

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЕ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра медико-биологической техники

А.Д. СТРЕКАЛОВСКАЯ

БИОХИМИЯ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом
Государственного образовательного учреждения высшего
профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Оренбург 2007

УДК 577.1(07)

ББК 28.027я7

С 84

Рецензент

кандидат медицинских наук доцент кафедры «Профилактической
медицины» химико-биологического факультета ГОУ ОГУ О.А.

Науменко

С 84

Стрекаловская, А.Д.

**Биохимия: методические указания к лабораторным
работам / А.Д.Стрекаловская. – Оренбург: ГОУ
ОГУ,2007.-24 с.**

Методические указания предназначены для студентов
специальности 200402 «Инженерное дело в медико-биологической
практике» при изучении дисциплины «Биохимия»

ББК 28.027я7

©Стрекаловская А.Д.,2007

©ГОУ ОГУ,2007

Содержание

Введение.....	6
1 Витамины.....	7
1.1 Витамины группы А.....	8
1.1.1 Качественные реакции на витамины группы А.....	9
1.2 Витамины группы D (кальциферолы)	10
1.2.1 Качественные реакции на витамины группы D.....	10
1.3 Витамины группы E (токоферолы).....	11
1.4 Витамины группы K (филлохиноны).....	12
1.5 Витамин C (аскорбиновая кислота).....	13
1.5.1 Количественное определение витамина «C» в молоке.....	16
2 Гормоны.....	17
2.1 Открытие йода в щитовидной железе.....	18
2.2 Гормоны мозгового слоя надпочечников.....	18
2.3 Гормоны поджелудочной железы.....	19
3 Химия и обмен липидов.....	20
3.1 Жиры (нейтральные жиры).....	21
3.1.1 Общие понятия жиров	21
3.2 Фосфатиды, или фосфолипиды.....	23
3.2.1 Реакция Сальковского на холестерин.....	25
4 Выделение белков из тканей и биологических жидкостей.....	25
4.1 Ферментативный гидролиз белка.....	26
4.2 Обнаружение в молекулах белков пептидных связей	27
4.2.1 Биуретовая реакция.....	27
4.2.2 Нингидриновая реакция.....	27
4.2.3 Ксантопротеиновая реакция	27
Список использованных источников.....	28

Введение

Биохимия, или биологическая химия это научная дисциплина, исследующая химический состав, строение и свойства живой материи и ее превращения под влиянием химических реакций, взаимозависимость этих реакций, обеспечивающих жизнедеятельность организмов, включая их развитие, самовоспроизведение и адаптацию к условиям окружающей среды. Цель биохимии - познание молекулярных основ жизни.

Биохимия подразделяется на статическую, занимающуюся анализом химического состава живых организмов, динамическую, изучающую превращения веществ в организмах, и функциональную, исследующую процессы, лежащие в основе определенных проявлений жизнедеятельности.

В зависимости от объекта изучения различают биохимию растений, биохимию животных и биохимию микроорганизмов. Биохимия человека называется также медицинской биохимией.

Изучение проблем, составляющих предмет современной биохимии, началось в конце XVIII в. и было обусловлено крупными достижениями в области органической химии, физиологии и медицины. Уже в начале XIX в. был выполнен ряд исследований химического состава и структуры растительных и животных клеток. В 1828 г. Ф. Вёлер впервые синтезировал органическое вещество - мочевины из неорганических соединений. Во второй половине XIX в. была определена структура аминокислот, углеводов и жиров и установлена природа пептидной связи в белках. Исследованиями Ю. Лебега, Л. Пастера, Э. Бухнера были получены первые сведения о химических превращениях белков, жиров и углеводов в живых организмах, а также было положено начало изучению химизма брожения. Работами К.А. Тимирязева начаты исследования процесса фотосинтеза, работами И.Ф. Мишера - исследования химии нуклеиновых кислот.

Работы М.В. Ненцкого, А.Я. Данилевского, А.Н. Баха в конце XIX - начале XX в. выявили сходство основных механизмов биохимических превращений у живых организмов различных групп - растений, животных и микроорганизмов.

В первой половине XX в. были открыты витамины и гормоны, началось выяснение их роли в живом организме. В результате работ О. Варбурга, Г. Эмдена, О. Мейергофа и Х. Кребса были установлены механизмы основных этапов процессов брожения и биологического окисления. Д. Самнер в 1926 г. экспериментально доказал белковую природу ферментов, на основе чего началось быстрое развитие энзимологии - учения о ферментах, хотя первое открытие фермента в проросшем зерне было сделано на 100 лет раньше - в 1814 г. К.С. Кирхгофом, обнаружившим осахаривание крахмала под действием фермента, позже получившего название амилаза.

К 50-м годам XX в. была завершена детальная характеристика основных классов химических веществ, входящих в состав живых организмов, и выяснены пути их превращений. В 1943 г. Ф. Липман открыл кофермент А и выявил его важную роль в синтезе жиров. А. Ленинджер в 1949г. показал, что окислительное фосфорилирование, обеспечивающее живые организмы энергией, идет в митохондриях. В 1953 г. Д. Уотсон и Ф. Крик доказали что

дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) состоит из двух нитей, а К. Ниренберг в 1963 г. расшифровал первый генетический код ДНК и показал взаимосвязь между структурой ДНК организма и составом слагающих этот организм белков, а с 1987 г. - структуры их ДНК.

Расшифровка структуры ДНК существенно расширила возможности прикладной инженерной биохимии, получившей в 70-х годах двадцатого столетия название «биотехнология». Биотехнология основана на использовании клеток дрожжей, бактерий, животных и растений для промышленной выработки целого ряда различных веществ, таких, как ферменты, антибиотики, гормональные препараты, средства защиты растений от вредителей и болезней и ряда других.

Хотя термин «биотехнология» начал широко применяться относительно недавно, многие методы биотехнологии использовались человеком для получения пищевых продуктов с глубокой древности. Так, согласно археологическим данным древнейшим биотехнологическим процессом является процесс сбраживания с помощью микроорганизмов. Уже в шестом тысячелетии до нашей эры в Вавилоне было известно приготовление пива, технология которого была описана на глиняной дощечке, а в третьем тысячелетии до нашей эры там уже производили свыше десяти сортов пива.

Получение дрожжей и заквасок, процессы хлебопечения, виноделия, пивоварения, консервирования и ряда других пищевых производств, в основе которых лежит использование микроорганизмов это область биотехнологии, объединяющей способы получения необходимых человеку продуктов с помощью живых организмов.

Совершенствование физических, химических и физико-химических методов выделения, очистки, фракционирования, анализа и изучения веществ живой природы на базе классической биохимии привело к возникновению новых научных направлений, таких, как молекулярная биология, биоорганическая и бионеорганическая химия, физическая биохимия и химическая энзимология. Научные изыскания в этом направлении в последние десятилетия стремительно развиваются, являясь теоретической базой прикладной биотехнологии.

1 Витамины

Витамины — низкомолекулярные вещества, относящиеся к различным классам органических соединений. Они условно объединены в одну группу по признаку жизненной необходимости для организма. Витамины - неперенные участники важнейших физиологических и биохимических процессов у животных, растений и микроорганизмов. Многие из них входят в состав простетических групп двухкомпонентных ферментов или являются веществами, служащими для синтеза указанных соединений, активируют некоторые ферментные системы.

В основном витамины синтезируются растениями, с которыми главным образом и поступают в организм человека и животных. Некоторые из них образуются симбиотической микрофлорой пищеварительного тракта.

Недостаточное содержание витаминов в пище и кормах, а также нарушение их всасывания в организме ведут к развитию тяжелых нарушений обмена веществ, известных под названием гиповитаминозов и авитаминозов.

Заболевание, возникающее в результате отсутствия того или иного витамина в пище, называют авитаминозом. При относительной недостаточности какого-нибудь витамина наблюдается гиповитаминоз.

Функции витаминов тесно связаны между собой, поэтому обычно наблюдаются полиавитаминозы или полигиповитаминозы. Авитаминозы встречаются весьма редко, чаще же наблюдаются гиповитаминозы как результат нерационального питания или перенесенных заболеваний. Гиповитаминозы могут иметь место и вследствие длительного приема некоторых лекарственных препаратов (сульфонамидов, антибиотиков).

Избыточный прием ряда витаминов ведет к нарушениям обменных функций, известных под названием гипервитаминозов.

В основу классификации витаминов положена их растворимость. По этому признаку витамины делят на две группы:

- а) витамины, растворимые в жирах и органических растворителях;
- б) витамины, растворимые в воде.

Растворимыми в жирах и органических растворителях являются:

- 1) витамины группы А;
- 2) витамины группы D;
- 3) витамины группы Е;
- 4) витамины группы К;
- 5) непредельные (полиненасыщенные) жирные кислоты, имеющие две и больше двойных связей.

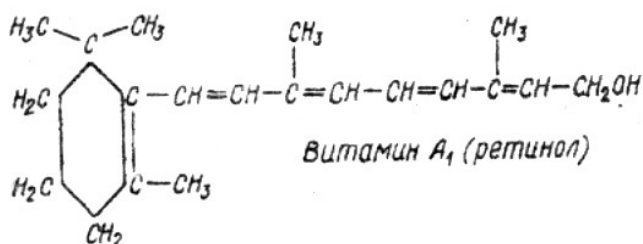
Растворимыми в воде являются:

- а) витамины группы В:
 - 1) В₁-тиамин;
 - 2) В₂-рибофлавин;
 - 3) РР – никотинамид;
 - 4) В₆-пиридоксин;
 - 5) Н-биотин;
 - 6) пантотеновая и парааминобензойная кислоты;
 - 7) холин;
 - 8) инозит;
 - 9) фолиевая кислота;
 - 10) В₁₂ – цианкобаламин;
 - 11) В₁₅ - пангамовая кислота;
- б) витамин С (аскорбиновая кислота);
- в) витамин Р (биофла- воноиды).

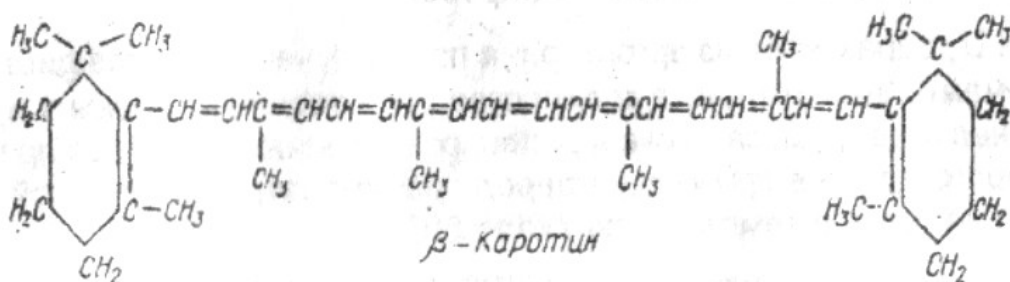
1.1 Витамины группы А

Общие сведения. К группе витаминов А относятся несколько веществ, близких по строению и физиологическим функциям.

Витамин А₁ (ретинол) образуется при расщеплении желто-оранжевых пигментов растений — каротиноидов — в печени и слизистой оболочке тонких кишок при участии фермента каротиказы.

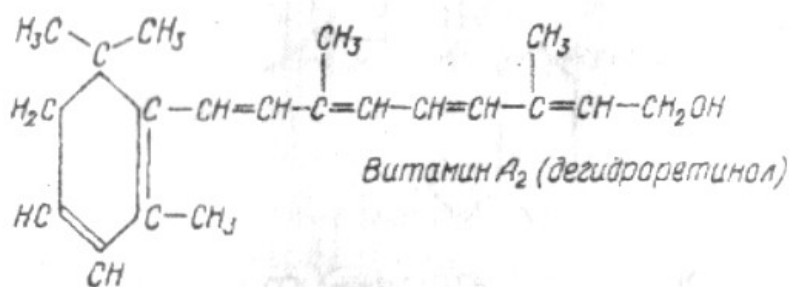


Таким образом, каротиноиды являются провитаминами А. В витамин А₁ превращаются α-, β- и γ-каротины, криптоксантин и некоторые другие каротиноиды. Наиболее активен β-каротин, в состав молекулы которого входят два кольца β-ионона:



При расщеплении симметричной молекулы β-каротина освобождаются две молекулы витамина А₁.

Витамин А₂ (дегидроретинол) найден в печени пресноводных рыб. Он отличается от витамина А₁ наличием добавочной двойной связи в кольце β-ионона:



1.1.1 Качественные реакции на витамины группы А

Реакция с серной кислотой. Под воздействием концентрированной серной кислоты растворы витамина А приобретают сине-фиолетовую окраску возникновение которой связано с водоотнимающим действием реактива. Окраска является нестойкой и быстро сменяется буровой, вследствие образования липохрома.

Реактивы:

а) рыбий жир, медицинский. Употребляют только свежий препарат (см. предыдущую работу);

б) серная кислота, концентрированная ($\rho_{20} = 1,836$);

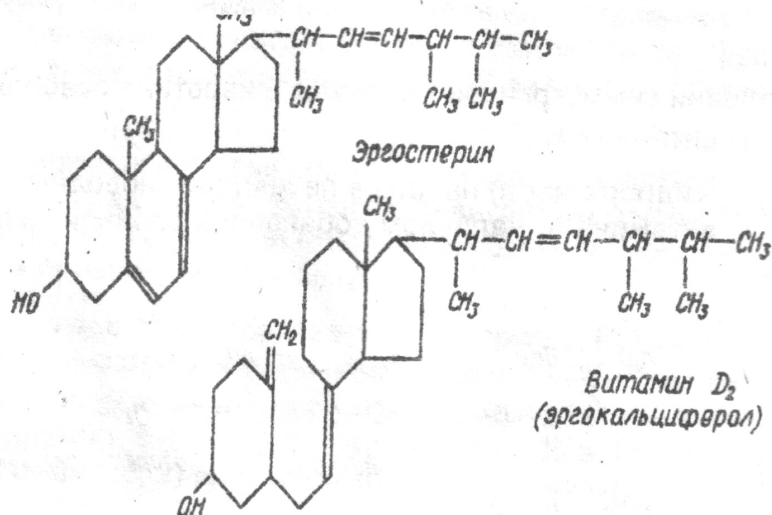
в) хлороформ.

1 каплю рыбьего жира растворяют в 20-25 каплях хлороформа, к раствору добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты и встряхивают. Появляется сине-фиолетовое окрашивание, которое вскоре переходит в красновато-бурое и бурое.

1.2 Витамины группы D (кальциферолы)

Общие сведения. Витамины группы D являются веществами стероидной природы. Наибольшее практическое значение имеют витамины D₂ (эргокальциферол) и D₃ (холекальциферол).

Витамин D₂ образуется из эргостерина при облучении ультрафиолетовыми лучами. Значительные количества эргостерина найдены в дрожжах и спорынье (содержится также в зеленых растениях). Процесс превращения эргостерина в эргокальциферол требует затраты тепловой энергии и протекает при температуре около 80° С:



1.2.1 Качественные реакции на витамины группы D

Реакция с анилином

Реактивы:

а) рыбий жир, витаминизированный;

б) анилин;

в) соляная кислота, концентрированная.

К 1 мл витаминизированного рыбьего жира прибавляют 4—5 мл анилина и 0,5 мл концентрированной соляной кислоты. Содержимое пробирки нагревают до кипения и кипятят 20—30 с. Жидкость принимает красную окраску.

Реакция с бромом

Реактивы:

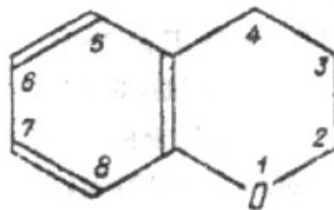
а) рыбий жир, витаминизированный;

б) раствор брома в хлороформе (1:60).

На часовом стекле смешивают 2—3 капли рыбьего жира и 3—4 капли хлороформного раствора брома. Через некоторое время появляется зеленое или зеленовато-голубое окрашивание.

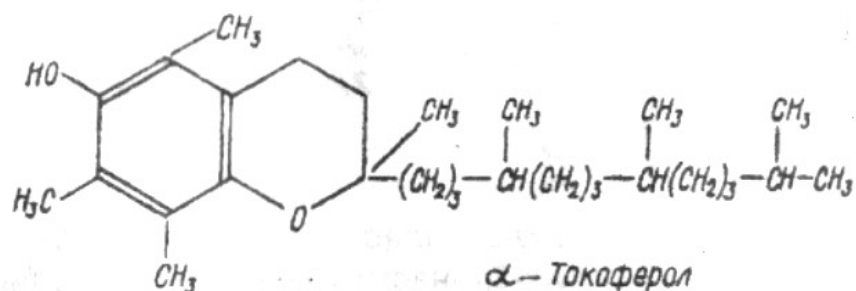
1.3 Витамины группы Е (токоферолы)

Общие сведения. К группе витаминов Е относятся несколько соединений, в основе строения которых лежит бициклическое ядро хромана, связанное с остатком спирта фитола.



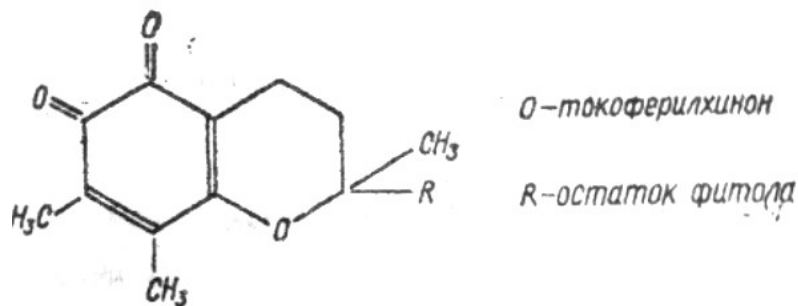
Хроман

Как видно, хроман состоит из бензольного и пиранового циклов. В зависимости от количества метильных групп и их расположения различают α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, ζ - и η -токоферолы. Наибольшей витаминной активностью обладает α -токоферол, у которого бензольное кольцо является полностью замещенным:



Токоферолами богаты растительные масла, например соевое, подсолнечное, кунжутное, пшеничных зародышей, сафлоровое, арахисовое, хлопковое, льняное, рапсовое. Содержатся они также во многих продуктах растительного и животного происхождения: яйцах, печеночном жире трески, молоке и сливочном масле, печени, говядине, кочанном салате, шпинате, семенах арахиса, плодах шиповника, белой смородины и др. Суточная потребность человека в витамине Е составляет от 10 до 30 мг α -токоферола.

Качественные реакции на токоферолы. Реакция с азотной кислотой. Реагируя с сильными окислителями, например с концентрированной азотной кислотой, α -токоферол превращается в о-токоферилхинон, который затем образует соединение, окрашенное в красный или желтовато-красный цвет.



Реактивы:

а) масляный концентрат витамина Е, 0,15 % -ный раствор в абсолютном этиловом или бутиловом спирте;

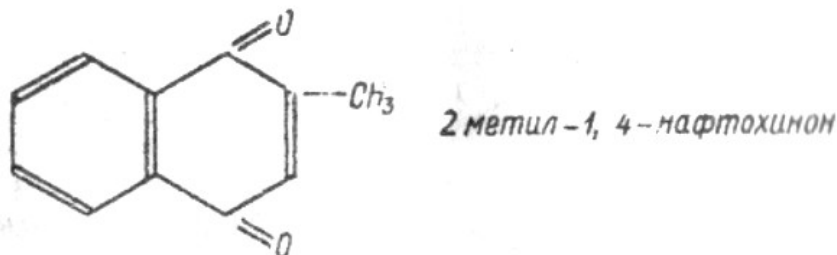
б) азотная кислота, концентрированная.

К нескольким каплям спиртового раствора витамина Е осторожно добавляют 8-10 капель концентрированной азотной кислоты и пробирку слегка встряхивают. Через 1-2 мин содержимое пробирки приобретает красное или желтовато-красное окрашивание.

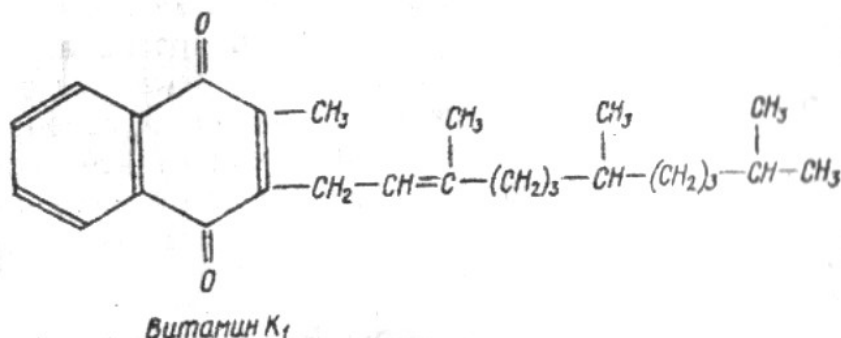
Реакция протекает бурно, поэтому рекомендуем азотную прибавлять медленно, по стенке пробирки, и проводить в вытяжном шкафу.

1.4 Витамины группы К (филлохиноны)

Общие сведения. Факторы свертывания крови — витамины группы К — являются производными 2-метил-1,4-нафтохинона:



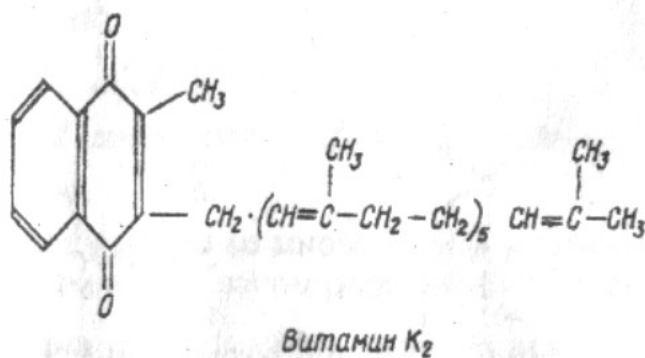
Витамин К₁ синтезируется в хлоропластах зеленых растений. Составные части его молекулы- 2-метил-1,4-нафтохином и остаток спирта фитола:



Много витамина К₁ содержится в белокочанной и цветной капусте, томатах (особенно зеленых), шпинате, тыкве, плодах шиповника, листьях крапивы, люцерне, петрушке, хвое сосны и ели, листьях каштана, моркови. Витамин К₁ найден и животных продуктах - телятине, говядине, свинине, почках, печени.

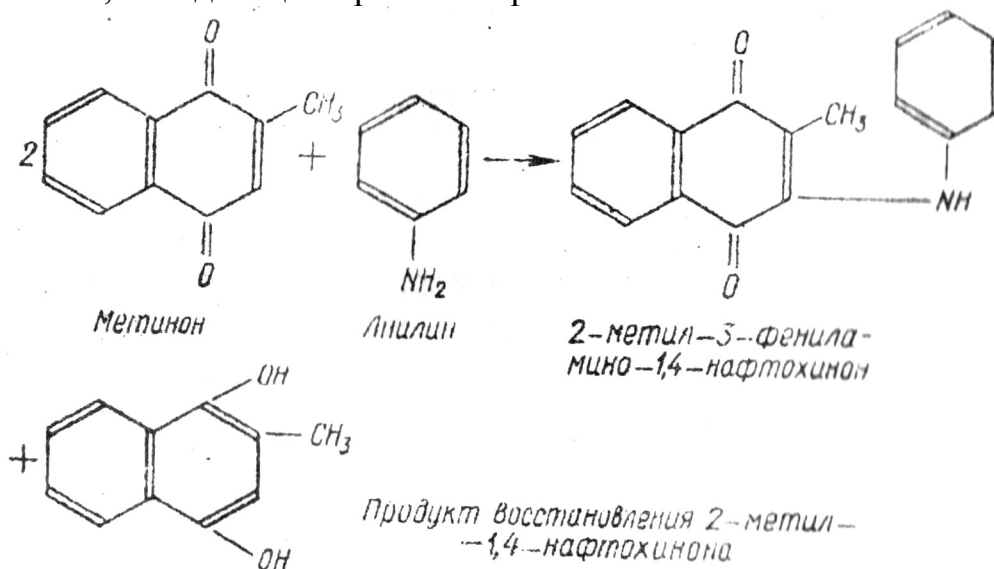
Витамин К₂ синтезируется микроорганизмами - симбионтами, находящимися в кишечнике. Выделен он также из гниющей рыбной муки. По

химическому строению представляет собой 2-метил-3-дифарнезил-1,4-нафтохинон:



Витаминовая ценность витамина К₂ ниже, чем витамина К₁ (и составляет примерно 50 % активности последнего).

Качественные реакции на 2-метил-1,4-нафтохинон. Реакция с анилином, 2-метил-1,4-нафтохинон (метинон) с анилином образует 2-метил-3-фениламино-1,4-нафтохинон, обладающий красной окраской:



Реактивы:

а) викасол 0,1 % - ный водный раствор, или метинон, 0,2 % -ный раствор в этиловом спирте;

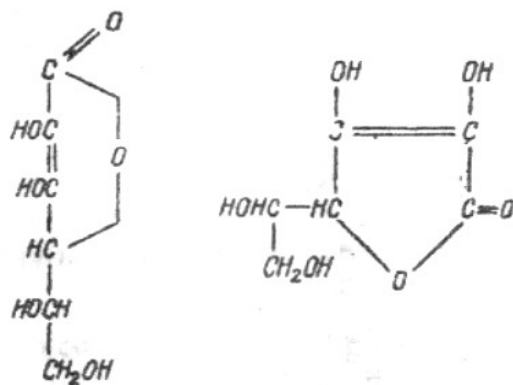
б) анилин;

К 1 мл раствора викасола или метинона добавляют 6-8 капель анилина и взбалтывают. Содержимое пробирки приобретает красную окраску.

1.5 Витамин С (аскорбиновая кислота)

Общие сведения. Антицитогонный витамин С – аскорбиновая кислота – по химическому составу является лактоном 2,3 – диенол – гулоновой кислоты.

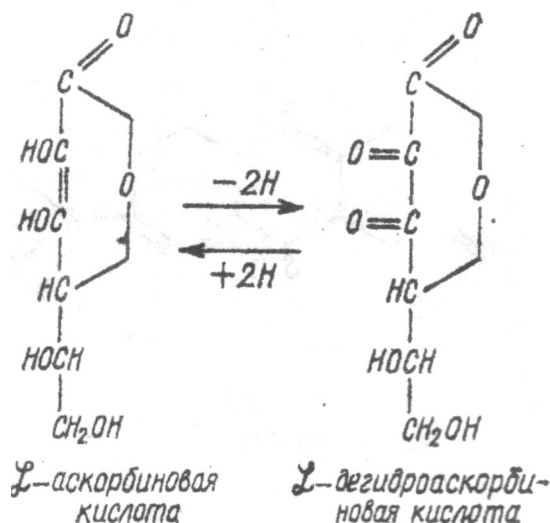
Аскорбиновая кислота – окисленное производное шестиатомного спирта сорбита – характерна наличием диенольной группы – С = С - которая обуславливает способность витамина С легко подвергаться окислению с одновременным восстановлением других соединений.



Варианты структурной формулы аскорбиновой кислоты

Витаминой активностью обладает лишь L-аскорбиновая кислота; D-аскорбиновая кислота физиологически инертна. L - аскорбиновая кислота -бесцветные кристаллы, легко растворимые в воде, сильно кислого вкуса.

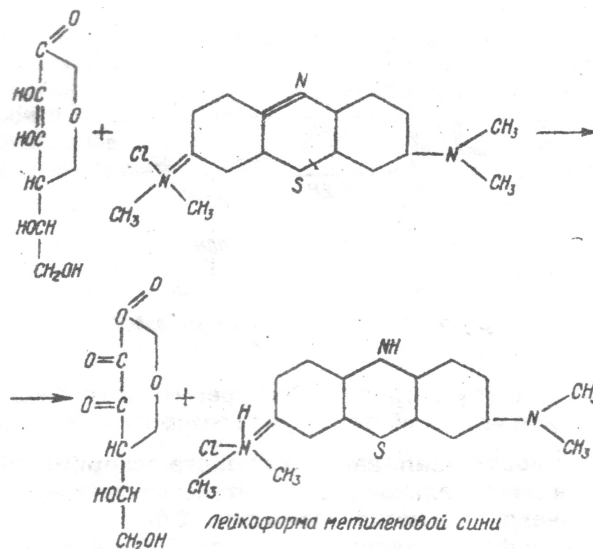
Нерастворима в бензоле, хлороформе, диэтиловом эфире, жирах. Водные растворы аскорбиновой кислоты имеют, кислую реакцию. Аскорбиновая кислота легко окисляется, образуя дегидроаскорбиновую кислоту, сохраняющую витаминную ценность:



Витамин С принимает участие во многих ферментативных реакциях, являясь активатором или ингибитором ряда энзиматических систем. Исследование восстанавливающих свойств аскорбиновой кислоты.

Легко вступая в окислительно-восстановительные реакции, аскорбиновая кислота восстанавливает метиленовую синь, 2,6-дихлорфенолиндофенол, железосинеродистый калий, азотнокислое серебро и другие вещества. Это свойство положено в основу качественных реакций на витамин С.

Реакция с метиленовой синью. Аскорбиновая кислота на свету восстанавливает метиленовую синь в бесцветное соединение (лейкоформу), окисляясь в дегидроаскорбиновую кислоту.



Реактивы:

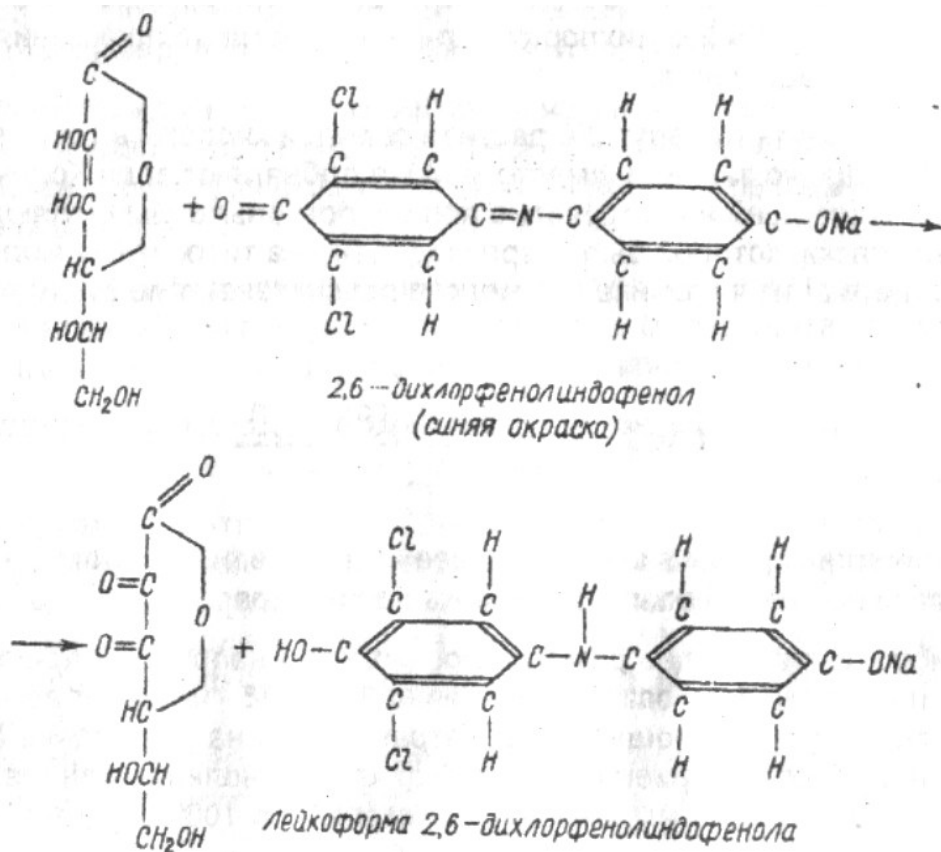
а) сок картофеля или капусты. Клубень картофеля или часть кочана капусты натирают на терке из нержавеющей стали. Растертую массу отжимают через марлю, сложенную в два слоя;

б) метиленовая синь, 0,01 %-ный раствор;

в) натрий углекислый, 5%-ный раствор.

К 1 мл свежееотжатого сока картофеля или капусты добавляют 1-2 капли раствора метиленовой сини и 2-3 капли раствора соды. Пробирку слегка подгревают. Наблюдают, обесцвечивание синей окраски.

Реакция с 2,6 –дихлорфено-линдофенолом. Аскорбиновая кислота окисляется 2,6-дихлорфено-линдофенолом в дегидроаскорбиновую кислоту, а сам реактив восстанавливается при этом в бесцветное соединение (лейкоформу):



Реактивы:

- а) сок капусты или картофеля (приготовление - см. предыдущую работу);
- б) 2,6-дихлорфенолиндофенол, натриевая соль, 0,001%-ный раствор (см. «Количественное определение витамина С в растительном сырье»);
- в) соляная кислота, 2 %-ный раствор.

В пробирку наливают 1 мл сока капусты или картофеля, прибавляют 3-4 капли 2 %-ного раствора соляной кислоты и по каплям раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола. Реактив будет обесцвечиваться до тех пор, пока вся аскорбиновая кислота не окислится в дегидроаскорбиновую, после чего первая же капля раствора окрасит жидкость в розовый цвет, так как 2,6-дихлорфенолиндофенол уже не восстанавливается.

1.5.1 Количественное определение витамина «С» в молоке

Принцип метода: метод основан на титровании пробы в кислой среде раствором соли 2,6-дихлорфенолиндофенола без предварительного осаждения белков.

Ход работы: 10 мл молока разводят дистиллированной водой в 3 раза (или такое же количество молока в шесть раз). 10 мл разведенного молока вносят пипеткой в коническую колбу на 25-50 мл, куда заранее напивают 1 мл 2 % раствора соляной кислоты и доводят дистиллированной водой до объема 15 мл. Затем взбалтывают содержимое колбы, титруют 0,001%-ным раствором 2,6-дихлорфенол-индофенола до появления слабо-розового окрашивания.

Для слепого опыта берут 2 % раствор соляной кислоты в таких количествах, как указано выше, и вместо молока добавляют воду. Количестве

краски, пошедшей титрование при слепом опыте, вычисляют из количества краски, которой было израсходовано на титрование молока. Расчет: содержание витамина С в молоке X, мг % рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{B \cdot K \cdot C \cdot 0,38 \cdot 100}{10},$$

(1.1)

где В - количество краски в мл, пошедшее на титрование молока, за вычетом поправки на слепой опыт;

К - поправка на титр краски;

С - число, выражающее разведенное молоко (например, при разведении молока 1:2 0,038 - разведение равно 3;

0,038 - число мг аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл, затраченному на титрование (0,001 % - ный раствора натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола;

10 - количество молока в мл, взятое для титрования;

100 - пересчет в мг %.

2 Гормоны

Гормоны - специфические регуляторы биохимических процессов в организме, вырабатываемые железами внутренней секреции. Они играют большую роль в обеспечении замечательной способности живых организмов — саморегулировании (авторегуляции) биохимических и физиологических процессов, поддержании их на относительно стабильном уровне.

В организме человека и животных гормоны вырабатываются щитовидной и паращитовидными железами, надпочечниками, поджелудочной железой, гипофизом, половыми железами, эпифизом. Некоторые гормоны (или гормоноподобные вещества) вырабатываются в желудочно-кишечном тракте, системе кровообращения, околоушной слюнной железе, почках и других органах и тканях. По химической природе гормоны можно разделить на три группы:

- производные аминокислот (гормоны щитовидной железы и мозгового слоя надпочечников);
- полипептиды и белки (гормоны гипофиза, поджелудочной железы);
- стероидные соединения (гормоны коркового слоя надпочечников и половых желез);

Характер влияния гормонов на обмен веществ отличен от механизма действия ферментов и витаминов. Они не входят в состав молекул биологических катализаторов, ферментов, отличаясь этим от витаминов.

Гормоны в отличие от ферментов не принимают непосредственного, видимого участия в химических реакциях и их не удастся включить в химические уравнения, выражающие основные процессы обмена белков, нуклеиновых кислот, липидов, углеводов, минеральных соединений. Считают, что роль

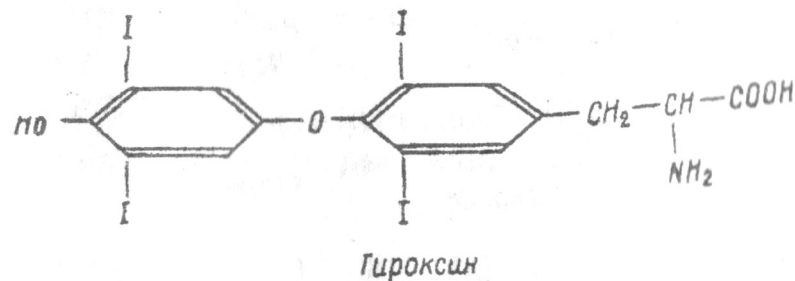
гормонов сводится к так называемому аллостерическому регулированию, т. е. изменению пространственной конфигурации молекул.

Ряд гормонов, главным образом белковой и пептидной природы, влияет на проницаемость клеточных и субклеточных мембран, некоторым из них свойственны функции активаторов или ингибиторов ферментных систем (В первую очередь - окислительно-восстановительных), другие (в основном стероидные) принимают участие в процессах биосинтеза белковых веществ.

Роль ряда гормонов сводится к преимущественному регулированию процессов работы других желез внутренней секреции.

2.1 Открытие йода в щитовидной железе

В щитовидной железе синтезируются несколько соединений, обладающих гормональным действием. В составе молекулы основного гормона — тироксина (тетраиодтиронина) содержатся четыре атома йода



Тироксин и триодтиронин, окисляясь, образуют тетра- и триоддуксусную кислоты, которые играют каталитическую роль в окислительных процессах.

Щитовидная железа вырабатывает также гормон тиреокальцитонин, снижающий уровень кальция в крови.

Реактивы:

а) препарат тиреодин (представляет собой обезжиренную, высушенную и измельченную щитовидную железу убойного скота)

б) углекислый натрий, в порошке;

в) азотнокислый калий, в порошке;

г) серная кислота, 15 %-ный раствор;

д) хлороформ;

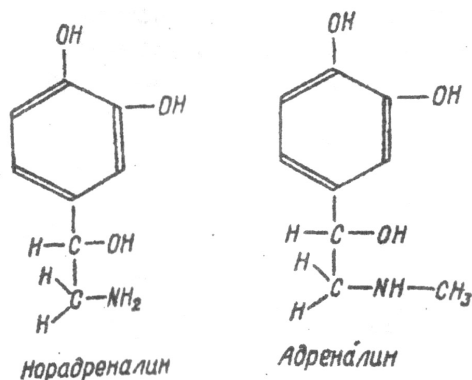
в) хлорамин, 5 %-ный раствор, свежеприготовленный (или хлорная вода).

0,5 г порошка тиреодина тщательно смешивают в тигле с 2 г смеси азотнокислого натрия и углекислого натрия (5:7) и нагревают до обугливания.

Остаток растворяют в 20 мл воды и фильтруют. Фильтрат подкисляют 15 %-ным раствором серной кислоты до слабокислой реакции (по лакмусу), после него к нему добавляют 5 мл хлороформа, 4-5 мл свежеприготовленного раствора хлорамина (или хлорной воды) и встряхивают. Хлороформный слой принимает красно-фиолетовое окрашивание.

2.2 Гормоны мозгового слоя надпочечников

Общие сведения. В хромоффинных клетках мозгового слоя надпочечников образуются два гормона - адреналин и норадреналин. Они являются производными ортодоксибензола (пирокатехина) и синтезируются в организме в результате ферментативных превращений аминокислоты тирозина (или фенилаланина) при участии метионина.



Адреналин и норадреналин образуются также в хромоффинных клетках ганглиозной ткани.

Адреналин - весьма неустойчивое вещество. Он легко окисляется, и сам является хорошим восстановителем. Так, он способен восстанавливать металлическое серебро из раствора азотнокислого серебра, медь - из закиси меди и т. д. Особенно легко проходит окисление адреналина в нейтральной и щелочной среде. Продукты окисления адреналина (дегидроадреналин, адренохром и др.) принимают участие в окислительных процессах в организме.

Качественные реакции на адреналин. Реакция с хлорным железом. Растворы адреналина дают с хлорным железом изумрудно-зеленое окрашивание, характерное для гидроксильных групп, расположенных в ортоположении.

Реактивы:

- а) адреналин, раствор 1:1000;
- б) хлорное железо, 3 %-ный раствор;
- в) аммиак, 10 %-ный раствор.

0,5 мл раствора адреналина смешивают с 2 мл воды и прибавляют 1 каплю раствора хлорного железа. Содержимое пробирки тотчас же окрашивается в изумрудно-зеленый цвет. От прибавления 1 капли раствора аммиака окраска переходит в вишнево-красного, а затем принимает коричневый оттенок.

2.3 Гормоны поджелудочной железы

Общие сведения. В поджелудочной железе вырабатывается несколько веществ, обладающих гормональным действием.

β -клетки островков Лангерганса синтезируют инсулин, являющийся одним из важнейших регуляторов обмена углеводов в организме. Роль островковых клеток в выработке инсулина была доказана Л. В. Соболевым.

В α -клетках островков Лангерганса образуется гормон глюкагон. Он также влияет на углеводный обмен, но его действие оказывается противоположным инсулину.

Клетки эпителия мелких протоков железы вырабатывают гормон липокаин, участвующий в обмене жиров.

Гормон ваготонин повышает тонус парасимпатической нервной системы, а центропнеин влияет на дыхательный центр. Эти гормоны изучены еще недостаточно.

Реакции на инсулин. Реакция с разбавленным раствором едкой щелочи. При добавлении к раствору инсулина очень разбавленного раствора едкого натра или едкого калия выпадает хлопьевидный осадок, растворяющийся при подкислении.

Реактивы:

- а) раствор инсулина (в ампулах);
- б) едкий натрий или едкий калий, 0,7 % ный раствор;
- в) уксусная кислота, 0,5 %-ный раствор.

К 10-15 каплям раствора инсулина добавляют по каплям 0,1 %-ный раствор едкой щелочи до выпадения хлопьевидного осадка (рН 5,0-5,2), который растворяется при подкислении 0,5 % - ным раствором уксусной кислоты до рН 2,5 – 3,5. Реакции, свидетельствующие о белковой природе инсулина. С раствором инсулина проделывают реакции, доказывающие его белковую природу, - биуретовую.

3 Химия и обмен липидов

Под общим названием «липиды» объединяют большую группу нейтральных жиров и жироподобных веществ (или липоидов). Свойством, общим для всех этих соединений, является их растворимость в органических растворителях (бензоле, петролейном эфире, бензине, хлороформе, ацетоне, диэтиловом эфире, сероуглероде и др.) и нерастворимость в воде.

По химической природе липиды делят на следующие группы:

- а) жиры (нейтральные жиры), или триглицериды;
- б) высоко - молекулярные жирные кислоты;
- в) фосфатиды (или фосфолипиды);
- г) цереброзиды;
- д) стеринны и стериды;
- е) ганглиозиды;

ж) воска и воскоподобные вещества. Жиры и липоиды играют огромную роль в жизнедеятельности человека и животных.

Жиры - важный энергетический резерв организма (так называемый запасной или резервный жир). Они входят также в состав протоплазмы клеток, являясь структурными компонентами. Содержание резервного жира в организме зависит от уровня и характера питания, количество же протоплазматического (или структурного) жира не убывает даже при сильном голодании и не увеличивается при патологическом ожирении. Липоидам принадлежит весьма важная роль в процессах жизнедеятельности. Они встречаются во всех клетках и тканях организма, обычно сопутствуя жирам; особенно много их в нервной системе. Липоиды концентрируются на периферии клеток, образуя полупроницаемые мембраны, изобразительно

регулирующие поступление веществ в клетку и их отток. Липиды в организме животных образуют комплексные соединения с белками - липопротеиды.

Стерины входят в состав белого вещества головного мозга, участвуют в образовании ряда биологически активных веществ - витаминов, гормонов, желчных кислот и т.д.

3.1 Жиры (нейтральные жиры)

3.1.1 Общие понятия жиров

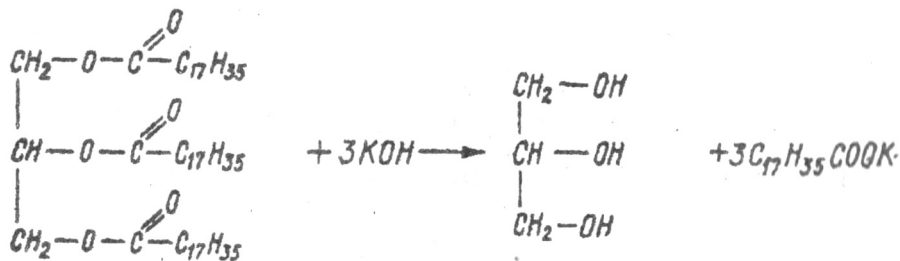
Жиры - сложные эфиры глицерина и высокомолекулярных жирных кислот.

В состав жиров входят многочисленные предельные (или насыщенные) и непредельные (или ненасыщенные) жирные кислоты. Среди предельных кислот чаще встречаются стеариновая ($C_{17}H_{35}COOH$) и пальмитиновая ($C_{15}H_{31}COOH$). Из непредельных жирных кислот основная роль принадлежит олеиновой ($C_{17}H_{33}COOH$), линолевой ($C_{17}H_{31}COOH$) и линоленовой ($C_{17}H_{29}COOH$), большое физиологическое значение имеет также арахидоновая ($C_{19}H_{31}COOH$) кислота. Непредельные жирные кислоты характеризуются наличием двойных связей: в молекуле олеиновой кислоты содержится одна двойная связь, в молекуле линолевой - две, линоленовой - три, арахидоновой - четыре. Благодаря наличию двойных связей непредельные кислоты отличаются высокой реакционной способностью. Линолевая, линоленовая и арахидоновая (так называемые полиненасыщенные) кислоты не синтезируются в организме человека и должны поступать с пищей. Недостаток этих кислот в пище вызывает серьезные нарушения обмена веществ, исчезающие при потреблении продуктов, в состав которых входят непредельные жирные кислоты. Поэтому указанные соединения относят к веществам, обладающим витаминным действием (витамин Р). Линолевая и линоленовая кислоты содержатся в растительных маслах (льняном, подсолнечном и др.), арахидоновая кислота в печеночных жирах рыб, сливочном масле и некоторых видах маргарина.

В состав масел некоторых тропических растений входят также циклические жирные кислоты (хаульмугровая, гиднокарповая и др.).

3.1.1.1 Определение количества глицерина в жире

Химическое определение содержания глицерина в жирах является довольно трудоемким и продолжительным. Сравнительно неплохие результаты дает расчетный метод. Зная эфирное число жира, можно вычислить содержание глицерина, приняв во внимание, что для высвобождения одной молекулы глицерина надо израсходовать три молекулы едкого калия.



Процентное содержание глицерина, в жире γ рассчитывают по формуле

$$\text{процент. содерж.} = \frac{92,06 \cdot \text{э.ч.} \cdot 100}{56,11 \cdot 3 \cdot 100} \quad (3.1)$$

где 92,06 - молекулярный вес глицерина;

э. ч. - эфирное число жира;

56,11 - молекулярный вес едкого кали.

Йодное число. Общие сведения. Йодное число показывает количество граммов иода, которое присоединяется к 100 г жира. Оно свидетельствует о количественном содержании непредельных кислот в жире, что позволяет судить о его устойчивости к окислению, полимеризации и другим превращениям. Йодное число является показателем, характерным для каждого вида свежего жира.

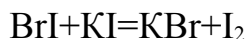
Химизм процесса присоединения галоидов описан выше (см. «Проба на непредельные жирные кислоты»). Следует подчеркнуть, что йод присоединяется главным образом к двойным связям, тогда как более реакционно-способные галоиды - хлор и бром - могут также замещать атомы водорода в углеводородном радикале кислоты.

Наиболее точным является определение йодного числа 1 по Гюблю, однако оно связано с применением весьма ядовитого реактива-сулемы (HC_{12}) и поэтому не может быть рекомендовано для студенческого практикума. Описываем более простой и быстрый метод определения йодного числа, применение которого не связано с использованием сулемы. Метод обладает вполне удовлетворительной точностью.

Определение йодного числа с бромистым йодом (по Ганусу). Бромистый йод образуется при взаимодействии иода с бромом в уксуснокислой среде.

Бромистый йод количественно присоединяется к непредельным жирным кислотам по месту двойных связей.

Избыток бромистого иода, не вошедший в реакцию, реагирует с йодистым калием по уравнению



Выделившийся йод оттитровывают тиосульфатом:



Реактивы:

а) растительное масло;

б) реактив Гануса: 13 г кристаллического йода растворяют в 100 мл ледяной уксусной кислоты (в мерной колбе емкостью 1 л). К раствору добавляют 8,2 г брома и доводят ледяной уксусной кислотой до 1 л. Хранят в

склянке оранжевого стекла с притертой пробкой. Раствор готовится лаборантом (в вытяжном шкафу!);

в) йодистый калий, 20 %-ный раствор. Готовится непосредственно перед определением;

г) тиосульфат натрия (гипосульфит, серноватисто-кислый натрий), 0,1 %-ный раствор;

д) крахмал, 1 %-ный раствор;

е) хлороформ.

В сухую коническую колбу или склянку с притертой пробкой емкостью от 250 до 300 мл отвешивают на аналитических весах от 0,2 до 0,3 г масла и растворяют его в 10 мл хлороформа. В другую такую же колбу или склянку вносят 10 мл хлороформа без масла («слепой опыт»). В обе колбы из бюретки (со стеклянным краном) добавляют по 25 мл реактива Гануса. Сосуды плотно закрывают пробками, смоченными в растворе йодистого калия. Содержимое сосудов осторожно взбалтывают, после чего сосуды ставят в темное место на 1—1,5 ч. По истечении указанного времени в оба сосуда добавляют по 10 мл 20%-ного раствора йодистого калия и 50 мл воды и выделившийся йод оттитровывают 0,1 %-ом раствором тиосульфата натрия до слабо-желтой окраски, потом добавляют 10—12 капель раствора крахмала и продолжают титрование до полного обесцвечивания раствора.

При расчетах принимают во внимание, что 1 мл 0,1 и раствора тиосульфата натрия соответствует 1 мл 0,1 %-ого раствора иода. Йодное число и. ч. вычисляют по формуле

$$и.ч. = \frac{(c - o)k \cdot 0,01269 \cdot 100}{n},$$

(3.2)

где *c* - количество 0,1 %-ого раствора тиосульфата, израсходованное на титрование контрольной пробы («слепой опыт»), мл;

o - количество 0,1 %-ого раствора тиосульфата, израсходованное при титровании опытного образца, мл;

k - поправочный коэффициент к титру приблизительно 0,1 н раствора тиосульфата;

0,01269 —титр раствора тиосульфата по йоду;

n - навеска масла, г.

3.2 Фосфатиды, или фосфолипиды

Общие сведения. Одной из наиболее распространенных групп жироподобных веществ, или липоидов, являются фосфолипиды, или фосфатиды. Различают три группы фосфолипидов:

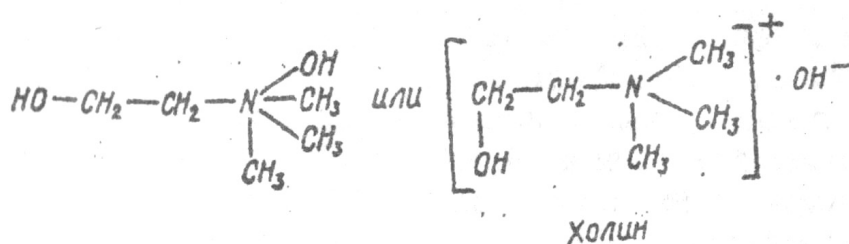
а) фосфоглицериды, в состав которых входят глицерин, жирные кислоты, фосфорная кислота и азотистые основания (холин, коламин, оксиаминокислота серии);

б) инозитфосфатиды (фосфатидинозитиды), содержащие вместо азотистого основания циклический шестиатомный спирт инозит;

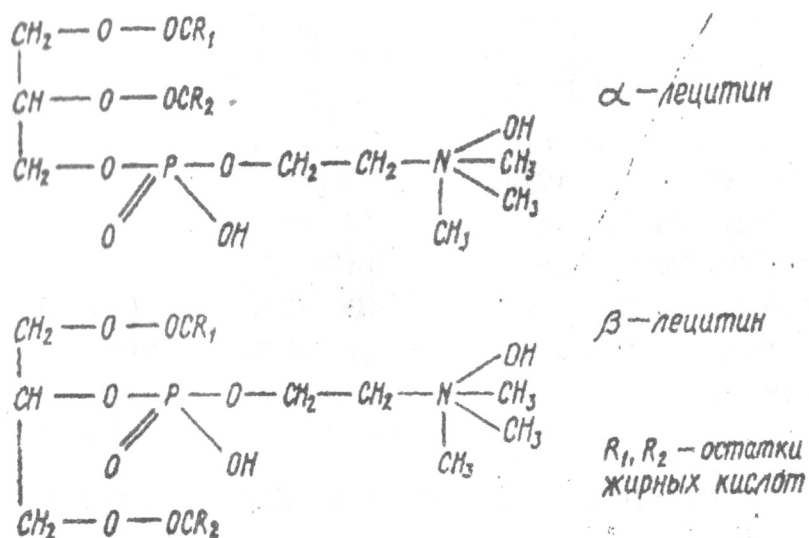
в) сфингомиэлины (сфингофосфолипиды), молекулы, которых состоят из высокомолекулярного двухатомного ненасыщенного аминоспирта сфингозина, остатков жирной и фосфорной кислот и азотистого основания холина. В молекулах сфингомиэлинов жирная кислота соединена пептидной связью с аминогруппой сфингозина.

Выделение лецитинов из желтка куриного яйца. Понятие о лецитинах. Лецитины относятся к фосфоглицеридам (фосфатидилхолинам). При гидролизе лецитинов освобождается молекула глицерина, две молекулы жирных кислот (из которых одна является непредельной), молекулы фосфорной кислоты и азотистого основания холина.

Фосфорная кислота в молекуле лецитина соединена сложноэфирной связью со спиртовой группой холина.



В зависимости от того, к какому углеродному атому глицерина присоединен остаток холинфосфорной кислоты, выделяют α- и β-лецитины. Лецитины различаются также по жирным кислотам, входящим в их состав.



Реактивы:

- а) желток куриного яйца;
- б) этиловый спирт;
- в) ацетон;
- г) хлористый кадмий, насыщенный спиртовой раствор.

В небольшой стаканчик вносят около 1/5-1/6 желтка куриного яйца и, помешивая стеклянной палочкой, добавляют 10 мл горячего спирта. После остывания содержимое стаканчика фильтруют в сухую пробирку. Фильтрат должен быть прозрачным. Если в нем появляется муть, фильтрование

повторяют до получения прозрачного фильтрата. Со спиртовым раствором лецитинов проделывают ряд реакций.

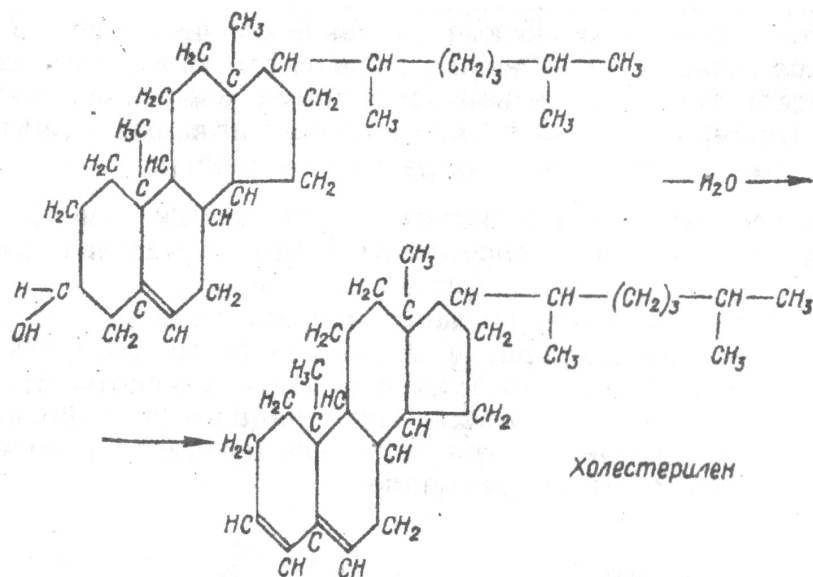
Осаждение ацетоном. В сухую пробирку наливают 2-3 мл ацетона и по каплям прибавляют спиртовой раствор лецитинов. Выпадает осадок, так как лецитины в ацетоне не растворяются.

Получение эмульсии лецитинов. Для получения эмульсии к 2-3 мл спиртового раствора лецитинов добавляют (по каплям) дистиллированную воду. Образуется устойчивая эмульсия лецитинов в воде.

Осаждение хлористым кадмием. В сухой пробирке к 1 мл спиртового раствора лецитинов добавляют по каплям насыщенный раствор хлористого кадмия. Выпадает белый осадок соединения лецитинов с хлористым кадмием.

3.2.1 Реакция Сальковского на холестерин

Под действием концентрированной серной кислоты происходит дегидратация молекулы холестерина с образованием холестерилена — соединения, окрашенного в красный цвет.



Реактивы:

а) холестерин, 1 %-ный хлороформный раствор, или растительное масло, хлороформный раствор;

б) серная кислота, концентрированная ($\rho_{20} = 1,836$).

К 2—3 мл хлороформного раствора холестерина (или растительного масла) в пробирке осторожно, насливая по стенке, добавляют 1-2 мл концентрированной серной кислоты. Пробирку легко встряхивают. Вначале верхний слой, а затем и вся жидкость в пробирке принимает красную, оранжевую или красно - фиолетовую окраску.

4 Выделение белков из тканей и биологических жидкостей

В химический стакан вместимостью 50 мл отмеривают цилиндром 3 мл молока и добавляют 7 мл дистиллированной воды. Смесь перемешивают и добавляют 10-15 капель 1 %-ного раствора соляной кислоты. Кислоту приливают аккуратно, по каплям, так как в избытке кислоты осадок растворяется. Суспензию перемешивают, через 3-5 минут образуется рыхлый осадок.

Для удаления соляной кислоты в стакан добавляют 10 мл дистиллированной воды, перемешивают и оставляют ещё на 5 минут. Жидкость осторожно сливают с осадка. К осадку ещё раз добавляют 10 мл дистиллированной воды, осторожно перемешивают содержимое стакана и через 5 минут фильтруют смесь через бумажный фильтр.

Доказательством того, что в состав казеина входит фосфор: осадок с фильтром переносят в широкую пробирку с обратным холодильником и добавляют 6 мл 10 %-ного раствора гидроксида натрия. Пробирку нагревают на песчаной бане в течение 1 часа. Жидкости дают остыть и нейтрализуют её концентрированной азотной кислотой до слабокислой реакции на лакмус. При нейтрализации выпадает осадок высокомолекулярных продуктов неполного гидролиза белка.

После отстаивания жидкость фильтруют и с фильтратом проделывают биуретовую реакцию и молибденовую пробу на фосфорную кислоту. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 %-ый раствор NaOH и 2 капли 1 %-ого раствора Cu_8O_4 . Наблюдается фиолетовое окрашивание. К 10 каплям молибденового реактива добавляют 5 капель гидролизата и кипятят несколько минут. В присутствии H_3PO_4 жидкость окрашивается в лимонно-жёлтый цвет. При охлаждении выпадает жёлтый кристаллический осадок комплексного соединения.

4.1 Ферментативный гидролиз белка

Цель: определить факторы, вызывающие денатурацию белка.

В три пробирки наливают по 2 мл раствора белка куриного яйца, предварительно разведённого 1:20 и профильтрованного через двойной слой марли.

В первую пробирку наливают насыщенный раствор сульфата аммония; во вторую - концентрированную HNO_3 ; в третью - этиловый спирт. Белок свёртывается во всех пробирках.

В три пробирки добавляют по 2 мл раствора белка. Во вторую добавляют одну каплю 1 %-го раствора уксусной кислоты; в третью - одну каплю 10 %-го раствора NaOH. Все три пробирки нагревают над пламенем спиртовки.

В первой пробирке ($pH=7$) образуется осадок белка, вследствие его денатурации при нагревании, во второй пробирке осадок образуется быстрее и полнее вследствие нейтрализации белка в слабокислой среде; в третьей пробирке ($pH>7$) осадка не образуется даже при кипячении.

Качественные реакции на белки

(Цветные реакции на белки; определение аминокислотного состава белков)

Цель: Путем качественных реакций определить наличие пептидных связей и NH_2 - групп в молекулах белков; выявить аминокислотный состав белков.

4.2 Обнаружение в молекулах белков пептидных связей

4.2.1 Биуретовая реакция

К 1-2 мл разбавленного белка добавляют двойной объем 30 %-ного раствора NaOH хорошо перемешивают и приливают 2-3 капли 1 %-ного раствора CuSO_4 . Снова тщательно перемешивают. Развивается красно-фиолетовое окрашивание.

4.2.2 Нингидриновая реакция

К 2-3 мл разбавленного раствора белка приливают 3-4 капли 1 %-ного раствора нингидрина в 95 %-ном растворе ацетона. Раствор перемешивают и ставят в водяную баню при $t = 70^\circ\text{C}$ на несколько минут. Развивается сине-фиолетовое или розово-фиолетовое окрашивание.

Нингидриновая реакция доказывает наличие NH_2 - групп в белках

4.2.3 Ксантопротеиновая реакция

Ксантопротеиновая реакция (реакция на ароматические аминокислоты: фенилаланин, тирозин, триптофан)

В одну пробирку добавляют 5 капель раствора яичного белка, во вторую раствора желатина, в третью - раствора миозина. Во все пробирки приливают по 3-5 капель концентрированной HNO_3 и нагревают. В первой и третьей пробирках образовался белый осадок, который при нагревании окрашивается в желтый цвет и постепенно растворяется в (происходит гидролиз белка), сообщая желтую окраску раствору. Желатина, не содержащая ароматических аминокислот, не дает ксантопротеиновой пробы. Образование желтых пятен на коже при попадании концентрированной HNO_3 обусловлено этой реакцией.

Список использованных источников

- 1 **Волков, В.А.** Биоминерализация в организме человека и животных / В.А.Волков, Б.В. Бакиров.– Томск: Тандем – АРТ, 2004.-500 с.
- 2 **Башкин, В.Н.** Биогеохимия: учебное пособие./ В.Н. Башкин. – М: Научный мир,2004.-584с.
- 3 Биоэлементы: материалы III международной научно- практической конференции. – Оренбург: ОГУ, 2006.- 358с.
- 4 **Комов, В.П.** Биохимия: учебник для вузов./ В.П. Комов, В.Н. Шведова. – М.: Дрофа, 2004 - 638с.
- 5 **Галактионов В.Г.** Иммунология: учебник/ В. Г. Галактионов.– М.: Академия, 2004 – 528с.

