрольной пробе (это количество также находится на калиброванном графике), мг; 0,031- количество Р_i (мг), которое образуется при разложении одного мкмоль АТФ под действием АТФазы, 5 - объем гомогената, мл; С - вес ткани, г; 30 - время инкубации.

Создание калиброванного графика. Для этого готовится стандартный раствор, в котором содержится 0,025 мг фосфора на 1 мл раствора. Из этого раствора готовят фосфор различной концентрации: 0,0123 мг; 0,025 мг, 0,0373 мг, 0,050 мг; 0,0623 мг; 0,0746 мг; 0,0869 мг, 0,0982 мг; 1,105 мг.

Для этого в пробирки добавляют 0,5, 1,0; 1,5, 2,0; 2,5; 3,0, 3,5; 4,0; Заливают 4,5 мл стандартных растворов. Затем проводят описанную выше цветовую реакцию, и через 30 минут оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 750 нм. Затем по результатам создается калиброванный график. По этому графику определяется количество фосфора в экспериментальном и контрольном образцах.

Контрольные вопросы

1. Анаэробный распад углеводов.
2. Объясните цикл Кребса.
3. Энергетический выход цитратного цикла.
4. Пентозофосфатный цикл.
5. Что такое общий энергетический баланс обмена углеводов.
6. Роль углеводов в энергообеспечении организма.

ГЛАВА XIV. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОСФОРА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

Ключевые слова: фосфор, фосфолипид, аскорбиновая кислота, эфир, фосфолипид, эфир, спирт

Растения содержат множество соединений фосфора, которые в основном состоят из неорганического и органического фосфора. Неорганические фосфаты, помимо действия в качестве буфера в тканях и клетках растений, также являются основным транспортом, который усваивается растениями и перемещает их по всему телу. Они также являются источником органических фосфатов.

Органический фосфор существует в двух разных формах: растворимый в кислоте и нерастворимый в кислоте. Кислото-растворимые фосфорные соединения включают нуклеотиды, фосфорные эфиры сахаров: кислотно-нерастворимые фосфорные соединения включают фосфолипиды, нуклеиновые кислоты и другие. Каждое из соединений фосфора можно определить индивидуально или в целом.

Из ряда соединений при колориметрическом определении общего фосфора; эйхеноген, амидол, аскорбиновая кислота и другие.

Ход работы. 50-200 мг сухого растительного материала экстрагируют и сжигают в трубке Келделла небольшого объема. Для этого в колбу наливают 2-3 мл концентрированной серной кислоты и перемешивают 1-2 мин. Затем его медленно нагревают, добавляя 0,2-0,3 мл перекиси водорода. Если жидкость в трубке нагреть быстро, фосфор может частично потеряться. Как только раствор станет коричневым, добавить еще 2-5 капель перекиси водорода и продолжать нагревание. Реакция останавливается обесцвечиванием жидкости в пробирке. После этого еще раз энергично нагревают 15-20 минут. Тот факт, что жидкость в пробирке не меняет цвет, означает, что реакция завершена.

Затем колбу охлаждают, находящуюся в ней жидкость переливают в колбу на 100 мл и доводят до краев дистиллированной водой. Общий фосфор в смеси определяется колориметрическим методом.

Реактивы: растительный материал, концентрированный раствор серной кислоты, перекись водорода.

Определение содержания фосфора с помощью эйхеногена

Этот метод был предложен Фиске и Суббару и основан на образовании фосфорномолибдата аммония в присутствии молибдата аммония в кислой среде фосфорной кислоты. Это сложное соединение вместе с эйхеногеном образует синий цвет. Интенсивность цвета пропорциональна количеству фосфорной кислоты.

Ход работы. Берут 1 мл смеси, приготовленной описанным выше способом, и добавляют ее к первому раствору. Для нейтрализации добавляют 2 капли фенолфталеина и 20% - ный раствор гидроксида натрия до образования розового цвета. Затем щелочь нейтрализуют 1 Н серной кислотой до исчезновения окраски. Заполняют пробирку дистиллированной водой до тех пор, пока объем жидкости не достигнет 3,5 мл. Второй (контрольный) раствор заливается 3,5 мл дистиллированной воды. К обоим растворам добавляют 1,25 мл 1,25% - ного раствора молибдата аммония в 2,5 Н серной кислоте, 0,25 мл раствора эйхеногена и хорошо перемешивают. Оставить на 30 минут при комнатной температуре. Цвет раствора, образовавшегося в результате реакции, измеряется в ФЭК. Количество фосфора определяется по калибровочной линии.

Реактивы: 1% - ный раствор фенолфталеина, 1 Н раствор серной кислоты, 1,25% - ный раствор молибдата аммония в 2,5 Н серной кислоте. Раствор эйхеногена. 15 г гидросульфита натрия и 0,5 г сульфита натрия растворяют в 70 мл дистиллированной воды и фильтруют. После охлаждения его фильтруют и доливают водой до 100 мл. Эйхеноген (1,2,4-амино-нафтолсульфоновая кислота).

Определение фосфора с помощью аскорбиновой кислоты

Определение фосфора с помощью аскорбиновой кислоты было предложено Скулачевым, что позволяет обнаруживать очень

небольшие количества фосфора. Этот метод особенно важен при исследовании материалов, содержащих лабильные органические соединения фосфора вместе с неорганическим фосфором. Потому что при этом методе лабильные органические соединения более стабильны.

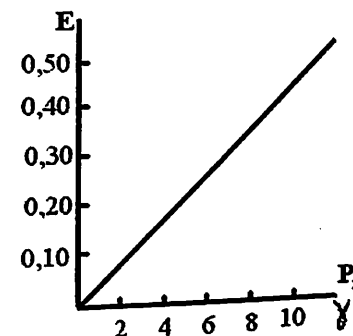
Ход работы. Берут 0,1 мл смеси, приготовленной описанным выше способом, добавляют 1,4 мл реагента В, перемешивают и инкубируют при 45°C в течение 20 минут. Затем пробирка охлаждается и измеряется ФЭК (фильтр красного света). В тестовый раствор вместо тестовой смеси добавляют 0,1 мл воды. Количество фосфора определяется по калибровочной линии.

Реактивы: Реагент А, 10% - ный раствор аскорбиновой кислоты. Реагент В, 0,42% - ный раствор молибдата аммония в 1 Н серной кислоте. Реагент В всегда должен быть свежеприготовленным. Дигидрофосфат калия.

Построение калибровочного графика. Для определения содержания фосфора в испытуемом материале сначала проводится калибровочная линия. Для этого используются стандартные растворы с известной концентрацией фосфора.

Стандартный раствор готовят из кристаллизованной соли дигидрофосфата калия. Для приготовления основного раствора 0,1756 г соли KH_2PO_4 экстрагируют и растворяют в 1 л воды. Берут 25 мл основного раствора, переливают в другую мерную колбу на 1 л и доливают до отметки дистиллированной водой. 1 мл приготовленного таким образом раствора содержит 0,0001 мг фосфора. На 5 пробирке вносим 0,2 ; 0,4; 0,6; 0,8; 1 мл стандартного раствора с концентрацией фосфора соответствует 0,00002; 0,00006; 0,00008; 0,0001 мг. Растворы нейтрализуют каустической содой на фенолфталеине и используют реагенты того же метода, что и при их обработке одним из вышеуказанных методов. Затем определяют оптическую плотность в ФЭК, оставляя его при комнатной температуре на 30 минут. Обычно используются кюветы 5 или 10 мм. При нанесении калибровочной линии количество фосфора приходится на ось абсцисс, а интенсивность (экстинкция) цвета раствора - на ординату. Калибровочная линия, предназначенная для определения фосфора.

Калибровочная линия, предназначенная для определения фосфора.



Определение некоторых фракций соединений фосфора

Способы фракционирования различных соединений фосфора в растениях разнообразны. Но все они основаны на одном принципе - последовательном разделении соединений фосфора с использованием разных растворителей, гидролизе определенных их групп и определении количества фосфата указанными выше методами

Разделение кислоторастворимого фосфора

Фосфор, относящийся к этой группе, проводят в холодных условиях при 0, +2 ° С. Измельченный растительный материал (2 г свежих листьев, 0,5 - 1 г семян) сливают в центрифужный раствор объемом 50 мл и добавляют к нему 15 мл 5% -ного раствора охлажденной хлорной кислоты (HClO_4) до его мелкого измельчения и образования однородной массы. Пробирку плотно закрывают пеной, переливают в ведро со льдом и встряхивают 20 минут с помощью специального вибрационного устройства. Затем центрифугируют в течение 10 минут со скоростью 4000-5000 в минуту. Объем жидкости переливают в колбу на 50 мл, осадок снова смешивают с 5% -ным раствором хлорной кислоты, повторяют описанный выше процесс и переливают жидкость в колбу на 50 мл. Этот процесс повторяется еще раз, пока общий объем кислой жидкости в колбе не будет доведен до отметки 50 мл с дистиллированной водой.

В кислотно-растворимой фракции, выделенной таким образом, находятся неорганические фосфоры, легкогидролизуемые фосфорорганические соединения (карбоксилфосфаты, лабильные пирофосфаты, аминокислоты, глюкозо-1-фосфат) и стабильные эфиры фосфорной кислоты (гексоза-6-фосфат, триозафосфат и др.). Полученный экстракт содержит растворимый в кислоте неорганический фосфор (без сжигания экстракта) и фосфор, который высвобождается после 10 минут кислотного гидролиза и растворяется в легкогидролизуемой кислоте.

Определение общего фосфора, растворимого в кислоте

Поместить 10 мл кислого экстракта в колбу Кельдаля на 50 мл и добавить 3 мл концентрированного сульфата и 2 мл 57% - ного хлорной кислоты. Когда экстракт полностью сгорит, его переливают в мерную колбу на 25 мл и доводят до краев дистиллированной водой. Нейтрализовать 2 мл раствора в пробирке или цилиндре на 10 мл и определить фосфор одним из описанных выше методов.

Количество фосфора рассчитывается следующим образом. Взять 2 г свежесрезанных листьев растения. Общий объем экстракта 50 мл. Взять 10 мл экстракта для сжигания. Когда объем экстракта доведен до 25 мл.

Из этого образца берут 2 мл пробы для определения фосфора. В пробе, взятой вдоль калибровочной линии, обнаружено 0,010 мг фосфора. Общее количество растворимого в кислоте фосфора определяется следующим образом.

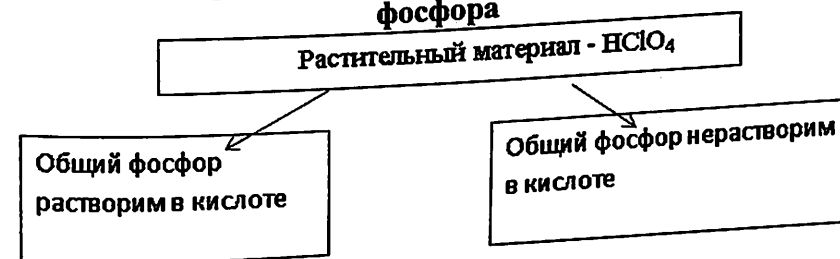
$$X = \frac{0,010 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{2 \cdot 10 \cdot 2} = 31,25 \text{ мг}$$

Это означает, что 100 г влажных листьев содержат 31,25 мг общего фосфора, растворимого в кислоте.

Определение неорганического фосфора, растворимого в кислоте

Берут 5 мл основного экстракта (после обработки анализируемого материала хлорной кислотой) и переливают в мерную колбу на 10 мл. Сверху добавляются реагенты, необходимые для колориметрического определения фосфора (см. Методы определения количества фосфора). Затем количество фосфора определяется по калибровочной линии.

Схема определения отдельных фракций соединений фосфора



Определение неорганического фосфора, растворимого в легкогидролизуемой кислоте

Берут 5 мл основного экстракта, переливают в колбу на 50 мл и добавляют 5 мл 2 Н раствора соляной кислоты. Колбу закрывают пробкой, снабженной охладителем воды, и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 10 минут. Затем трубку быстро охлаждают холодной водой. Берут 5 мл приготовленного таким образом гидролизата и переливают в мерную колбу на 10 мл. Кроме того, фосфор определяется с помощью колориметра, добавляя реагенты, необходимые для определения фосфора.

Разница между легкогидролизуемым фосфором и неорганическим фосфором равна количеству лабильного фосфора. Лабильные фосфоры содержат нуклеотиды и трифосфаты, глюкозо-1-фосфат и другие соединения.

Разница между легкогидролизуемым фосфором и фосфором, растворимым в общей кислоте, равна количеству стабильных

эфиров фосфора (стабильного фосфора). К ним относятся триофосфаты, гексозо-6-фосфат, гексофосфат инозита (фитин) и другие.

Разница между общим кислотнорастворимым фосфором и неорганическим фосфором равна количеству растворимого в кислоте органического фосфора.

Разделение фосфолипидной фракции

После отделения кислотнорастворимого фосфора осадок, оставшийся в центрифужной пробирке, промывают 5-10 мл 80% - ного раствора этилового спирта, затем повторно экстрагируют смесью спиртового эфира (3:1) в течение 36-40 часов. Затем экстракты, содержащие фосфорлипид, собирают в колбу. Его общий объем должен составлять 35 мл. Экстракт центрифугируют при 3000 об / мин в течение 10 минут. Раствор переливают в колбу Кельдаля и медленно нагревают для удаления растворителей.

К остатку в колбе добавляют 5 мл смеси сульфатно-хлорной (3:2) кислоты и сжигают. Прижигание нужно производить осторожно, так как в первые минуты раствор в тюрбике сильно пенится. По окончании обжига бесцветную жидкость из колбы переливают в мерную колбу на 25 мл и доводят до краев дистиллированной водой. Берут 2 мл этого раствора, добавляют необходимые реагенты и определяют количество фосфора.

Определение фосфора в нуклеиновой кислоте

После отделения растворимого в кислоте фосфора и фосфолипидов остаток в растворе тщательно смешивают с 20 мл 1 Н раствора каустической соды и выдерживают в термостате при 37°C в течение 18 часов. Затем его центрифугируют при 4000 скоростях в течение 20 минут. Общий фосфор определяется из щелочного раствора. Последующие работы проводить в холодных условиях.

Для осаждения ДНК 5 мл раствора выливают в центрифужную пробирку и охлаждают. К охлажденному раствору по каплям добавляют 6 Н раствор соляной кислоты до тех пор, пока рН не

достигнет 6,6-6,8. Чтобы растворить ДНК, добавляют (охлаждают) 5 мл 1 Н раствора хлорной кислоты и хранят в холодильнике в течение 3 часов до полного осаждения ДНК. ДНК отделяют центрифугированием осадка на 4000 скоростей в течение 20 минут. Компоненты РНК остаются в растворе. Из этого раствора определяют общий и неорганический фосфор.

Экстракция нуклеиновых кислот

ДНК осаждают 10 мл 0,5 Н раствора хлорной кислоты при 100°C в течение 20 мин. извлекается дважды во время. Каждый раз раствор 10 мин. Во время которого его центрифугируют со скоростью 3000. Растворы добавляют, чтобы определить в нем общий и неорганический фосфор. Общий фосфор (P_1 - P_2) в нуклеиновой кислоте обнаруживается путем определения общего фосфора (P_1) в щелочном растворе и общего фосфора (P_2) в растворе после преципитации ДНК.

В щелочном растворе нуклеиновых кислот ДНК не изменяется, но РНК частично расщепляется на мононуклеотиды. Фосфор в РНК (P_2 - P_3) определяется путем определения общего фосфора (P_2) в растворе после осаждения ДНК и неорганического фосфора (P_3) в растворе.

Фосфор в ДНК равен разнице между общим фосфором (R_4) в растворе, оставшимся после экстракции компонентов ДНК, и неорганическим фосфором в растворе (P_4 - P_5).

Реактивы: 5%- и 57% -ные раствор $HClO_4$, концентрированный раствор серной кислоты, 2 Н и 6 Н раствор соляной кислоты, 0,5 Н и 1 Н раствор хлорной кислоты, 1 Н раствор гидроксида натрия, спирт этиловый 80% - и и 96 % - ный раствор, эфир.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приготовление буферных растворов

Фосфатно-цитратный буфер, pH 2,2 - 8,0.

Для приготовления раствора $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, относительная молекулярная масса 178,05, 0,2 М, растворяют 35,61 г соли в 1 л воды.

Для приготовления раствора лимонной кислоты 0,1М, с относительной молекулярной массой 210,14, 0,1 М растворяют 21,018 г кислоты в 1 литре воды.

pH	0,2 М Na_2HPO_4 , мл	0,1 М цитратная кислота, мл	pH	0,2 М Na_2HPO_4 , мл	0,1 М цитратная кислота, мл
2,2	0,40	19,60	5,2	10,72	9,28
2,4	1,24	18,76	5,4	11,15	8,85
2,6	2,18	17,82	5,6	11,60	8,40
2,8	3,17	16,83	5,8	12,09	7,91
3,0	4,11	15,89	6,0	12,63	7,37
3,2	4,94	15,06	6,2	13,22	6,78
3,4	5,70	14,30	6,4	13,85	6,15
3,6	6,44	13,56	6,6	14,55	5,45
3,8	7,10	12,90	6,8	15,45	4,55
4,0	7,71	12,29	7,0	16,47	3,53
4,2	8,82	11,72	7,2	17,39	2,61
4,4	8,82	11,18	7,4	18,17	1,83
4,6	9,35	10,65	7,6	18,73	1,27
4,8	9,86	10,14	7,8	19,15	0,85
5,0	10,30	9,70	8,0	19,45	0,55

Буфер бората (0,2 М), pH 7,4-9,0.

Тетраборат натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Мол. масса - 381,43. 19,072 г соли тетрабората натрия растворяют в 1 литре воды. Молекулярная масса борной кислоты 61,84. 12,37 г борной кислоты растворяют в 1 л воды.

pH	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 М, мл	Боратная кислота 0,2 М, мл	pH	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 М, мл	Боратная кислота 0,2 М, мл
7,4	1,0	9,0	8,2	3,5	6,5
7,6	1,5	8,5	8,4	4,5	5,5

7,8	2,0	8,0	8,7	6,0	4,0
8,0	3,0	7,0	9,0	8,0	2,0

Ацетатный буфер (0,2 М), pH 3,6-5,8 Ацетат натрия, относительная молекулярная масса = 136,09

pH	Ацетат натрия 0,2 М, мл	Ацетатная кислота 0,2 М, мл	pH	Ацетат натрия 0,2 М, мл	Ацетатная кислота 0,2 М, мл
3,6	0,75	7,25	4,8	5,90	4,10
3,8	1,12	8,80	5,0	7,00	3,00
4,0	1,80	8,20	5,2	7,90	2,10
4,2	2,65	7,35	5,4	8,60	1,40
4,4	3,70	6,30	5,6	9,10	0,90
4,6	4,90	5,10	5,8	9,40	0,60

Трис-буфер (0,05 М), pH 7,2-9,1.

Относительная молекулярная масса триса составляет 121,14, а объем раствора доводят до 100 мл дистиллированной водой.

pH		Трис 0,2 М, мл	Хлоридная кислота, 0,1 М, мл	H_2O , мл
23°C	37°C			
7,20	7,05	25	45,0	До 100мл
7,36	7,22	25	42,5	—
7,54	7,40	25	40,0	—
7,66	7,52	25	37,5	—
7,77	7,63	25	35,0	—
7,87	7,73	25	32,5	—
7,96	7,82	25	30,0	—
8,05	7,90	25	27,5	—
8,14	8,00	25	25,0	—
8,23	8,10	25	22,5	—
8,32	8,18	25	20,0	—
8,40	8,27	25	17,5	—
8,50	8,37	25	15,0	—
8,62	8,48	25	12,5	—
8,74	8,60	25	10,0	—
8,92	8,78	25	7,5	—
9,10	8,95	25	5,0	—

Коэффициент разделения аминокислот с помощью тонкослойной и бумажной хроматографии

Аминокислоты	Разные ценности в различных растворах			
	1	2	3	4
Глицин	0,40	0,26	0,17	0,08
Аланин	0,59	0,38	0,24	0,13
Серин	0,31	0,27	0,16	0,08
Цистеин		0,07	0,08	0,02
Цестин	0,22	0,08	0,05	-
Метеонин	0,79	0,55	0,44	0,25
Треонин	0,49	0,35	0,17	0,13
Валин	0,79	0,60	0,45	0,24
Лейцин	0,82	0,73	0,61	0,41
Изолейцин	0,83	0,72	0,59	0,37
Аргинин	0,54	0,20	0,10	0,05
Лизин	0,46	0,14	0,08	0,03
Глутамат	0,29	0,30	0,17	0,03
Аспартат	0,13	0,24	0,16	0,02
Фенилаланин	0,84	0,68	0,53	0,34
Тирозин	0,58	0,45	0,24	0,24
Гистидин	0,66	0,20	0,10	0,13
Триптофан	0,75	0,50	0,43	0,17
Пролин	0,88	0,43	0,30	0,13

- 1) фенол- вода (4 г: 1)
- 2) н-бутанол - ацетоновая кислота - вода (4: 1: 1)
- 3) н- бутанол - уксусная кислота - вода (4: 5: 5)
- 4) н -бутанол - этанол - вода (4: 1: 4)

Охлаждающие смеси

Соли	Количество солей, г	Количество снега или льда, г	Максимальная низкая температура
MgSO ₄	23,4	100	- 3,9
NH ₄ Cl	30,0	100	- 15,8
N ₄ NO ₃	45,0	100	-17,3
Na Cl	30,4	100	- 21,2
Na Cl	27,5	100	- 33,6
Ca Cl ₂	42,6	100	- 55,0

Na Cl	41,6	100	- 30
MN ₄ NO ₃	41,6		
Na Cl	41,40,0		
NH ₄ NO ₃	20,0		

Атомная масса отдельных элементов

Название элемента	Атомная масса	Название элемента	Атомная масса
Азот	14,008	Медь	63,57
Алюминий	16,97	Молибден	95,95
Барий	137,36	Натрий	22,997
Бор	10,82	Сера	32,06
Бром	79,916	Платина	195,23
		Ртуть	200,61
Висмут	209,0	Стронций	87,63
Водород	1,008	Железо	197,2
Вольфрам	183,92	Углерод	12,01
Йод	126,92	Фосфор	30,98
Кадмий	112,41	Хлор	35,457
		Хром	52,01
Калий	39,096	Цинк	65,38
Кальций	40,08	Свинец	207,21
Кислород	16,00		
Кремний	28,06		
Серебро	107,88		
Магний	24,32		
Марганец	54,93		

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

АКТИВАТОР - **АКТИВАТОР** — вещество, действие которого проявляется в возрастании скорости ферментативной реакции; различают неконкурентную ($a = 1, P > 1$), синергистическую ($a < 1, p = 1$) и смешанные ($a \Phi 1, p * 1$) типы активирования

ACTIVE CENTER - **АКТИВНЫЙ ЦЕНТР** — участок, расположенный на поверхности белковой глобулы, образованный из разных аминокислотных остатков, собранных из различных участков полипептидной цепи, где происходит связывание и превращение субстрата; аминокислотные остатки имеют определенное пространственное расположение в активном центре, что обеспечивает специфичность (избирательность) механизма действия фермента

ALTERNATIVE SPLICING - **АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ СПЛАЙСИНГ** — наблюдается в разных тканях одного и того же РНК-предшественника, приводит к образованию разных РНК, содержащих разные наборы экзонов; в результате а. с. РНК, транскрибируемые с одного гена, будут кодировать белки с разными свойствами; выбор путей сплайсинга РНК-предшественника — это способ регуляции активности генов в разных клетках и тканях организма

ANABOLISM (ANABOLIC PATHWAYS) - **АНАБОЛИЗМ (АНАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ)** — процессы ферментативного синтеза сложных биологических молекул (углеводов, нуклеиновых кислот, белков, жиров) из простых предшественников, с потреблением свободной энергии, которая поставляется в форме фосфатных связей АТФ

ANTI-COMPETITIVE INHIBITION TYPE - **АНТИКОНКУРЕНТНЫЙ ТИП ИНГИБИРОВАНИЯ** — этот тип ингибирования проявляется при связывании ингибитора только с фермент-субстратным комплексом; при связывании в активном центре фермента ингибитора замедляется каталитический процесс

ANTIOXIDANT ACTIVITY - **АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ** — активность, проявляемая действием антиоксидантов в живых организмах, подавляющих протекание процессов свободнорадикального окисления; эффект действия антиоксидантов часто используется в производстве пищевых

1 л - это количество вещества, которое используется для приготовления титрованных растворов различной нормальности

Основные соединения	Молекулярная масса	Эквивалентная масса	1N	0,5N	0,2N	0,1N	0,05N	0,02N	0,01N
H ₂ SO ₄ (плотность 1,84)	98,08	49,04	28 мл	14мл	5,6 мл	2,8мл	1,4мл	0,56мл	0,28мл
HCl (плотность 1,19)	36,48	35,48	82 мл	41мл	16,4мл	8,2мл	4,1мл	1,64мл	0,82мл
HNO ₃ (плотность 1,40)	63,02	63,02	67 мл	33,5мл	13,4мл	6,7мл	3,4мл	1,34мл	0,67мл
H ₂ CO ₃ *2H ₂ O NaOH KOH Ba(OH) ₂ *8H ₂ O	126,07	63,04	-	-	-	6,3г	3,15мл	1,26г	0,63г
	40,00	40,00	40,02	20,0г	8,0г	4,0г	2,0г	0,80г	0,40г
	56,11	56,11	56,11	28,06г	11,2г	5,6г	2,8г	1,12г	0,56г
	3145	157,75г	78,88г	31,54	15,77г	7,88г	3,15г	1,58г	

ANTIOXIDANT SYSTEM - АНТИОКСИДАНТНАЯ СИСТЕМА — это комплекс соединений, способных подавлять протекание свободнорадикальных реакций в биогенных системах; к этой группе относятся биогенные молекулы, которые по механизму действия можно условно разделить на две группы: 1) высокомолекулярные соединения — ферменты антиоксидантной защиты (супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза и др.), а также белки, способные связывать ионы железа и меди, являющиеся катализаторами свободнорадикальных процессов (альбумин, трансферрин, ферритин и т. д.); 2) низкомолекулярные соединения, к которым относятся стероиды, убихиноны, фосфолипиды, некоторые аминокислоты, полиамины, мочевины, мочевая кислота, глутатион, аскорбат, билирубин, токоферолы и др.

ПОЛ в клетке находится под контролем высокоактивной системы антиоксидантной защиты

ANTICODON - АНТИКОДОН — триплет, содержащийся в составе молекулы тРНК, комплементарный какому-нибудь кодону и-РНК

ANTIBODIES - АНТИТЕЛА — вещества гликопротеидной природы, образующиеся в ответ на введение в организм антигена и обладающие способностью к специфической реакции с антигеном

АРОFERMENTAM - АПОФЕРМЕНТ — белковая часть холофермента

холофермента

GOLGI-LATTICE CELL - АППАРАТ ГОЛЬДЖИ — структурный компонент клетки, представляющие собой стопку плоских мешочков — цистерн диаметром около 1 мкм и толщиной 0,02-0,025 мкм, ограниченных мембраной и расположенных параллельно друг другу; число цистерн в диктиосоме 5-7; диктиосома состоит из формирующего полюса, где возникают новые цистерны, и секретирующего полюса, где цистерна распадается и образуются секретирующие пузырьки — лизосомы, содержащие набор гидролитических ферментов, расщепляющих полисахариды, белки и сложные липиды; новые цистерны образуются на формирующем полюсе из элементов эндоплазматической сети; в животных тканях а. г. выполняет секреторную функцию, а в растительных клетках служит центром синтеза, накопления и секреции полисахаридов, которые затем соединяются с белками, формируя гликопротеиды эндоплазматической сети; в целом функция а. г. заключается во временном хранении и активной переработке продуктов жизнедеятельности клетки

RESPONSE EXCHANGE) -

ASSIMILATION (PLASTIC RESPONSE EXCHANGE) - АССИМИЛЯЦИЯ (РЕАКЦИИ ПЛАСТИЧЕСКОГО ОБМЕНА) — процессы направленного синтеза биогенных молекул в

живых организмах, протекающие с затратой энергии (АТФ и другие высоко энергетические молекулы); к процессам а. можно отнести биосинтез белка, гликогеногенез — синтез гликогена, липогенез — синтез жирных кислот и т. д.

АЕРОВЕЕ - АЭРОБЫ — организмы, использующие в качестве акцептора электронов молекулярный кислород; к аэробам относятся все животные и растения, а также многие микроорганизмы

AEROBIC CONDITIONS - АЭРОБНЫЕ УСЛОВИЯ — условия жизнедеятельности организмов и протекания биохимических реакций в присутствии кислорода, использующие его в качестве акцептора электронов

PROTEIN - БЕЛОК — высокомолекулярное соединение, образованное за счет последовательного соединения α -L-аминокислот в полипептидную цепь, связанных между собой пептидной связью ($-\text{CO}-\text{NH}-$) согласно генетической информации, хранящейся в гене, и обладающий функционально активной третичной или четвертичной структурой; информация о природе аминокислот, последовательности их связывания в полипептидной цепи и количестве передается по следующей цепи: ДНК $\rightarrow$ преРНК $\rightarrow$ мРНК $\rightarrow$ белок

VECTOR - ВЕКТОР — молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК любого происхождения и обеспечивать ее встраивание в ДНК клетки; ими могут быть бактериофаги или плазмиды

VITAMINS - ВИТАМИНЫ — группа биологически активных веществ, синтез которых преимущественно происходит в бактериях и растениях, являющихся предшественниками кофакторов или простетических групп; недостаток витаминов вызывает у животных и человека развитие симптомов гипо- и авитаминозов, а их избыток — гипервитаминозы; в. условно можно разделить на растворимые в полярных (водорастворимые: B_1 , B_2 , B_3 , B_5 , B_6 , B_7 , B_8 , B_{12} , B_{13} , B_{15} , B_{16} , С, Р, РР, Н, U, N, Q) и неполярных (жирорастворимые: А, D, E, K, F) растворителях; в составе коферментов НАД, НАДФ присутствуют остатки витаминов B_5 (никотинамид) и РР (никотиновая кислота); ФМН и ФАД — B_2 (рибофлавин), HSKoA — B_3 (пантотеновая кислота), тиаминпирофосфата — В (тиамин), цитидоксальфосфата — B_6

(пиридоксин); в составе активных центров ферментов содержатся в качестве простетических групп витамины: липоевая кислота у липоатацетилтрансферазы, витамин Н (биотин) у пируват ацетил-КоА-карбоксилазы, витамин К (филлохинон) у филлохинонредуктазы и менадионредуктазы, витамин В_с (фолиевая кислота) у трансаминаз, B_{12} (кобаламин) у метилтрансфераз; кроме этого в составе белка родопсина присутствует витамин А (ретинол), участвующий в процессе фоторецепции; антиоксидантные свойства проявляют витамины: Е (токоферолы), Р (биофлавоноиды) и С (аскорбиновая кислота); в переносе ионов кальция участвует витамин D

HYDROGEN BOND - ВОДОРОДНАЯ СВЯЗЬ — связь, образованная атомом водорода, находящегося между двумя атомами электроотрицательных элементов; в образовании водородной связи участвуют такие электроотрицательные атомы, как кислород, азот, фтор, хлор; энергия водородной связи сравнительно мала (около 40 кДж/моль)

SECONDARY STRUCTURE OF PROTEIN - ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА — упорядоченное пространственное расположение отдельных участков полипептидной цепи, закрученных в форму α -спирали или образующих складчатые слои (β -структура), стабилизированных за счет водородных связей

SECONDARY STRUCTURE OF DNA - ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК — комплементарное расположение двух полинуклеотидных цепей, связанных между собой водородными связями молекул пуриновых и пиримидиновых оснований; пары (А=Т и Т=А) образуют по две водородные связи, а пары (Г=Ц и Ц=Г) — три водородные связи

GANGLIOSIDE - ГАНГЛИОЗИДЫ — гликолипиды, в состав которых входит сиаловая кислота

GENETIC CODE - ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОД — набор триплетов в ДНК и мРНК, представленных тремя последовательно соединенными мононуклеотидами, с помощью которых передается информация о первичной структуре белков, синтезируемых на рибосоме

GENOME - ГЕНОМ — совокупность генов, входящих в состав ДНК

GENOTYPE- ГЕНОТИП — суммарная генетическая информация, содержащаяся в хромосомах, которая получена организмом от предыдущих поколений

GENEPOOL - ГЕНОФОНД — сумма всех генов данного вида (заключенных в хромосомах), обеспечивающая возможность выживания вида в данных условиях обитания

HYDROLASES - ГИДРОЛАЗЫ — класс ферментов, катализирующих расщепление связей с участием молекулы воды в качестве нуклеофила

HYDRORHILIC -ГИДРОФИЛЬНОСТЬ — (гр. гидро — вода, филео — люблю, букв, любящий воду) свойства веществ, материалов интенсивно взаимодействовать с водой, хорошо растворяться в воде

HYDRORHOBICITY - ГИДРОФОБНОСТЬ — (гр. гидро — вода, фобос — страх, боязнь, букв, боящийся воды) свойства веществ, материалов слабо взаимодействовать с водой, плохо растворяться в воде

HYDRORHOBICINTERACTIONS - ГИДРОФОБНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ — тип связей, устанавливаемый при взаимодействии между неполярными группами; г. в. относятся к слабым связям; в белках. г. в. формируются между неполярными группами аминокислотных остатков, которые чаще всего локализованы внутри белковой глобулы, избегая контакта с молекулами воды

HISTONES-ГИСТОНЫ — небольшие щелочные белки (12-30 кДа), преимущественно расположенные в ядре животных и растений и играющие важную роль в структуре хроматина

GLYCOPROTEIN PROTEINS- ГЛИКОПРОТЕИНЫ — сложные белки, в состав которых входят углеводы; выполняют г. функции рецепторов мембран, участвующих в процессах биологического распознавания соединений и клеток (гормонов, бактерий и вирусов); ряд гликопротеинов, циркулирующих в кровяном русле человека и животных, являются транспортными белками; каталитическая функция выполняется такими белками, как пероксидаза, холинэстераза, глюкооксидаза, энтерокиназа и др., содержащие углеводы в своем составе; входя в состав межклеточного вещества соединительной ткани, г. выполняют структурно-механическую функцию

GLUTATHIONE (R-SH) - ГЛУТАТИОН (R-SH) — трипептид, в состав которого входят три последовательно соединенных аминокислоты (глутаминовая кислота, цистеин, глицин); г. служит донором водорода в окислительно-восстановительных процессах; в организме животных г. является субстратом глутатиопероксидазы, окисление которого сопровождается образованием окисленной формы (г-S-S-г); количество восстановленного глутатиона может служить критерием жизнеспособности живых организмов

HORMONES - ГОРМОНЫ — группа биологически активных веществ, синтез которых осуществляется в специализированных эндокринных железах или в тканях. По строению г. можно разделить на пять групп: производные аминокислот и ненасыщенных жирных кислот, пептиды, белки, стероиды; механизм действия г. проявляется через мембранные, внутриклеточные и внутриядерные рецепторные системы; при совместном действии гормонов возможен синергизм (когда действие одного г. усиливается другим гормоном), антагонизм (действие двух гормонов противоположно) или многоступенчатость (действие гормона провоцирует последовательное проявление действия нескольких систем); высокие концентрации г. способны регулировать нормальную деятельность организма, привести к возникновению заболевания

DEZOKSIRIBONUKLEINOV AN-acid (DNA) ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА (ДНК) — высокомолекулярное соединение, образованное за счет последовательного связывания нуклеотидов в полинуклеотидную цепь, в упорядоченном расположении которых заложена индивидуальная информация о живом организме. ДНК является полинуклеотидом (биополимер), в составе которого азотистые основания (аденин, гуанин, цитозин и тимин), моносахариды (дезоксирибоза) и остатки фосфорной кислоты; в полинуклеотидной цепи нуклеотиды последовательно связаны между собой за счет фосфодиэфирной связи

DENATURATION - ДЕНАТУРАЦИЯ — внутримолекулярное изменение пространственного расположения по отношению друг к другу отдельных пептидных фрагментов в белковой макромолекуле или полинуклеотидных цепочек в ДНК без

разрыва ковалентных связей, в результате действия химических или физических факторов (ионы тяжелых металлов, органические растворители, кислоты, щелочи, температура, ионизирующее излучение и др.), приводящих к изменению их физико-химических свойств и к утрате функциональной активности

DENATURATION OF PROTEINS - ДЕНАТУРАЦИЯ БЕЛКОВ — изменение пространственной структуры белков под действием высокой температуры (50-60°C) и кислотности среды (4,0 > pH > 10,0), что приводит к нарушению их нативной (природной) конформации; разворачивание глобулы белка делает доступными для воды гидрофобные остатки аминокислот, которые в нативном состоянии формировали преимущественно ядро белка, взаимодействие их радикалов может приводить к образованию крупных ассоциатов денатурированных белков, о чем свидетельствует степень помутнения раствора или образование осадков. При проведении центрифугирования или длительном отстаивании растворов денатурированных белков, в особенности при низких температурах (0+4°C), агрегированные полипептидные цепочки белков оседают на дно сосуда

DENATURE THE ENZYME - ДЕНАТУРАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ — Ферменты выполняют роль биологических катализаторов; в каталитическом действии фермента принимают участие аминокислотные остатки, содержащие -COOH, -NH₂, -SH и другие группы, входящие в состав активного центра, протонирование и депротонирование, которых может влиять на его каталитические свойства; поэтому активность ферментов зависит от pH среды, изменение которой может приводить к нарушению нативной структуры апобелка и конформации активного центра, что проявляется в утрате специфических каталитических свойств; аналогично белкам, ферменты при повышении температуры изменяют свою конформацию, теряя способность катализировать превращения различных соединений

DISSIMILATION - ДИССИМИЛЯЦИЯ — (реакции энергетического обмена) процессы направленного распада веществ в клетках живых организмов; при этом накопившаяся в результате распада веществ энергия генерируется в связях высокоэнергетических молекул (АТФ, ГТФ, ЦТФ, УДФ и др.), используемых в дальнейшем для синтеза пластических веществ;

к процессам д. можно отнести гликолиз — распад глюкозы, липогенез — окисление жирных кислот, гликогенез — расщепление гликогена и др

BILE ACIDS - ЖЕЛЧНЫЕ КИСЛОТЫ — конечные продукты обмена холестерина; относятся к производным холановой кислоты, в составе которых холановая (3,7,12-триоксихолановая), дезоксихолановая (3,12-диоксихолановая) и хенодезоксихолановая (3,7 - диоксихолановая) кислоты; желчные кислоты могут присутствовать в конъюгированной форме с глицином (гликохолановая, гликодезоксихолановая, гликохенодезоксихолановая кислоты) и таурином (таурохолановая, тауродезоксихолановая, таурохенодезоксихолановая кислоты); основным местом синтеза желчных кислот является печень; при этом только комплекс желчных кислот с ненасыщенными жирными кислотами и моноацилглицеридами может создать смесь для эмульгирования жиров

ILE - ЖЕЛЧЬ — жидкость, компонентами которой являются желчные кислоты, жирные кислоты, триацилглицериды, фосфолипиды (фосфатидилхолин), билирубин и холестерин; кроме этого, в ж. определяется активность некоторых ферментов (щелочная фосфатаза, амилаза, каталаза, протеазы и оксидазы); в ж. содержатся белки, аминокислоты, углеводы и микроэлементы (железо, магний, медь, цинк, марганец); желчь способна выполнять следующие основные функции; 1) участие в эмульгировании липидов; 2) транспорт липидов по желудочно-кишечному тракту; 3) участие в механизмах всасывания липидов в ЖКТ; 4) нейтрализация соляной кислоты и повышение величины pH в тонком отделе кишечника; 5) активизация липаз, катализирующих гидролиз триацилглицеридов, фосфолипидов и стероидов

IZOMERAZY-ИЗОМЕРАЗЫ — класс ферментов, катализирующих внутримолекулярные превращения (рацемизация или эпимеризация); в названии фермента присутствует термин «рацемаза» (аланинрацемаза, метионинрацемаза, гидроксипролинрацемаза, лактатрацемаза и др.), «эпиме-раза» (альдозо-1-эпимераза, рибулозофосфат-4-эпимераза, UDP- глюкоуронат-4-эпимераза и др.), «изомераза» (рибозофосфат-изомераза, ксилозофосфат-изомераза, глюкоза-минфосфат-изомераза и др.),

«таутомераза» (фенилпироват-таутомераза, оксалоацетаттаутомераза), «мутаза*» (фосфоглицератмутаза, метиласпартатмутаза и др.); и. подразделяются на 5 подклассов

ISOENZYMES (ISOZYMES) - ИЗОФЕРМЕНТЫ (ИЗОЭНЗИМЫ) — группа ферментов, выполняющих идентичную каталитическую функцию у одного биологического вида, но отличающихся между собой по структуре и ряду физико-химических свойств (электрофоретическая подвижность, растворимость, каталитические константы) вследствие генетически обусловленных небольших различий в первичной структуре, которые проявляются при формировании нативной структуры ферментов

ELECTRIC POINT - ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ ТОЧКА — состояние заряженности белка при определенном pH, при котором устанавливается равенство положительных и отрицательных зарядов в молекуле белка; в растворе с определенным pH, которое совпадает с величиной и.э. т. белок в электрическом поле неподвижен

IMMUNITY - ИММУНИТЕТ — (от лат. immunitas — освобождение, избавление от чего либо) защитная реакция организма, выражающаяся в невосприимчивости организма к инфекционным агентам и чужеродным веществам; различают естественный или врожденный и. — наследуемый организмом от родителей и искусственный или приобретенный и. — вырабатываемый у человека после перенесенного инфекционного заболевания

INHIBITION - ИНГИБИРОВАНИЕ — процесс, при котором ферментативная реакция в присутствии ингибитора замедляется или полностью останавливается, в зависимости от природы ингибитора и обусловленного им типа ингибирования

INHIBITOR - ИНГИБИТОР — вещество, замедляющее или полностью останавливающее скорость ферментативной реакции, по той или иной причине частично или полностью препятствующее образованию продуктивного фермент-субстратного комплекса; ингибиторами могут быть лекарственные препараты, яды и другие вещества

INTRON (BOX) - ИНТРОН (ВСТАВКА) — участок в первичной последовательности ДНК и транскрибируемый в структуру пре-РНК, информативность которого пока не

установлена, вырезаемый ферментами в процессе сплайсинга из пре-РНК

CATABOLISM (КАТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ) - КАТАБОЛИЗМ (КАТАБОЛИЧЕСКИЕ ПУТИ) — процессы ферментативного расщепления биологических молекул (углеводов, жиров и белков), сопровождающиеся выделением свободной энергии и накоплением ее в форме энергии фосфатных связей АТФ

CLASSIFICATION OF ENZYME - КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ — в настоящее время, в соответствии с типом катализируемой реакции, ферменты сгруппированы в 6 классов:

1 класс — оксидоредуктазы;

2 класс — трансферазы;

3 класс — гидролазы;

4 класс — лиазы;

5 класс — изомеразы;

6 класс — лигазы (синтетазы)

Cell membrane (plasmalemma) - КЛЕТОЧНАЯ МЕМБРАНА (ПЛАЗМАЛЕММА) — структурное образование, изолирующее внутреннее содержание клетки от окружающей среды; к. м. состоит из упорядоченно расположенных молекул белков, липидов и углеводов; наружный и внутренний слои элементарной мембраны образованы белковыми молекулами, а между ними находятся два липидных слоя; белки располагаются как на поверхности

к. м., так и пронизывают ее насквозь, формируя проводные каналы транспортных систем метаболитов клетки; поверхность к. м., обращенная наружу, отличается по химическому составу от внутренней; к. м. обладает избирательной проницаемостью, регулируя, таким образом движение веществ в клетку и из клетки

CLONING - КЛОНИРОВАНИЕ — процесс получения многочисленных копий чужеродного гена, представляющего гомогенную популяцию молекул ДНК; клонирование ДНК возможно благодаря способности бактериальных плазмид и фагов продолжать нормально функционировать после встраивания в их геном дополнительных последовательностей ДНК

COVALENT BONDS - КОВАЛЕНТНАЯ СВЯЗЬ — связь, образованная между атомами за счет обобществления их

CODON - КОДОН — три последовательно соединенных нуклеотида в и-РНК, кодирующих определенную аминокислоту; генетический код для аминокислот является вырожденным, так как некоторые аминокислоты закодированы 2-6 кодонами; всего имеется 64 кодона, три из которых не кодируют никакой аминокислоты; УАГ, УАА и УГА — обозначают конец матрицы: на этих триплетах обрывается дальнейшее наращивание пептидной цепи (терминирующие триплеты)

COMPETITIVE INHIBITION - КОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ — тип ингибирования, когда субстрат и ингибитор конкурируют за участок связывания в активном центре фермента, причем связывание ингибитора препятствует последующему связыванию субстрата и его превращению

MICHAELIS CONSTANT (KM) - КОНСТАНТА МИХАЭЛИСА (Km) — константа, по величине которой можно определить сродство субстрата к ферменту, а также возможность образования

СОФАКТОР (COENZYME) - КОФАКТОР (КОФЕРМЕНТ)
—низкомолекулярное соединение небелковой природы,
связанное с апобелком нековалентными связями в активном
центре и участвующее в каталитическом процессе; в отсутствие
кофермента фермент неактивен и каталитическая реакция не
протекает; к коферментам относятся: НАД, НАДФ, ФАД, ТПФ и
др.; предшественниками некоторых к. являются витамины (B_1 ,
тиамин) > ТПФ (тиаминапирофосфат), B_2 (рибофлавин) ФАД
(флавинадениндинуклеотид), B_3 (пантотеновая кислота) —»
ШНКоА, B_5 (никотиновая кислота) —► ФП (фосфопиридоксин),
 B_{12} (цианкобаламин) -* МК (метилкобаламин), B_c (фолиевая
кислота) —> ТГФК (тетрагидрофолиевая кислота), Н (биотин)
КВ (карбоксибиотин))

LYASE - ЛИАЗЫ → это класс ферментов, катализирующих реакции разрыва C-C, C-O, C-N и других связей в субстрате без присоединения молекулы воды или окисления; л. отличаются от других ферментов тем, что в катализируемых реакциях в одном направлении участвуют два субстрата, а в обратной реакции только один; в названии фермента присутствуют термины «декарбоксилаза» или «альдолаза» или «лиаза» (пируватдекарбоксилаза, оксалацетатдекарбоксиаза, оксалоацетатдекарбоксилаза, треоинальдолаза, фенилсеринальдолаза, изоцитратлиаза, аланинлиаза, АТФ-цитратлиаза и др.), а для ферментов, катализирующих реакции отщепления воды от субстрата — «дегидратаза» (карбонатдегидратаза, цитрат-дегидратаза, сериндегидратаза и др.); в тех случаях, когда обнаружена только обратная реакция, или это направление в реакции более существенно, в названии ферментов присутствует термин «синтаза» (малатсинтаза, 2-изопропилмалатсинтаза, цитратсинтаза, гидроксиметилглутарил CoA-синтаза и др.); л. подразделяются на 6 подклассов

LIGASE (SYNTHETASE) - ЛИГАЗЫ (СИНТЕТАЗЫ) — класс ферментов, катализирующих реакции соединения двух и более молекул, используя АТФ; в названии фермента

присутствует термин «синтетаза» (тирозил-тРНК-синтетаза, треонин-тРНК-синтетаза, ацетил-КоА-синтетаза, аспарагин-синтетаза, карбамоилфосфат-синтетаза, аргениносукцинат-синтетаза и др.), «карбоксилаза» (пируват- карбоксилаза, ацетил-КоА-карбоксилаза, пропионил-КоА-карбоксилаза и др.); л. подразделяются на 5 подклассов

LIZOSOMY - ЛИЗОСОМЫ — (от греч. lysis — растворение, разложение и soma — тело) органоиды, выполняющие лизирующуюся, т. е. разрушающую, функцию; размеры л. колеблются от 0,2 до 0,5 мкм; в л. содержится набор гидролитических ферментов, гидролизующих белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, липиды и др. органические соединения при внутриклеточном пищеварении; л. обеспечивают постоянство состава веществ в клетке; участвуют в защите организма против вирусов, бактерий, инородных тел, а также удаляют отжившие клетки и их части; таким образом, л. выполняют в клетке пищеварительную, защитную и выделительную функции

LIPOPROTEINS - ЛИПОПРОТЕИНЫ — сложные липопротеидные комплексы, в составе которых белки (альбумин) и липиды (нейтральные липиды, фосфолипиды, холестерин и его эфиры и др.); различают несколько классов л.: л. высокой плотности (ЛПВП), л. низкой плотности (ЛПНП), л. очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикроны (ХМ)

MATRIX (INFORMATION) -МАТРИЧНАЯ (ИНФОРМАЦИОННАЯ) РНК — синтезируется в процессе транскрипции и содержит точную копию генетической информации, закодированной в определенном участке ДНК; информация об аминокислотах, которые будут включены в первичную структуру полипептидной цепи, передается с помощью кодонов (триплетов) в составе и-РНК

METABOLISM (METABOLISM) - МЕТАБОЛИЗМ (ОБМЕН ВЕЩЕСТВ) — совокупность биохимических процессов, протекающих в организме и обеспечивающих его жизнеспособность

METABOLITES - МЕТАБОЛИТЫ — промежуточные продукты ферментативных реакций, протекающих в клетке

METABOLIC PROCESS- МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС — совокупность ферментативных реакций, катализирующих последовательное превращение биогенного соединения; регулируемые конечными продуктами по типу обратной связи; к основным м. п. относятся следующие: гликолиз, гликогенолиз, гликонеогенез, гликогенез, пируватдегидролиз, гликозный комплекс (ГДК), цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), геназный комплекс (ГДК), цикл трикарбоновых кислот (ЦТК), окислительное фосфорилирование, пентозофосфатный путь превращения углеводов (ПФП), липолиз, липогенез, синтез холестерина, синтез и распад триацилглицеридов и фосфолипидов, синтез и распад пуринов и пиримидинов, орнитинный цикл, перекисное окисление липидов, фолдинг, протеолиз, апоптоз, биосинтез ДНК, РНК и белка и др.

MITOCHONDRIA - МИТОХОНДРИИ — (от греч. mitos — нить, chon- drion — зерно, гранула) органеллы, выполняющие энергетические функции в клетке; диаметр м. около 0,1-0,5 мкм, длина — от 1 до 10 мкм; м. состоят из двух мембран (наружной и внутренней) и внутреннего пространства (матрикса); наружная мембрана м. регулирует поступление и выделение веществ; внутренняя мембрана м. образует к центру складки — кристы (ткани животных) и извилистые трубки в клетках растений, увеличивающих рабочую поверхность, на которой расположены ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции; в матриксе м. находятся ферменты цикла трикарбоновых кислот и ферменты, окисляющие липиды (жирные кислоты); основной функцией м. является синтез АТФ; в матриксе м. находятся рибосомы и молекулы митохондриальной ДНК

MITOCHONDRIA - НЕЗАМЕНИМЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ — кислоты, синтезирующиеся только в растениях и микроорганизмах и не образующиеся в организме животных и человека; к н. а. относятся лизин, аргинин, гистидин, валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, фенилаланин, триптофан

NONCOMPETITIVEACTIVATION - НЕКОНКУРЕНТНАЯ АКТИВАЦИЯ — проявляется в случае, если субстрат и активатор связываются независимо в различных участках активного центра фермента; при этом образуется тройной

комплекс, фермент субстрат-активатор; связывание активатора ускоряет протекание каталитического процесса

NONCOMPETITIVE INHIBITION - НЕКОНКУРЕНТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ — этот тип ингибирования проявляется в том случае, когда ингибитор и субстрат связываются в разных участках активного центра фермента; однако при связывании ингибитора образуется фермент субстратный комплекс, превращение в котором субстрата становится невозможным

NUCLEICACIDS (RNA and DNA) - НУКЛЕИНОВАЯ КИСЛОТА (РНК И ДНК) — биополимер, в состав которого входят пуриновые и пиримидиновые азотистые основания (аденин, гуанин, цитозин, урацил, тимин), а также моносахариды пентоз (рибоза или дезоксирибоза), связанные между собой остатками фосфорной кислоты

Nucleosides - НУКЛЕОЗИДЫ — соединения, в которых азотистые основания (пурины и пиримидины) связаны N-гликозидной связью с рибозой или дезоксирибозой (аденозин, гуанозин, тимидин, уридин, цитидин)

NUCLEOTIDES - НУКЛЕОТИДЫ — фосфорные эфиры нуклеозидов; например, адениловая (АМФ), гуаниловая (ГМФ), цитидиловая (ЦМФ), уридиловая (УМФ), тимидиловая (ТМФ) кислоты, называемые также как аденозин 5'-фосфат, гуанозин 5'-фосфат, цитидин 5'-фосфат, уридин-5'-фосфат, тимидин 5'-фосфат

OXIDATIVE PHOSPHORYLATION - ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ — процесс образования АТФ (процесс фосфорилирования АДФ), сопряженного с транспортом электронов по цепи переносчиков от НАДН или ФАДН к O_2 (процесс окисления); о. ф. катализируется четырьмя ферментативными комплексами, расположенными на внутренней мембране митохондрий; комплекс I — НАДН; убихинон-оксидоредуктаза (ФМН, FeS), комплекс II — сукцинат: убихинон-оксидоредуктаза (ФАД, FeS), комплекс III — убихинон: феррицитохром с- оксидоредуктаза, комплекс IV — ферроцитохром с-кислородоксидоредуктаза; цитохромы располагаются в порядке возрастания окислительно восстановительного потенциала; терминальный цитохром a_3 (цитохромоксидаза) осуществляет конечную стадию процесса —

перенос восстановительных эквивалентов на молекулярный кислород; в результате окисления одной молекулы НАДН синтезируется 3 молекулы АТФ, а одной молекулы ФАДН — 2 молекулы АТФ

OXYHEMOGLOBIN - ОКСИГЕМОГЛОБИН — гемоглобин, в котором атомы железа каждого из гемов обратимо связаны с молекулой кислорода (HbO_2)

OXIDOREDUCTASE - ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ — класс ферментов, катализирующих реакции окисления и восстановления; оксидоредуктазы подразделяются на 17 подклассов; субстраты оксидоредуктаз являются донорами атомов водорода и электронов и поэтому ферменты этого класса называются дегидрогеназами или редуктазами (алкоголь-дегидрогеназа, лактатдегидрогеназа, малатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, глиоксилатредуктаза, гидроксипируватредуктаза и др.); коферментами оксидоредуктаз принадлежат НАД, НАДФ, ФАД, ФМН; к классу оксидоредуктаз принадлежат и оксидазы, в реакциях которых участвует кислород (альдегидоксидаза, ксантиноксидаза, пируватоксидаза, оксала-токсидаза, оксидаза L-аминокислот, аминоксидазы и др.); представителями оксидоредуктаз в молоке являются ферменты пероксидаза, каталаза

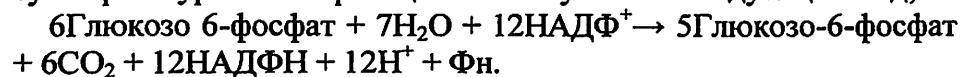
CARBOHYDRATE - ОЛИГОСАХАРИДЫ — производные углеводов, содержащие от 2 до 10 остатков моносахаридов, соединенных O-гликозидной связью; основными о. являются лактоза, сахароза, мальтоза, целлобиоза, трегалоза

OPERATOR - ОПЕРАТОР — регуляторный участок ДНК, служащий местом связывания репрессоров — белков, контролирующих синтез преРНК

OPERON (TRANSCRIPTION) - ОПЕРОН (ТРАНСКРИПТОН) — участок в структуре гена, являющийся элементарной единицей транскрипции, ограниченный промотором и терминатором, участвующий в процессе биосинтеза молекулы преРНК у прокариот и эукариот; в структуре оперона различают два участка: информативный и неинформативный

CARBOHYDRATE SOXIDATION PENTOSE PHOSPHATE PATHWAY - ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ ОКИСЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ — процесс, в котором происходит ступенчатый

окислительный распад гексоз до пентоз и других сахаров с более короткой цепью; реакции катализируются глюкозо 6-фосфатдегидрогеназой, 6-фосфоглюконолактоназой, 6-фосфоглюконатдегидрогеназой, фосфопентозоэпимеразой, транскетолазой, трансальдолазой; значение пентозофосфатного пути окисления углеводов состоит в том, что он генерирует в цитоплазме НАДФН, необходимый для синтеза жирных кислот и стероидов; активность пентозофосфатного пути особенно высока в клетках печени, молочной железы, жировой ткани и коре надпочечников; пентозофосфатный путь окисления углеводов поставляет пентозофосфаты для синтеза нуклеиновых кислот и нуклеотидов; суммарное уравнение реакций п. п. о. у. имеет следующий вид;



В п. п. о. у. АТФ не синтезируется и не расходуется

PEPTIDE BOND - ПЕПТИДНАЯ СВЯЗЬ — ковалентная полярная связь, образованная между углеродом одной аминокислоты и азотом другой, при соединении двух аминокислот между собой; пептидная связь относится к ковалентной полярной связи, обеспечивает стабильность первичной структуры белков (-NH-CO-)

The primary structure of the protein molecule - ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ — последовательное соединение α-L- аминокислот в полипептидную цепь, связанных между собой за счет пептидной связи, согласно генетической информации, заложенной в ДНК

THE PRIMARY STRUCTURE OF A DNA - ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК — структура, образованная за счет последовательного соединения мононуклеотидов в полинуклеотидную цепь, связанных между собой сложной эфирной связью, образованной фосфатными остатками (3',5'- фосфодиэфирная связь) одного мононуклеотида

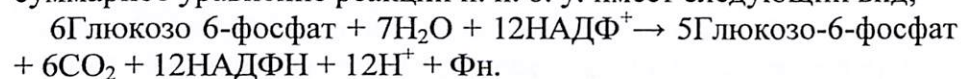
LIPID PEROXIDATION - ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ — процесс окисления ненасыщенных жирных кислот продуктами свободнорадикального окисления; активно протекает в микросомальных системах печени и других тканях; генерация супероксидного радикала может происходить в результате активности НАДФН-цитохром b₅-редуктазы,

митохондриальной НАДН-дегидрогеназы, ксантиноксидазы и пероксидазы, а также фотодинамического действия света на хлорофилл, приводящего к образованию синглетного кислорода или супероксид радикала; процесс начинается стадией инициирования, причем в роли инициаторов в основном выступают супероксидный или гидроксильный радикалы; это наиболее реакционноспособные промежуточные соединения кислорода, обладающие большим сродством к электрону, способные модифицировать молекулы белков, нуклеиновых кислот, разрушать липидные компоненты мембран клеток и т. д.; образовавшиеся радикалы ненасыщенных жирных кислот далее взаимодействуют с кислородом, образуя перекисные радикалы, а те в свою очередь вступают в реакцию с новой молекулой жирной кислоты с образованием свободного радикала и накоплением гидроперекисей липидов (ROOH)

PEROXIDASE (EC 1.11.1.7) - ПЕРОКСИДАЗА (КФ 1.11.1.7) — самый распространенный фермент растительных и животных тканей; п. относится к группе двухкомпонентных ферментов (железогликопротеин), в составе которых гемин (протопорфирин IX в комплексе с трехвалентным железом), и полипептидная цепь; п. катализирует реакции оксидазного, оксигеназного и пероксидазного окисления субстратов; в реакциях пероксидазного окисления субстратами фермента могут быть функционально активные вещества (НАДН, гидрохинон, аскорбиновая кислота, о-дианизидин, аминокислоты, флавоноиды, фенотиазины и др.); оксидазными субстратами п. являются (ИУК, диоксифумаровая кислота, аскорбиновая кислота и др.); основными функциями углеводов, входящих в состав пероксидазы, являются: а) защищать фермент от инактивирующего действия свободных радикалов, образующихся при протекании оксидазных и пероксидазных реакций; б) обеспечивать растворимость фермента в полярных растворителях; в) обуславливать взаимодействие фермента с мембранами и за счет этого встраивать фермент в определенные участки мембран органелл и клетки; г) защищать фермент от инактивирующего действия высоких температур и растворителей

PLASMID - ПЛАЗМИДЫ — добавочные маленькие кольцевые молекулы ДНК, присутствие которых необязательно

окислительный распад гексоз до пентоз и других сахаров с более короткой цепью; реакции катализируются глюкозо 6-фосфатдегидрогеназой, 6-фосфоглюконолактазой, 6-фосфоглюконатдегидрогеназой, фосфопентозэпимеразой, транскетолазой, трансальдолазой; значение пентозофосфатного пути окисления углеводов состоит в том, что он генерирует в цитоплазме НАДФН, необходимый для синтеза жирных кислот и стероидов; активность пентозофосфатного пути особенно высока в клетках печени, молочной железы, жировой ткани и коре надпочечников; пентозофосфатный путь окисления углеводов поставляет пентозофосфаты для синтеза нуклеиновых кислот и нуклеотидов; суммарное уравнение реакций п. п. о. у. имеет следующий вид;



В п. п. о. у. АТФ не синтезируется и не расходуется

PEPTIDE BOND - ПЕПТИДНАЯ СВЯЗЬ — ковалентная полярная связь, образованная между углеродом одной аминокислоты и азотом другой, при соединении двух аминокислот между собой; пептидная связь относится к ковалентной полярной связи, обеспечивает стабильность первичной структуры белков (-NH-CO-)

The primary structure of the protein molecule - ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКОВОЙ МОЛЕКУЛЫ — последовательное соединение α-L- аминокислот в полипептидную цепь, связанных между собой за счет пептидной связи, согласно генетической информации, заложенной в ДНК

THE PRIMARY STRUCTURE OF ADNA - ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК — структура, образованная за счет последовательного соединения мононуклеотидов в полинуклеотидную цепь, связанных между собой сложноэфирной связью, образованной фосфатными остатками (3',5'- фосфодиэфирная связь) одного мононуклеотида

LIPID PEROXIDATION - ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ — процесс окисления ненасыщенных жирных кислот продуктами свободнорадикального окисления; активно протекает в микросомальных системах печени и других тканях; генерация супероксидного радикала может происходить в результате активности НАДФН-цитохром b₅-редуктазы,

митохондриальной НАДН-дегидрогеназы, ксантиноксидазы и пероксидазы, а также фотодинамического действия света на хлорофилл, приводящего к образованию синглетного кислорода или супероксид радикала; процесс начинается стадией инициирования, причем в роли инициаторов в основном выступают супероксидный или гидроксильный радикалы; это наиболее реакционноспособные промежуточные соединения кислорода, обладающие большим сродством к электрону, способные модифицировать молекулы белков, нуклеиновых кислот, разрушать липидные компоненты мембран клеток и т. д.; образовавшиеся радикалы ненасыщенных жирных кислот далее взаимодействуют с кислородом, образуя перекисные радикалы, а те в свою очередь вступают в реакцию с новой молекулой жирной кислоты с образованием свободного радикала и накоплением гидроперекисей липидов (ROOH)

PEROXIDASE (EC 1.11.1.7) - ПЕРОКСИДАЗА (КФ 1.11.1.7) — самый распространенный фермент растительных и животных тканей; п. относится к группе двухкомпонентных ферментов (железогликопротеин), в составе которых гемин (протопорфирин IX в комплексе с трехвалентным железом), и полипептидная цепь; п. катализирует реакции оксидазного, оксигеназного и пероксидазного окисления субстратов; в реакциях пероксидазного окисления субстратами фермента могут быть функционально активные вещества (НАДН, гидрохинон, аскорбиновая кислота, о-дианизидин, аминокислоты, флавоноиды, фенотиазин и др.); оксидазными субстратами являются (ИУК, диоксифумаровая кислота, аскорбиновая кислота и др.); основными функциями углеводов, входящих в состав пероксидазы, являются: а) защищать фермент от инактивирующего действия свободных радикалов, образующихся при протекании оксидазных и пероксидазных реакций; б) обеспечивать растворимость фермента в полярных растворителях; в) обуславливать взаимодействие фермента с мембранами и за счет этого встраивать фермент в определенные участки мембран органелл и клетки; г) защищать фермент от инактивирующего действия высоких температур и растворителей

PLASMID - ПЛАЗМИДЫ — добавочные маленькие кольцевые молекулы ДНК, присутствие которых необязательно

для жизни клетки; п., содержащиеся в цитоплазме многих бактерий, способны автономно размножаться, стабильно наследоваться, т. е. сохраняться без специфической селекции во внехромосомном состоянии; кроме бактерий п. иногда содержат синезеленые водоросли, а из эукариотических организмов — дрожжи

POLYSACCHARIDES - ПОЛИСАХАРИДЫ — высокомолекулярные полимерные производные углеводов, образованные из последовательносоединенных моносахаридов, связанных между собой о-гликозидной связью; основными представителями п. являются крахмал, гликоген, целлюлоза, клетчатка, хитин, агар-агар

PRIMASE-ПРАЙМАЗА — фермент, синтезирующий затравки (праймеры)

PROMOTER-- ПРАЙМЕР —небольшой участок ДНК, используемый в качестве затравки при ее синтезе

SYMPTOM - ПРИЗНАК —совокупность показателей живого организма, проявляющих его индивидуальные свойства и особенности строения

PROMOTER- ПРОМОТОР —участок ДНК, служащий местом связывания ДНК-зависимой РНК- полимеразы, участвующий в регуляции синтеза пре-РНК

PROSTHETICGROUPS - ПРОСТЕТИЧЕСКАЯ ГРУППА — низкомолекулярное соединение небелковой природы, прочно связанное с апобелком, выполняющее активную роль в ферментативном катализе, при отсутствии которой фермент неактивен; к п. г. относятся: гем в пероксидазе и каталазе, изоаллоксазиновое кольцо в флавиновых ферментах, а также липоевая кислота и биотин в составе активных центров дигидролипоилацетилтрансферазы и ацетил КоА- карбоксилазы соответственно и др

PROTSESSING -ПРОЦЕССИНГ— (посттранскрипционная модификация) процесс формирования зрелых молекул РНК (тРНК, и-РНК, рРНК) из неактивного предшественника (пре-РНК) в эукариотической клетке; в результате п. происходят следующие действия: отрезание «лишних» концевых последовательностей; расщепление длинных первичных транскриптов, вырезание из них участков, транскрибированных с

интронов; добавление нуклеозидов к 3'-концу транскрипта; добавление нуклеотидов к 5'- концу транскрипта; модификация оснований в транскрипте; при этом конечным этапом п. является метилирование мРНК, в результате которого на каждые 400 остатков аденинов приходится один остаток 6-метиладенина; п. завершается тем, что функционально активная мРНК в виде нуклеопротеидного комплекса, в составе которого набор белков-информоферов, покидает ядро клетки через поры в ядерной мембране, поступая в цитоплазму для трансляции

RECOMBINANTDNA - РЕКОМБИНАНТНАЯ ДНК— измененные, химерные молекулы ДНК, составленные из фрагментов разного происхождения или с введенными в структуру нативной ДНК чужеродных последовательностей или новых генов; например, так изготавливается из рекомбинантных дрожжевых культур вакцина против гепатита В; модификация подвергается ДНК дрожжей, в состав которой вводится участок гена вируса гепатита В, кодирующий антиген (HBsAg или австралийский антиген); полученная в результате биосинтеза рекомбинантная неинфекционная вирусная вакцина содержит поверхностный антиген вируса гепатита В, продуцируемый дрожжевыми клетками; вакцина относится к адw-подтипу; антиген собирается и очищается от ферментативных культур рекомбинантного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих ген, кодируемый адw подтип HBsAg; затем белок HBsAg высвобождается из дрожжевых клеток путем их разрушения и очистки с помощью различных физических и химических методов; очищенная таким методом вакцина не содержит определяемых количеств дрожжевой ДНК и содержит менее 1% дрожжевого белка; защитный эффект вакцины, производимой по описанному методу, у шимпанзе и человека сопоставим с таковым вакцины, полученной из плазмы крови

REPARATIONS- РЕПАРАЦИЯ —процесс восстановления поврежденных участков ДНК

REPLICATION-РЕПЛИКАЦИЯ —процесс синтеза ДНК путем ее удвоения; синтез одной дочерней цепи происходит в направлении от 5' 3' осуществляется непрерывно, в то время как синтез второй цепи в направлении от 3' 5' происходит прерывисто путем соединения коротких фрагментов, называемых

фрагментами Оказаки, синтезируемых в противоположном направлении

GENEREPRESSION - РЕПРЕССИЯ ГЕНОВ — ингибирование процесса транскрипции (или трансляции) белком репрессором за счет его специфического связывания с регуляторным участком в структуре ДНК или РНК

POSONRETROTRANS - РЕПРОТРАНСПОЗОНЫ — участки клеточного генома, в которых закодированы обратные транскриптазы

RIBOSOME - РИБОСОМЫ — органеллы клетки размером 15- 35 нм, синтезирующие белки из аминокислот, последовательно соединяя их согласно информации, содержащейся в ДНК; располагаются свободно в цитоплазме или фиксированы на эндоплазматической сети; имеются и в составе ядра клетки; р. состоят из двух субъединиц (малой и большой), образующих функционально активную димерную форму только при наличии мРНК; несколько объединенных рибосом формируют цепочки — полисомы или полирибосомы; рРНК обеспечивает контрольную функцию при считывании информации с мРНК, а тРНК, осуществляет распознавание, специфичное связывание и транспортировку аминокислот к месту синтеза полипептидной цепочки на рибосоме; для каждой из 20 аминокислот имеется своя тРНК, в структуре которой имеется антикодон; распознавая соответствующий у мРНК кодон, тРНК способна связаться с рибосомой, а затем обеспечить присоединение аминокислоты к растущей полипептидной цепочке

SITE -САЙТ —короткая последовательность нуклеотидов в составе ДНК, РНК или аминокислот в белке

SATELLITEDNA - САТЕЛЛИТНАЯ ДНК— (от лат. satellitis — спутник, сопровождающий) ДНК эукариот, содержащая многократно повторяющиеся последовательности нуклеотидов

THESIGNALSEQUENCEOFAMINOACIDRESIDUES - СИГНАЛЬ-НЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ —обеспечивают направленную доставку вновь синтезированных белков к внутриклеточным органеллам и микрокомпартаментам; они оказывают влияние на характер фолдинга, посттрансляционные модификации и

метаболическую стабильность; существуют пять биохимических процессов с участием вновь синтезируемых белков, контролируемых сигнальными последовательностями аминокислотных остатков: транслокация белка через плоскость мембраны; внутриклеточный перенос белка без пересечения плоскости мембраны; химические модификации белка без гидролиза пептидных связей; расщепление некоторых пептидных связей в белке; конформационные и иные пространственные изменения белков, включая фолдинг и олигомеризацию полипептидных цепей

SPLICEOSOME - СПЛАЙСОСОМА —специализированная внутриядерная многокомпонентная структура, включающая десятки белков и набор малых ядерных РНК, предназначенных для осуществления сплайсинга

STERIDY - СТЕРИДЫ —эфирные стероиды и высших жирных кислот

STEROLS - СТЕРИНЫ —стероиды, имеющие от 8 до 10 углеродных атомов в боковой цепи у C-17 и свободную гидроксильную группу в положении 3; основным представителем с. является холестерин

STEROIDS - СТЕРОИДЫ —группа функционально активных соединений, основным компонентом которых является пергидрофенантценциклопентан; к стероидам относятся соединения животных тканей: холестерин, половые гормоны, кортикостероиды, желчные кислоты, витамины, а также вещества, синтезируемые растениями: сердечные гликозиды, алкалоиды, регуляторы роста растений; стероидные гормоны переносятся в крови с помощью специализированных белков-переносчиков: транскортина (кортикостероиды), тестостеронсвязывающего глобулина (тестостерон и эстрадиол) и транспортных белков (прогестерон и кальцитриол); после распознавания клетки-мишени гормон проникает внутрь клетки, связываясь с цитоплазматическим рецептором и в составе гормон- рецепторного комплекса переносится в ядро клетки; где связывается с промоторным участком ДНК, оказывает стимулирующее действие на процесс транскрипции; при этом увеличивается количество мРНК, которые стимулируют процесс

трансляции различных функциональных белков; клетка содержит до 104 рецепторов, с молекулярной массой 40-100 кДа

STRUCTURAL GENES - СТРУКТУРНЫЕ ГЕНЫ — гены, несущие информацию о структуре специфических белков

SPEISER-СПЕЙСЕР — (от англ. spacer — промежуток) участок ДНК, отделяющий один ген от другого; с. не кодирует белки

SPLICE - СПЛАЙСИНГ — конечный процесс формирования функционально активной и-РНК из пре-РНК путем вырезания из первичного транскрипта интронных (вставочных) участков, с последующим соединением между собой экзонов

SUBSTRATE - СУБСТРАТ — вещество, которое претерпевает химические изменения в процессе химической реакции, катализируемой ферментом; например, глюкоза является субстратом фермента гексокиназы, пируват — пируват декарбоксилазы, молочная кислота — лактатдегидрогеназы и т. д.

Sphingolipids - СФИНГОЛИПИДЫ — сложные эфиры, составными частями которых являются ненасыщенный аминспирт сфингозин или дигидросфингозин, жирные кислоты, фосфат и полярная группировка, в составе холина или этаноламина, или серина и др.

TELOMERASE - ТЕЛОМЕРАЗА — (РНК-зависимая ДНК-полимераза или обратная транскриптаза) фермент, синтезирующий тандемно повторяющиеся сегменты ДНК, из которых состоит G-цепь теломерной ДНК

TELOMERES - ТЕЛОМЕРЫ — специализированные концевые районы линейной хромосомной ДНК, состоящей из многократно повторяющихся коротких нуклеотидных последовательностей; т. построены из дезоксинуклеопротейдов (комплексов ДНК с белком)

TRANSCRIPTION - ТРАНСКРИПЦИЯ — (от англ. transcription — переписывание) процесс синтеза пре-РНК, путем переписывания информации с ДНК; т. осуществляется с помощью различных РНК-полимераз; в эукариотической клетке присутствует четыре вида РНК-полимераз: РНК-полимеразы I, II, III — располагаются в ядре клетки и одна — в митохондриях; РНК-полимераза I отвечает за синтез рибосомных 18S, 28S и 5,8S РНК; рибосомальная 5S-РНК и транспортные РНК

синтезируются РНК-полимеразой III, а РНК-полимераза II осуществляет синтез предшественников мРНК; в структуре ДНК выявляются особые регуляторные элементы, названные энхансерами, в присутствии которых резко возрастает скорость транскрипции; при этом энхансеры проявляют активность независимо от ориентации и положения относительно гена, т. е. они могут быть перед геном, внутри или за ним; индукция генов может осуществляться с помощью гормона (стероида), который в составе комплекса с белком-рецептором способен связываться с регуляторной последовательностью ДНК, что сопровождается активированием процесса транскрипции

TRANSPOSONS - ТРАНСЛЯЦИЯ — (от англ. translation — перевод) процесс перевода информации, заложенной в последовательности нуклеотидов и-РНК, в последовательность аминокислотных остатков полипептидной цепи; процесс т. протекает в цитоплазме клетки на рибосомах; на включение в белок каждой аминокислоты расходуется энергия четырех высокоэнергетических связей (одной молекулы АТФ на стадии синтеза аминоацил-тРНК и трех молекул ГТФ — на стадиях связывания аминоацил-тРНК и трансляции)

TRANSPOSONS (TP-ELEMENTS) - ТРАНСПОЗОНЫ (ТП-ЭЛЕМЕНТЫ) — сегменты ДНК, содержащие гены, не имеющие непосредственного отношения к транспозиции; т. могут нести гены устойчивости к антибиотикам, гены токсинов или гены дополнительных ферментов клеточного метаболизма

TRANSFERRNA (TRNA) SEQUENCE - ТРАНСПОРТНАЯ РНК (тРНК) — небольшие последовательности (75-90) мононуклеотидов, содержащие антикодон из 3-х мононуклеотидов, комплементарный кодону для аминокислоты в информационной РНК, расположенный в тРНК в месте локализации антикодоновой петли, недалеко от варибельной петли; функция тРНК состоит в том, чтобы транспортировать аминокислоты к рибосоме и вставлять их в определенные участки полипептидной цепи при ее биосинтезе (процесс трансляции), переводя последовательность нуклеотидов в кодоне и-РНК в последовательность аминокислотных остатков первичной структуры белка

трансляции различных функциональных белков; клетка содержит до 104 рецепторов, с молекулярной массой 40-100 кДа

STRUCTURAL GENES - СТРУКТУРНЫЕ ГЕНЫ — гены, несущие информацию о структуре специфических белков

SPEISER-СПЕЙСЕР — (от англ. spacer — промежуток) участок ДНК, отделяющий один ген от другого; с. не кодирует белки

SPLICE - СПЛАЙСИНГ — конечный процесс формирования функционально активной и-РНК из пре-РНК путем вырезания из первичного транскрипта интронных (вставочных) участков, с последующим соединением между собой экзонов

SUBSTRATE - СУБСТРАТ — вещество, которое претерпевает химические изменения в процессе химической реакции, катализируемой ферментом; например, глюкоза является субстратом фермента гексокиназы, пируват — пируват декарбоксилазы, молочная кислота — лактатдегидрогеназы и т. д.

Sphingolipids - СФИНГОЛИПИДЫ — сложные эфиры, составными частями которых являются ненасыщенный аминокислотный спирт сфингозин или дигидросфингозин, жирные кислоты, фосфат и полярная группировка, в составе холина или этаноламина, или серина и др.

TELOMERASE - ТЕЛОМЕРАЗА — (РНК-зависимая ДНК-полимераза или обратная транскриптаза) фермент, синтезирующий тандемно повторяющиеся сегменты ДНК, из которых состоит G-цепь теломерной ДНК

TELOMERES - ТЕЛОМЕРЫ — специализированные концевые районы линейной хромосомной ДНК, состоящей из многократно повторяющихся коротких нуклеотидных последовательностей; т. построены из дезокси-нуклеотидов (комплексов ДНК с белком)

TRANSCRIPTION - ТРАНСКРИПЦИЯ — (от англ. transcription — переписывание) процесс синтеза пре-РНК, путем переписывания информации с ДНК; т. осуществляется с помощью различных РНК-полимераз; в эукариотической клетке присутствует четыре вида РНК-полимераз: РНК-полимеразы I, II, III — располагаются в ядре клетки и одна — в митохондриях; РНК-полимераза I отвечает за синтез рибосомных 18S, 28S и 5,8S РНК; рибосомальная 5S-РНК и транспортные РНК

синтезируются РНК-полимеразой III, а РНК-полимераза II осуществляет синтез предшественников мРНК; в структуре ДНК выявляются особые регуляторные элементы, названные энхансерами, в присутствии которых резко возрастает скорость транскрипции; при этом энхансеры проявляют активность независимо от ориентации и положения относительно гена, т. е. они могут быть перед геном, внутри или за ним; индукция генов может осуществляться с помощью гормона (стероида), который в составе комплекса с белком-рецептором способен связываться с регуляторной последовательностью ДНК, что сопровождается активированием процесса транскрипции

TRANSPOSONS - ТРАНСЛЯЦИЯ — (от англ. translation — перевод) процесс перевода информации, заложенной в последовательности нуклеотидов и-РНК, в последовательность аминокислотных остатков полипептидной цепи; процесс т. протекает в цитоплазме клетки на рибосомах; на включение в белок каждой аминокислоты расходуется энергия четырех высокоэнергетических связей (одной молекулы АТФ на стадии синтеза аминоацил-тРНК и трех молекул ГТФ — на стадиях связывания аминоацил-тРНК и трансляции)

TRANSPOSONS (TP-ELEMENTS) - ТРАНСПОЗОНЫ (ТП-ЭЛЕМЕНТЫ) — сегменты ДНК, содержащие гены, не имеющие непосредственного отношения к транспозиции; т. могут нести гены устойчивости к антибиотикам, гены токсинов или гены дополнительных ферментов клеточного метаболизма

TRANSFERRNA (TRNA) SEQUENCE - ТРАНСПОРТНАЯ РНК (тРНК) — небольшие последовательности (75-90) мононуклеотидов, содержащие антикодон из 3-х мононуклеотидов, комплементарный кодону для аминокислоты в информационной РНК, расположенный в тРНК в месте локализации антикодоновой петли, недалеко от вариативной петли; функция тРНК состоит в том, чтобы транспортировать аминокислоты к рибосоме и вставлять их в определенные участки полипептидной цепи при ее биосинтезе (процесс трансляции), переводя последовательность нуклеотидов в кодоне и-РНК в последовательность аминокислотных остатков первичной структуры белка

TRANSFERASE- ТРАНСФЕРАЗЫ—класс ферментов, катализирующих реакции переноса различных групп (метильные, гидроксиметильные, формильные, карбоксильные, карбамоильные, альдегидные, ацильные, алкильные, аминные и др.) от одного субстрата (донор) к другому (акцептор); в реакциях, катализируемых трансферазами, принимают участие пиридоксальфосфат, биотин, тиаминпирофосфат, 2-аминоаденозин, SH-KoA; название фермента формируется по принципу: акцептор группа трансфераза или доноргруппа трансфераза (метионин-метилтрансфераза, тиолметилтрансфераза, серингидроксиметилтрансфераза, глутаматформилтрансфераза, холинацилтрансфераза, транскетолаза, трансальдолаза и др.); к этому классу принадлежат ферменты, переносящие гликозильные группы (фосфорилаза, амилосахараза, декстрансахараза и др.); трансферазы представлены 8 подклассами

THE TERTIARY STRUCTURE OF PROTEINS - ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА — определенное расположение полипептидной цепи в пространстве, стабилизированное, в основном, за счет слабых (гидрофобных, гидрофильных и ионных), а также несколькими ковалентными дисульфидными (-S-S-) связями

THE TERTIARY STRUCTURE OF DNA - ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА ДНК — определенное пространственное расположение двух полинуклеотидных цепей ДНК, комплементарно связанных между собой за счет водородных связей, приобретающих устойчивую структуру, стабилизированную нековалентными связями с белками (гистонами)

TRIACYLGLYCEROLS - ТРИАЦИЛГЛИЦЕРИНЫ — (нейтральные липиды) сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот

ENZYMES - ФЕРМЕНТЫ — (от англ. enzyme) энзимы, белки, обладающие каталитической активностью, способные ускорять протекание химических реакций в живых организмах; от обычных функциональных белков их отличает то, что на поверхности белковой глобулы у них располагается активный центр; это участок, образованный из различных аминокислотных

остатков, собранных из различных областей полипептидной цепи, где происходит связывание и превращение субстрата; кроме активного центра, у некоторых ферментов имеется еще и регуляторный участок; в этом участке связываются молекулы, оказывающие влияние на связывание и превращение субстрата в ферментативном процессе; при этом сами регуляторы не претерпевают изменений; все биокатализаторы являются белками, еще и потому, что через упорядоченный синтез белков, информация о которых заложена в геноме клетки, может осуществляться управление химическими реакциями, протекающими в клетке; активность ферментов зависит от параметров среды (температура, pH, ионная сила, природа растворителя, присутствия мицелл), природы и концентрации (фермента-субстрата, фермент субстратного комплекса), эффекторов (активаторов и ингибиторов), коферментов (для сложных ферментов), природы и расположения функциональных групп в области активного центра

FLAVINADENIN DINUCLEOTIDE (FAD) - ФЛАВИНАДЕНИН-ДИНУКЛЕОТИД (ФАД) — сложное биологическое соединение, предшественником которого является витамин B₂ (рибофлавин); ФАД выполняет роль донора и акцептора электронов и протонов в окислительно-восстановительных реакциях, катализируемых специфическими дегидрогеназами; восстановленной формой ФАД является ФАДН, которая, в основном, генерируется в цикле трикарбоновых кислот (цикле Кребса) и в процессе липогенеза; при окислении в митохондриях одной молекулы ФАДН синтезируется две молекулы АТФ

FURAN- ФУРАН — углеводородный цикл из пяти членов, в состав которого входит атом кислорода

HELICASE - ХЕЛИКАЗЫ — ферменты, расплетающие двойную спираль ДНК и удерживающие ее одиночные цепи от воссоединения

CHLOROPLASTS- ХЛОРОПЛАСТЫ — зеленые пластиды, содержащие пигмент хлорофилл, в которых протекает фотосинтез — процесс синтеза углеводов при участии энергии света; величина хлоропласта 4-6 мкм, овальной формы и зеленого

цвета; содержатся в листьях, стеблях, плодах, прицветниках и др.; каждый хлоропласт окружен двойной мембраной и имеет сложную систему внутренних мембран; основная структурная единица хлоропласта — тилакоид, который представляет собой плоский мешочек, ограниченный однослойной мембраной; в мембране тилакоида находится хлорофилл и другие пигменты, а также ферменты, принимающие участие в реакциях фотосинтеза; тилакоиды собраны в стопки — граны; в матриксе хлоропласта содержится собственная ДНК, различные РНК и рибосомы; в каждой клетке около 20-30 х

HOLOENZYME-ХОЛОФЕРМЕНТ — активная форма фермента, состоящая из кофермента и белка (белковой части фермента)

EXON-ЭКЗОНЫ — участки в структуре ДНК и преРНК, несущие генетическую информацию о структуре белка и чередующиеся с нитронами; в процессе сплайсинга интронные участки вырезаются, а экзоны сшиваются между собой, образуя функционально активную и-РНК; считывание информации с и-РНК происходит на рибосоме, обеспечивая упорядоченный синтез полинуклеотидной цепочки белка

ECOSYSTEM — ЭКОСИСТЕМА — сообщество организмов, обитающих в определенной среде и связанных между собой в единое функциональное целое взаимозависимым круговоротом веществ и энергии

GENEEXPRESSION —ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ — активирование процессов транскрипции, т. е. биосинтеза преРНК на одной из полинуклеотидных цепочек ДНК и трансляции — биосинтеза белка на мРНК

Endoplasmicreticulum -ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ СЕТЬ —(эндоплазматический ретикулум) система разветвленных каналов и цистерн, ограниченных мембранами, пронизывающих гиалоплазму; каналы э. с. заполнены бесструктурной жидкостью — матриксом; различает два типа э. с. гладкая (агранулярная) и шероховатая (гранулярная); на мембранах гладкой э. с. находятся ферменты липидного и углеводного обмена, производящие синтез липидов и углеводов, а на мембранах шероховатой э. с. располагаются рибосомы, обеспечивающие синтез белков; по

каналам э. с. вещества могут транспортироваться из клетки в клетку

EUKARYOTES - ЭУКАРИОТЫ — (от греч. ей — хорошо и karyon — ядро) организмы, клетки которых имеют клеточное ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной оболочкой; отличительной особенностью э. от прокариот является наличие у них в органоидах (митохондриях и хлоропластах) небольших по размеру молекул ДНК, а также то, что все э. размножаются делением ядра с образованием настоящих хромосом; для большинства э. характерен половой процесс, при котором образуются ядра с уменьшенным вдвое (гомологичный набор) числом хромосом (см. мейоз); в надцарство э. входят разнообразные простейшие (жгутиковые, инфузории, споровики), грибы, животные и растения

CORE - ЯДРО — органоид, обеспечивающий хранение и передачу генетической (наследственной) информации; основными элементами я. являются ДНК, РНК и белки, комплекс которых обеспечивает протекание в ядре основных трансформационных процессов; в я. протекают процессы, обеспечивающие удвоение ДНК — репликация и процессы передачи генетической информации с ДНК → преРНК →и-РНК — транскрипция и процессинг

Литература

1. David Klark, Nanette, Pasdernik, Michelle Megchee – Molekulyar biology, Trird Edition, Academic Cell. USA: 2018. pp 1006
2. J.Koolman., K.H.Roehm. Color Atlas of Biochemistry. Thieme Stuttgart · NewYork. 2007.
3. Коннова С.А., Галицкая А.А., Плешкова Е.А., Каневский М.В., Фоденко Ю.П. Методическое пособие к малому практикум по биохимии. – С: 2017. -75с
4. Lehninger «Principlesofbiochemistry» New York, 2008. By W.H. Freeman and Company All rights reserved.
5. Mirxamidova P. va boshqalar. Biokimyo. Toshkent, “Universitet”. 2002 y. -176 b
6. Richard A Harvey., Denise R Ferrier . Biochemistry. Lippincott Wiliams and Wilkins. China. 2011.
7. Zikiryayev A., P.Mirhamidova. O’simliklar biokimyosidan amaliy mashhg’ulotlar. Toshkent, “Mehnat”, 2001 y.109 b
8. Борисова Г.Г., Чукина Н.В., Киселева И.С., Малаева М.Г. Биохимия. Практикум. – У: 2017 – 116 с
9. Захаров А.Н. Техника безопасности химических лабораториях. Л: Химия, 1991.
10. Ленинджер. “Основы биохимии”. – М.: «Мир», 2015. 1.2.3 – том.
11. Матвеева И.В., Марсянова Ю.А. Практикум по биохимии: Учебное пособие 2-ое издание, исп. И.доп.,Рига: 2018.-169 с
12. Методы биохимических исследований. Электронные издание. Краснодарск. СФУ 2012г
13. Мирхамидова П., Бобохонова, Умарова Г. Б. , Кадырова Д. А. Биологическая химия. Ташкент.Издательство «Навруз», 2018г
14. Рогожин В.В., Рогожина Т.В. Практикум по биохимии сельскохозяйственной продукции. Санкт – Петербург, ГИОГД. 2016, - 477 с
15. Романовская Е.В.Гришина Т.В., Красовская И. Е., Леонова Л.Е.,Скворцевич Е.Г. Практикум по биохимии. Санкт-Петербург.2009.207 с.
16. Методы биохимических исследований. Коллектив авторов. Электронное издание. Красноярск. СФУ 2012.
17. Таганович А. Д. Биологическая химия. Практикум. Минск: БГМУ,2019.200 с.
18. Уильсон К и Дж.Уолкер. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии. Москва 2013г. Изд-во. «Бином. Лаборатория знаний». 848 стр.
19. Чиркин А. А.. Практикум по биохимии. Минск “Новое значение” 2002, 501стр
20. Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н. Лабораторный практикум. Учебное пособие. – СП: Университет ИТМО; ИХ и БТ, 2015г

СОДЕРЖАНИЕ

Глава I. Буферные растворы. Методы определения концентрации ионов водорода	3
Определение концентрации ионов водорода с помощью индикатора	6
Определение pH с помощью универсального индикатора.....	8
Определение pH потенциометрическим методом	9
Глава II. Белки	12
Цветные реакции	12
Биуретовая реакция.....	19
Реакции осаждения белков	26
Диализ белков.....	28
Определение изоэлектрической точки белка	28
Разделение аминокислот с помощью бумажной хроматографии	30
Глава III. Сложные белки	33
Нуклеопротеины.....	33
Выделение дезоксирибонуклеопротеинов из печени или селезенки	34
Выделение нуклеопротеинов из дрожжей и их гидролиз	35
Хромопротеины.....	36
Выделение кристаллов оксигемоглобина.....	38
Реакции получения гемина.....	39
Определение гемина с амидопирином.....	39
Гликопротеины.....	40
Выделение муцина из слюны	40
Фосфопротеины.....	41
Определение фосфата в казеине.....	42
Экстракция белков из биологических объектов	43
Экстракция общих белков из растений	43

Разделение белков на отдельные фракции	45
Методы определения количества белка в биологических объектах и метаболизма белков	48
Определение содержания белка по азоту	48
Определение содержания остаточного азота в крови.....	50
Определение азота, который не входит в состав белков тканей.....	51
Определение азота в аминокгруппах с титрованием формальдегидом	52
Определение количества белков биуретовым методом	54
Определение количества белков методом микробиурета	55
Определение содержания белка по методу Лоури.....	56
Гидролиз белков и определение их аминокислотного состава.....	58
Определение аминокислот методом тонкослойной хроматографии	59
Определение белковых фракций методом электрофорезом в полиакриламидном геле.....	61
Глава IV. Липиды	69
Растворение и эмульгирование жиров	70
Качественные реакции, используемые при определении жиров ..	71
Определение глицерина в жире (реакция акролеина)	71
Выделение и определение общих липидов от биологических объектов	76
Определение содержания масел по методу Сокслета.....	77
Определение фракционного состава липидов в биологических объектах	77
Качественная реакция желчных кислот.....	78
Определение количества холестерина в органах и тканях	79
Выделение лецитина из желтка куриного яйца	82
Обнаружение ацетоновых тел в моче	83
Определение ацетоуксусной кислоты в моче	84
Определение перекисного числа жиров	85

Глава V. Углеводы.....	87
Моносахариды.....	88
Восстановительные свойства моносахаридов.....	88
Реакции, используемые при определении моносахаридов	89
Дисахариды.....	91
Определение восстановительных свойств дисахаридов	93
Полисахариды	94
Реакция крахмала с йодом	94
Определение восстановительных свойств крахмала	95
Определение сахаров с восстановительными свойствами по методу Бертрана	95
Определение количества глюкозы в биологических жидкостях по методу Хагедорна-Иенсена	99
Определение восстановительных сахаров по методу Бьерра	101
Определение фруктозы	102
Определение содержания сахарозы	103
Определение крахмала.....	105
Определение содержания крахмала по методу Починка	105
Определение содержания клетчатки	107
Определение содержания гликогена	108
Определение содержания пировиноградной кислоты	109
Определение процесса гликолиза	111
Определение уровня АТФ в тканях	114
Определение уровня АТФ в тканях	118
Глава VI. Нуклеиновые кислоты	120
Качественная реакция ДНК	120
Определение общего количества нуклеиновых кислот в тканях животных	121
Определение общего количества нуклеиновых кислот в тканях животных	123
Глава VII. Ферменты	124
Влияние амилазы на крахмал	124
Определение активности фермента сахаразы	125
Термоллабильность ферментов	126

Влияние pH окружающей среды на активность ферментов	128
Специфичность ферментов	128
Вещества, влияющие на активность ферментов (ингибиторы и активаторы).....	130
Определение активности пероксидазы	130
Определение активности фермента глутаматдегидрогеназы.....	132
Влияние желчи на активность липазы	134
Определение активности фермента липазы	135
Определение уреазной активности	136
Ферментативный гидролиз белка.....	136
Определение активности фермента тирозиназа.....	138
Определение активности фермента фосфотазы	138
Глава VIII. Витамины	140
Витамины группы А.....	141
Определение общих каротиноидов.....	142
Витамины группы D	142
Цветные реакции витаминов группы D	143
Витамин Е (токоферол).....	144
Цветные реакции витамина Е	145
Витамин К	146
Качественные реакции витамина К	147
Водорастворимые витамины	148
Витамин В ₁	148
Витамин В ₂	150
Качественные реакции рибофлавина.....	150
Витамин В ₅	151
Качественные реакции витамина В ₅	152
Витамин С.....	153
Качественные реакции витамина С	154
Определение содержания витамина С в пищевых продуктах ..	156
Определение цитрина (витамин Р).....	157

Глава IX. Органические кислоты	159
Определение общей кислотности растений	159
Определение лимонной кислоты	161
Определение содержания лимонной кислоты	161
Определение янтарной кислоты	162
Глава X. Гормоны	165
Открытие иода в щитовидной железе.....	167
Гормоны коры надпочечников.....	168
Качественные реакции адреналина.....	169
Гормоны коры надпочечников.....	170
Качественные реакции кортизона	171
Гормон поджелудочной железы - инсулин	173
Глава XII. Кровь	173
Определение белковых фракций сыворотки крови	173
Определение глюкозы в крови и моче с помощью реактива ортотолуидина	175
Определение количество кальция в сыворотке крови.....	176
Определение количество фосфора в сыворотке крови.....	179
Определение общих фосфолипидов на основе количества общего фосфора в сыворотке крови	182
Определение активности фермента холинэстеразы	183
Глава XII. Молоко.....	185
Качественные реакции молока	186
Качественные реакции молочного сахара	188
Определение витамина С в молоке	189
Ферменты молока.....	190
Определение содержания кальция в молоке	191
Определение кислотности молока	192
Глава XIII. Мышечная ткань	194
Выделение миозина.....	195
Определение креатина и креатинфосфата в мышечной ткани ..	196

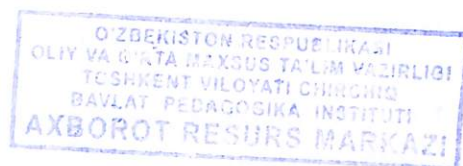
Определение креатинфосфата на основе креатина	197
Определение активности аденозинтрифосфатазы в мышечной ткани.....	199
Глава XIV. Определение фосфора в биологических объектах	202
Определение содержания фосфора с помощью эйконогена	203
Определение фосфора с помощью аскорбиновой кислоты	203
Определение некоторых фракций соединений фосфора	205
Определение общего фосфора, растворимого в кислоте.....	206
Определение неорганического фосфора, растворимого в кислоте	207
Определение неорганического фосфора, растворимого в легкогидролизуемой кислоте.....	207
Разделение фосфолипидной фракции	208
Определение фосфора в нуклеиновой кислоте	208
Экстракция нуклеиновых кислот	209
Приложение	210
Словарь терминов	215
Список литературы	244

Г.И.Мухамедов, П.Мирхамидова, Д.Отажонova

ПРАКТИКУМ ПО БИОЛОГИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Редактор: Х. Тахиров
Художественный редактор: Т. Рахматуллаев
Компьютерная верстка: А. Мухаммадиев

— 13106 —



Лицензия издательства № 2244. 25.08.2020 й.
Разрешение на печать 11.01.2022 й.
Формат 60x84 1/16. Печать офсетная.
«Times New Roman» гарнитура. Уч. изд. л. 12,5.
Тираж 100. Заказ № 9.

Отпечатано в типографии «ZEBO PRINTS».
Адрес: Ташкент, Яшнабадский район, военный городок 22

