

Міністерство освіти і науки України
Національний університет водного господарства та
природокористування
Кафедра агрохімії, ґрунтознавства та землеробства

05-01-251М

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до лабораторних занять
із навчальної дисципліни

«Біохімія рослин»

для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня
за освітньо-професійною програмою «Агрономія»
спеціальності 201 «Агрономія»
денної та заочної форм навчання

Частина 2

Рекомендовано науково-
методичною радою
з якості ННІАЗ
Протокол № 7 від 07.02.2023 р.

Рівне – 2023

Методичні вказівки до лабораторних занять із навчальної дисципліни «Біохімія рослин» для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня за освітньо-професійною програмою «Агрономія» спеціальності 201 «Агрономія» денної та заочної форм навчання. Частина 2 [Електронне видання] / Володимирець В. О. – Рівне : НУВГП, 2022. – 74 с.

Укладач: Володимирець В. О., к.біол.н., доцент кафедри агрохімії, ґрунтознавства та землеробства.

Відповідальний за випуск: Колесник Т. М., к.с.-г.н., доцент, завідувач кафедри агрохімії, ґрунтознавства та землеробства.

Керівник групи забезпечення
кандидат сільськогосподарських наук,
доцент

Колесник Т. М.

© В. О. Володимирець, 2023
© НУВГП, 2023

З М І С Т

Лабораторне заняття № 12. Визначення констант жиру	4
Лабораторне заняття № 13. Отримання та вивчення властивостей гетероциклічних сполук на прикладі кофеїну та нікотину	10
Лабораторне заняття № 14. Якісні реакції на амінокислоти	15
Лабораторне заняття № 15. Розподіл амінокислот методом хроматографії на папері. Якісні реакції на білки	24
Лабораторне заняття № 16-17. Вивчення властивостей ферментів. Визначення активності ферментів	33
Лабораторне заняття № 18. Виділення та встановлення складу нуклеопротеїнів	47
Лабораторне заняття № 19-20. Вивчення властивостей пігментів фотосинтетичної системи рослин	55
Лабораторне заняття № 21-22. Якісні реакції на вітаміни. Визначення вмісту різних вітамінів у рослинному матеріалі	64
Загальний список літературних джерел	74

Лабораторне заняття № 12

Тема: Визначення констант жиру.

Мета заняття: Засвоїти методику визначення окремих констант жиру на прикладі олії.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Нейтральні жири або триацилгліцерини є однією з найбільш поширених груп ліпідів і представляють собою складні ефіри триатомного спирту гліцеролу та вищих жирних кислот. У молекулі гліцеролу можуть бути етерифіковані одна, дві або всі три групи -ОН. Триацилгліцерини (етерифіковані всі три групи ОН) є найбільш поширеною формою нейтральних жирів. Якщо залишки жирних кислото, які входять до складу жирів однакові, то такі жири називаються простими, а якщо різні, – то складними.

У складі нейтральних жирів представлені різні насичені та ненасичені жирні кислоти. В незначній кількості ці кислоти можуть бути представлені у вільному стані. Нині виділено понад 200 різних жирних кислот, які відрізняються числом атомів вуглецю, ступенем насичення зв'язків, розміщенням подвійних і потрійних зв'язків, наявністю гідроксо- або кетогруп. Найбільш поширеними в складі жирів і ліпідів у цілому є ациклічні жирні кислоти з нерозгалуженим вуглецевим скелетом, іноді зустрічаються циклічні та гідроксикислоти. Більшість жирних кислот мають парне число атомів вуглецю. Ненасичені жирні кислоти містять подвійні та потрійні зв'язки, яких може бути 1-3.

Із насичених вищих жирних кислот у складі нейтральних жирів найчастіше зустрічаються: міристинова, пальмітинова стеаринова, арахінова, бегенова кислоти. З ненасичених вищих жирних кислот у складі нейтральних жирів найчастіше зустрічаються: олеїнова, лінолева, ліноленова, ерукова кислоти.

Властивості нейтральних жирів можна характеризувати так званими константами або жировими числами: кислотним, числом омилення, ефірним, йодним, перекисним та ін.

Кислотністю жиру або кислотним числом жиру називають число міліграмів їдкою калію, що необхідне для нейтралізації вільних жирних кислот, які містяться в 1 г жиру. Числом омилення називають число міліграмів їдкою калію, що необхідне для нейтралізації всіх, як вільних, так і тих, які входять до складу триацилгліцеринів, жирних кислот, що містяться в 1 г жиру. Ефірним числом жиру називають число міліграмів їдкою калію, що необхідне для нейтралізації всіх вільних жирних кислот, які утворюються в результаті омилення ацилгліцеринів, що містяться в 1 г жиру. Це число визначається як різниця між числом омилення жиру та його кислотним числом. Йодним числом жиру називають число грамів йоду, що прореагувало з 100 г жиру. Це число вказує на вміст у жирі ненасичених жирних кислот. Перекисним числом жиру називають число мілілітрів розчину натрій тіосульфату ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), що необхідне для титрування вільного йоду, який виділився в результаті окислення йодиду калію перекисним угрупованням 1 г жиру.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Визначення числа омилення жиру.

Принцип методу. Число омилення визначають шляхом реакції взаємодії олії з калій гідроксидом і подальшим відтитруванням залишку калій гідроксиду, що не прореагував, розчином хлоридної кислоти з використанням як індикатора фенолфталеїну.

Обладнання та реактиви. Ваги технохімічні, колби на 50 мл, піпетки градуйовані, бюретка, крапельниця, зворотній холодильник (використати невеликі лійки), водяна баня, годинник, соняшникова олія, 0,1%-ий розчин фенолфталеїну, 0,5 моль/л розчин хлоридної кислоти, 0,5 моль/л спиртовий розчин калій гідроксиду, дистильована вода.

Хід роботи. В одну колбу (досліджувана проба) внести 0,5 г олії, в іншу (контрольна проба) – 0,5 мл води. В обидві колби долити по 15 мл спиртового розчину калій гідроксиду й кип'ятити зі зворотнім холодильником (у колби вставити

лійки) на водяній бані впродовж 50 хвилин до повного омилення гліцеринів і нейтралізації вільних жирних кислот. Потім в обидві колби долити по 10 крапель розчину фенолфталеїну та відтитрувати в теплому стані розчином хлоридної кислоти до зникнення рожевого забарвлення (до нейтральної реакції).

Число мг КОН або число омилення (N_e), що витратилось на нейтралізацію жирних кислот у 1 г жиру, розрахувати за формулою

$$N_e = \frac{(V_k - V_d) \cdot E \cdot f}{m},$$

де $(V_k - V_d)$ – різниця результатів титрування відповідно контрольної та дослідної проб 0,5 моль/л розчином HCl, мл; E – маса КОН (28,05 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,5 моль/л розчину КОН; f – поправочний коефіцієнт на титр 0,5 моль/л розчину HCl; m – наважка жиру, г.

2. Визначення кислотного числа жиру.

Принцип методу. Кислотне число жиру визначають шляхом відтитрування вільних жирних кислот у складі олії розчином калій гідроксиду з використанням як індикатора фенолфталеїну.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, колби на 50 мл, піпетки градуйовані, крапельниця, бюретка, етиловий спирт, який нейтралізований за фенолфталеїном, 0,1 моль/л розчин калій гідроксиду, 0,1%-ий розчин фенолфталеїну, соняшникова олія.

Хід роботи. В колбу з 1 г олії додати 5 мл спирту, нейтралізованого за фенолфталеїном, 2-3 краплі фенолфталеїну та вміст ретельно перемішати для максимального розчинення вільних жирних кислот і відтитрувати розчином калій гідроксиду до появи незникаючого після збовтування рожевого забарвлення

(забарвлення не повинне зникати впродовж 0,5-1 хвилини).

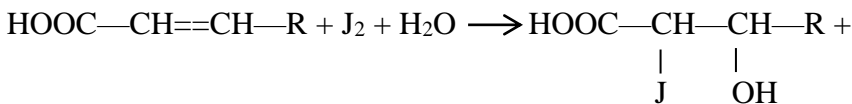
Число мг КОН або кислотне число (N_a), що витратилось на титрування вільних жирних кислот в 1 г олії, буде дорівнювати

$$N_a = \frac{V \cdot E \cdot f}{m},$$

де V – об'єм 0,1 моль/л розчину калій гідроксиду, витраченого на титрування досліджуваної проби, мл; E – маса КОН (5,61 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,1 моль/л розчину калій гідроксиду; f – поправочний коефіцієнт на титр 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію; m – наважка жиру, г.

3. Визначення йодного числа жиру.

Принцип методу. Визначення йодного числа ґрунтується на реакції приєднання йоду за місцем подвійного зв'язку, що протікає за рівнянням



+ HJ.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, конічні колби на 50 мл, піпетки градуйовані, бюретка, годинник, соняшникова олія, 0,1 моль/л спиртовий розчин йоду, 1%-ий розчин крохмалю, 0,05 моль/л розчин натрій тіосульфату ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), дистильована вода.

Хід роботи. В першу колбу помістити наважку олії масою 0,1-0,2 г (досліджувана проба), в другу – 0,1-0,2 мл води (контрольна проба), додати в них по 10 мл спиртового розчину йоду та перемішати. Через 15 хвилин вміст колб відтитрувати розчином натрій тіосульфату спочатку до появи слабо-жовтого забарвлення, а потім, додавши 1 мл розчину крохмалю, титрувати до зникнення синього забарвлення.

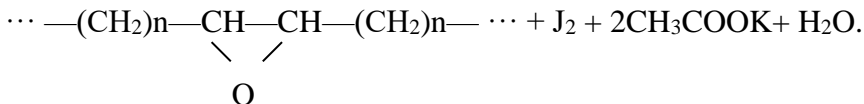
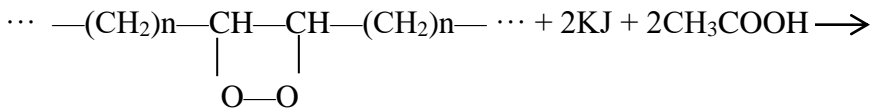
Йодне число (N_j) розрахувати за формулою

$$(N_j) = \frac{(V_k - V_d) \cdot E \cdot f \cdot 100}{(m \cdot 1000)},$$

де $(V_k - V_d)$ – різниця результатів титрування відповідно контрольної та дослідної проб 0,05 моль/л розчином натрій тіосульфату, мл; E – маса J_2 (12,69 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину $Na_2S_2O_3$; f – поправочний коефіцієнт на титр 0,05 моль/л розчину $Na_2S_2O_3$; m – наважка жиру, г.

4. Визначення перекисного числа в прогіркліму жирі.

Принцип методу. Метод визначення перекисного числа ґрунтується на здатності пероксидних угруповань жиру реагувати з йодидом калію в кислому середовищі



Оскільки можливе утворення йоду в процесі окиснення йодиду калію киснем повітря, необхідно паралельно проводити контрольні проби.

Обладнання та реактиви: Ваги технохімічні, конічні колби на 50 мл, піпетки градуйовані, бюретка, крапельниця, годинник, соняшникова олія, насичений розчин калій йодиду, хлороформ, 0,005 моль/л розчин натрій тіосульфату, 1%-ий розчин крохмалю, льодяна оцтова кислота, дистильована вода.

Хід роботи. В першу колбу помістити наважку олії масою 1 г (досліджувана проба), в другу – 1 мл води (контрольна проба). Потім в обидві колби додати по 5 мл льодяної оцтової кислоти, 6 мл хлороформу та 1 мл свіжоприготовленого насиченого розчину калій йодиду. Після

цього вміст колб струшувати впродовж 5 хвилин, додати 10 крапель розчину крохмалю як індикатора й відтитрувати розчином натрій тіосульфату до зникнення синього забарвлення.

Перекисне число (N_p) розрахувати за формулою

$$N_p = (V_d - V_k) \cdot f,$$

де $(V_d - V_k)$ різниця результатів титрування відповідно дослідної та контрольної проб 0,005 моль/л розчином $Na_2S_2O_3$, мл; f – поправочний коефіцієнт на титр 0,005 моль/л розчину $Na_2S_2O_3$.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Будова та властивості нейтральних жирів.
2. Основні константи або жирові числа, їхній зміст.
3. Лабораторні методи визначення жирових чисел і їхній принцип.
4. Використання значень жирових чисел для оцінки якості жирів.

Інформаційні ресурси:

Біохімія рослин / М. М. Сирий, М. М. Кулешов, Н. М. Гаджиева. Харків : Харківський нац. аграр. ун.-т. ім. В. В. Докучаєва, 2006.

Биохимия / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Биохимия. Практикум / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Боечко Ф. Ф. Біологічна хімія. Київ : Вища школа, 1995.

Кобилецька М. С., Терек О. І. Біохімія рослин. Львів : Вид.-во Львівського нац. ун-ту, 2017.

Красільнікова Л. О., Авксентьева О. О., Жмурко В. В. Біохімія рослин. Харків : Вид. група «Основа», 2007.

Холодова Ю. Д., Шатурський Я. П. Біоорганічна хімія. Київ : Альфа-Принт, 2000.

Черних В. П., Зіменковський Б. С., Гриценко І. С. Органічна хімія. Харків : Вид.-во НФаУ, 2008.

Будова та класифікація ліпідів. URL:
https://learn.ztu.edu.ua/pluginfile.php/206181/mod_resource/content/1/%D0%9B%D1%96%D0%BF%D1%96%D0%B4%D0%B8%201.pdf.

Показники якості олії. URL:
<https://buklib.net/books/25054/>.

Визначення кислотного числа. URL:
https://spo.stu.cn.ua/Oksana/harch_himia_lab_prakt/210.html.

Лабораторне заняття № 13

Тема: Отримання та вивчення властивостей гетероциклічних сполук на прикладі кофеїну та нікотину.

Мета заняття: Засвоїти методику отримання окремих представників гетероциклічних сполук; дослідити властивості гетероциклічних сполук на прикладі кофеїну та нікотину.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

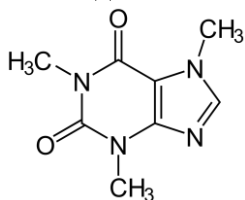
Гетероциклічними є сполуки, що містять цикли, до складу яких, крім атомів вуглецю (Карбону), входять один або декілька атомів інших елементів (гетероатомів). Гетероциклічні сполуки класифікують залежно від розміру циклу (три-, чотири-, п'яти-, шести- та семичленні гетероцикли), природи та числа гетероатомів (кисне-, азото-, сірковмісні), також ступеня насиченості циклу (насичені, ненасичені та ароматичні).

За хімічними властивостями три- та чотиричленні гетероциклічні сполуки є реакційноздатними сполуками (внаслідок впливу кутового й торсійного напруження циклів, наявність полярних зв'язків). Під час дії електрофільних і нуклеофільних реагентів відбувається розрив гетероатом-вуглецевого зв'язку та приєднання молекули реагента за місцем розриву циклу. Для азотовмісних три- та чотиричленних гетеросполук характерні властивості

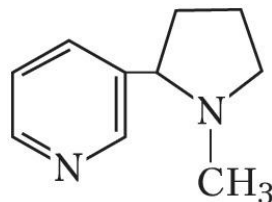
вторинних амінів. Реакційна здатність п'ятичленних гетеросполук із одним гетероатомом визначається наявністю в їхній структурі циклу з π -електроннадлишковою ароматичною системою. Вони вступають у характерні для ароматичних сполук реакції електрофільного заміщення (нітрування, сульфування, ацилювання, галогенування). Електронна густина п'ятичленних гетеросполук із двома гетероатомами розподілена нерівномірно, що визначає напрямок дії електрофільних та нуклеофільних реагентів. Шестичленні гетеросполуки з одним гетероатомом є π -дефіцитними ароматичними системами. За участю гетероатома вони утворюють солі та донорно-акцепторні комплекси. Реакції електрофільного заміщення відбуваються за жорстких умов. З нуклеофільними реагентами вони легко утворюють продукти заміщення (аміно- та гідроксипохідні). Для шестичленних гетосполук із двома гетероатомами реакції електрофільного заміщення можливі за наявності електрондонорного замісника, реакції нуклеофільного заміщення відбуваються легко.

Гетероциклічні сполуки, молекули яких складаються з одного гетероциклічного та одного або декількох бензольних чи також гетероциклічних ядер, відносяться до конденсованих гетероциклічних систем.

Представниками гетероциклічних сполук, наприклад, є кофеїн і алкалоїд нікотин:



кофеїн



нікотин

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Отримання кофеїну.

Принцип методу. Отримання кофеїну ґрунтується на

його здатності переганятися без розкладання за температури до 180°C . Як сировину для отримання кофеїну використовують рослинний матеріал із його помітним вмістом, зокрема листки чаю або зерна кави.

Обладнання та реактиви. Технохімічні ваги, годинник лабораторний, фарфорова чашка з товкачиком, лійка, фільтрувальний папір, водяна баня, вставка для фарфорових чашок, подрібнені листки чаю.

Хід роботи: На технохімічних вагах відважити 1 г листків чаю та перенести їх у фарфорову чашку. За допомогою товкачика листки добре подрібнити та розтерти. Розтерту масу рівномірно розподілити на дні фарфорової чашки, зверху її накрити продірявленим фільтрувальним папером та лійкою, перенести на водяну баню та обережно нагрівати упродовж 15 хвилин. Після цього чашку відставити та охолодити за кімнатної температури. У процесі охолодження на дні чашки з'являться кристалики кофеїну, які використати в наступних дослідах. Зробити відповідні висновки.

2. Якісні реакції на кофеїн.

Принцип методу. Кофеїн, виявляючи властивості алкалоїдів, зокрема виявляючи властивості основ, здатний утворювати навіть у розведених розчинах прості або комплексні солі з кислотами, солями важких металів. Внаслідок взаємодії утворюються осаді різного кольору. Такі реакції використовуються для якісного та кількісного визначення алкалоїдів.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками, лопатка для реактивів, пробірки градуйовані, крапельниця, колбочка на 50 мл, розчин йоду в калій йодиді (1 г кристалічного йоду розчинити в розчині з 2 г калій йодиду в 50 мл води), реактив Зонненштейна (1%-ий розчин фосфорно-молібденової кислоти: до розчину натрій фосфату, підкисленого нітратною кислотою, долити підкислений нітратною кислотою розчин амоній молібдату до тих пір, поки не припиниться виділення осаду, осад промити водою та розчинити в невеликій кількості натрій карбонату; отриманий розчин випарити насухо та

прожарити до видалення амонійних солей, залишок розчинити в десятикратній кількості води й додати нітратну кислоту до розчинення утворюваного під час реакції осаду), 5%-ий розчин таніну (концентрований водний настій чорного чаю розвести відповідною кількістю води), дистильована вода.

Хід роботи: Отримані кристалики кофеїну лопаткою перенести у колбочку на 50 мл, прилити сюди 10 мл води та збовтати. В три пробірки внести по 1 мл розчину кофеїну. В першу пробірку додати 2-3 краплі розчину йоду в калій йодиді. В результаті реакції з'являється осад бурого кольору. В другу пробірку додати 2-3 краплі розчину фосфорно-молібденової кислоти. В результаті реакції з'являється осад жовтого кольору, що згодом переходить в осад синього або зеленого кольору. В третю пробірку додати 2-3 краплі розчину таніну. В результаті реакції з'являється осад жовтого кольору. Зробити відповідні висновки.

3. Отримання нікотину.

Принцип методу. Отримання нікотину ґрунтується на його здатності переганятися з водяною парою за високої температури. Як сировину для отримання нікотину використовують подрібнені листки тютюну. Тут нікотин знаходиться у вигляді солі з лимонною кислотою, яку можна зв'язати шляхом додавання гашеного вапна.

Обладнання та реактиви. Технохімічні ваги, фарфорова чашка з товчачиком, лопатка для відбору реактивів, пробірка градуйована, мірний циліндр на 50 мл, хімічні стакани на 25 мл, колба В'юрца, зворотній холодильник, спиртівка, гашене вапно ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), подрібнені листки тютюну (тютюнова начинка з сигарет), дистильована вода.

Хід роботи: На технохімічних вагах відважити 5 г листків тютюну та 1 г порошку гашеного вапна й перенести їх у фарфорову чашку. В чашку прилити 2 мл води. За допомогою товчачика суміш перетерти. Отриману масу перенести в колбу В'юрца, додати сюди 35-40 води та провести перегонку з використанням зворотнього холодильника. Відгонкою отримати 15-20 мл рідини.

Перевірити отриману рідину на наявність характерного запаху нікотину. Зробити відповідні висновки. Отриману рідину використати в наступному досліді.

4. Вивчення властивостей нікотину.

Принцип методу. Нікотин, відносячись до алкалоїдів, виявляє властивості основ і у водному розчині дає лужну реакцію, тому змінює колір індикатора – фенолфталеїну. Також взаємодіючи з різними речовинами, дає специфічні якісні реакції. Ці реакції використовуються для якісного та кількісного визначення нікотину та інших алкалоїдів.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, крапельниці, 1%-ий спиртовий розчин фенолфталеїну, розчин йоду в калій йодиді (1 г кристалічного йоду розчинити в розчині з 2 г калій йодиду в 50 мл води), концентрована сульфатна кислота, 1%-ий розчин ваніліну в сульфатній кислоті, дистильована вода.

Хід роботи. В пробірку внести 2-3 краплі отриманого в попередньому досліді розчину нікотину. Сюди додати 1-2 краплі спиртового розчину фенолфталеїну. В цьому випадку спостерігається зміна кольору індикатора. В пробірку внести 1 мл розчину нікотину. Сюди додати додати 2-3 краплі розчину йоду в йодиді калію. В результаті реакції з'являється осад бурого кольору. В пробірку внести 1 мл нікотину. Сюди додати 1 мл концентрованої сульфатної кислоти та 1 мл розчину ваніліну в сульфатній кислоті. Після обережного перемішування сюди долити 1 мл води. В результаті реакції з'являється малиново-червоне забарвлення.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Поняття про гетероциклічні сполуки, їхня класифікація.
2. Найважливіші представники гетероциклічних сполук.
3. Загальні хімічні властивості гетероциклічних сполук.
4. Рослинні глікозиди та алкалоїди, їхня біологічна роль.

Інформаційні ресурси:

Біохімія рослин / М. М. Сирий, М. М. Кулешов, Н. М. Гаджисєва. Харків : Харківський нац. аграр. ун.-т. ім. В.В. Докучаєва, 2006.

Биохимия / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Биохимия. Практикум / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Боечко Ф. Ф. Біологічна хімія. Київ : Вища школа, 1995.

Кобилецька М. С., Терек О. І. Біохімія рослин. Львів : Вид.-во Львівського нац. ун-ту, 2017.

Красільнікова Л. О., Авксентьєва О. О., Жмурко В. В. Біохімія рослин. Харків : Вид. група «Основа», 2007.

Холодова Ю. Д., Шатурський Я. П. Біоорганічна хімія. Київ : Альфа-Принт, 2000.

Черних В. П., Зіменковський Б. С., Гриценко І. С. Органічна хімія. Харків : Вид-во НФаУ, 2008.

Гетероциклічні сполуки. URL: https://kc.pnu.edu.ua/wp-content/uploads/sites/11/2021/02/Lecture_3_BOCh.pdf.

Гетероциклічні сполуки. URL: <https://lifelib.info/biochemistry/textbook/13.html>.

Гетероциклічні сполуки. URL: https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php/661967/mod_resource/content/1/%D0%9E%D1%80%D0%B3%D0%B0%D0%BD%D1%96%D1%87%D0%BD%D0%B0%20%D1%85%D1%96%D0%BC%D1%96%D1%8F%2C%20%D1%82%D0%BE%D0%BC%20%20-%20%D0%A7%D0%B5%D1%80%D0%BD%D0%B8%D1%85%20%D0%92.pdf.

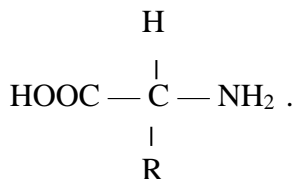
Лабораторне заняття № 14

Тема: Якісні реакції на амінокислоти.

Мета заняття: Засвоїти методику якісного визначення окремих груп амінокислот.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Амінокислоти можна розглядати як похідні карбонових кислот, у яких один із атомів водню вуглецевого ланцюга заміщений на групу NH_2 . В більшості природних амінокислот аміногрупа знаходиться в α -положенні відносно карбоксильної групи



Значно рідше в рослинних організмах зустрічаються амінокислоти з β - або γ -положенням аміногрупи (наприклад, β -амінопропіонова, γ -аміномасляна).

Залежно від природи бічних ланцюгів (R-радикалу) амінокислоти можна розділити на ациклічні або аліфатичні та циклічні (гомо- та гетероциклічні).

За числом амінних і карбоксильних груп у молекулі амінокислоти поділяють на: 1) моноаміномонокарбонові (наприклад, гліцин, аланін, серин, тирозин); 2) діаміномонокарбонові (наприклад, лізин, цитрулін); 3) моноамінодикарбонові (наприклад, аспарагінова та глутамінова кислоти); 4) діамінодикарбонові (наприклад, цистин).

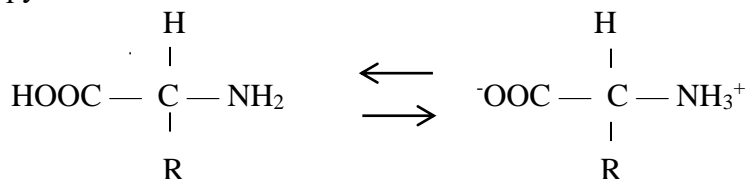
За характером зарядів бічних радикалів і їхньою полярністю виділяють групи амінокислот: 1) неполярні гідрофобні (наприклад, гліцин, пролін, фенілаланін); 2) полярні, але незаряджені (наприклад, серин, треонін, глутамін); 3) полярні з від'ємним зарядом (наприклад, аспарагінова кислота, тирозин); 4) полярні з додатнім зарядом (наприклад, лізин, гістидин).

Усі амінокислоти, за винятком гліцину, оптично активні та можуть існувати у вигляді пари енантіомерів – D- і L-форм, оскільки вуглецевий атом, у якого водень заміщений на аміногрупу, є хіральним. У живих організмах найчастіше

зустрічаються L-форми амінокислот, зокрема, вони входять до складу білків. D-форми зустрічаються зрідка в складі клітинної стінки мікроорганізмів, дуже рідко виявляються в рослинах.

За деяким винятком, амінокислоти добре розчинні у воді. Зі збільшенням вуглеводневого бічного ланцюга їхня розчинність у воді зменшується, а в спирті зростає.

Усі α -амінокислоти існують у водних розчинах переважно у вигляді біполярних іонів або цвіттеріонів із дисоційованою карбоксильною групою та протонованою аміногрупою



Біполярність молекул амінокислот обумовлює цілий ряд їхніх властивостей, зокрема, добру розчинність більшості амінокислот у воді та порівняно погану в органічних розчинниках, великі дипольні моменти їхніх молекул, високі значення діелектричної сталості та температури плавлення. Залежно від значення рН середовища амінокислоти можуть бути в формі аніонів, катіонів, електронейтральних біполярних іонів або у вигляді суміші цих форм із домінуванням однієї з них. У сильноокислих розчинах амінокислоти представлені позитивними іонами, а в лужних – негативними іонами, тобто амінокислоти представляють собою амфотерні електроліти. Значення рН, за якого сумарний заряд амінокислоти дорівнює нулю, тобто молекула є електронейтральною, називається ізоелектричною точкою.

У відповідності зі своєю амфотерною природою амінокислоти залежно від складу розчину можуть утворювати різні солі, реагуючи як із кислотами, так із основами.

Для амінокислот характерні як загальні, що обумовлені наявністю аміногрупи та карбоксильної групи, так і

специфічні, що обумовлені бічними ланцюгами, хімічні властивості. Однією з характерних реакцій α -амінокислот є їх взаємодія з нінгідрином, яка супроводжується виділенням вуглекислого газу. Амінокислоти реагують також із азотистою кислотою та формальдегідом. Радикали бічного ланцюга амінокислот виключно різноманітні, що дає можливість для виявлення більшості амінокислот використовувати кольорові реакції. Окремі з них досить чутливі та специфічні, що дозволяє визначати мізерний вміст тієї або іншої індивідуальної амінокислоти в складі складних сумішей і в біологічних рідинах. Деякі кольорові реакції знаходять застосування для кількісного визначення амінокислот і білків.

У складі рослинних організмів виявлено майже 250 різних амінокислот, які можна розділити на дві групи: 1) білокутворюючі або протеїногенні, що входять до складу білків (сюди належить 20 основних амінокислот і їхніх форм); 2) амінокислоти, що зустрічаються у вільному стані (сюди належить понад 200 амінокислот, що представляє собою унікальну особливість амінокислотного обміну в рослинах). Із вільних амінокислот часто зустрічаються такі, як β -аланін, орнітин, цитрулін, γ -аміномасляна кислота та інші.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Нінгідрінова реакція.

Принцип методу. В результаті взаємодії α -амінокислоти з нінгідрином (трикетогідриндегідратом) у процесі нагрівання утворюється забарвлена комплексна сполука. За температури 70°C α -амінокислоти окиснюються нінгідрином і піддаються окиснювальному дезамінуванню з утворенням аміаку та декарбоксілюванню з утворенням альдегіду й вуглекислого газу, а нінгідрин у результаті реакції відновлюється. Відновлений нінгідрин, конденсуючись із аміаком і окисненим нінгідрином, утворює сполуку, яка енолізується та переходить у забарвлену форму, що має синьо-фіолетовий колір.

За присутності органічних розчинників, на основі яких приготують розчин нінгідрину (ацетон, етанол), можливе

протікання побічних реакцій із утворенням сполуки, що містить у своєму складі радикал (R) амінокислоти. Наявність радикалу амінокислоти в складі цієї сполуки обумовлює різне забарвлення (червоне, жовте, синє) сполук, які виникають під час реакції амінокислот із нінгідрином.

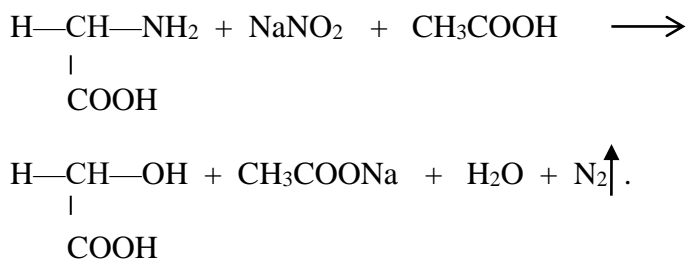
Реакція з нінгідрином є специфічною для амінокислот, які містять α -аміногрупу, та характерна як для ациклічних карбонових, так і для циклічних амінокислот. У реакції гліцину з нінгідрином утворюється комплексна сполука, що має синьо-фіолетове забарвлення.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, скляна паличка, крапельниця, водяна баня, термометр лабораторний, годинник, 1%-ий водний розчин гліцину, 0,1%-ий розчин нінгідрину в 95 %-му розчині ацетону.

Хід роботи. В пробірку внести 5 крапель розчину гліцину та дві краплі розчину нінгідрину. Пробірку поставити на водяну баню й, добре перемішуючи, нагрівати на водяній бані за температури 70°C упродовж 5 хвилин. Внаслідок цього вміст пробірки забарвлюється в синьо-фіолетовий колір.

2. Реакція з нітритною кислотою.

Принцип методу. В результаті взаємодії α -амінокислот із нітритною кислотою, що утворюється в реакції натрій нітриту з оцтовою кислотою, відбувається виділення газоподібного азоту. Для гліцину рівняння реакції має вигляд



Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, крапельниця, скляна паличка, 1%-ий водний розчин гліцину, 5%-ий розчин натрій нітриту, концентрована оцтова кислота.

Хід роботи. В пробірку внести 5 крапель розчину гліцину, 5 крапель розчину натрій нітриту, 2 краплі концентрованої оцтової кислоти та обережно перемішати суміш. У результаті реакції спостерігається виділення газу.

3. Утворення комплексної солі міді.

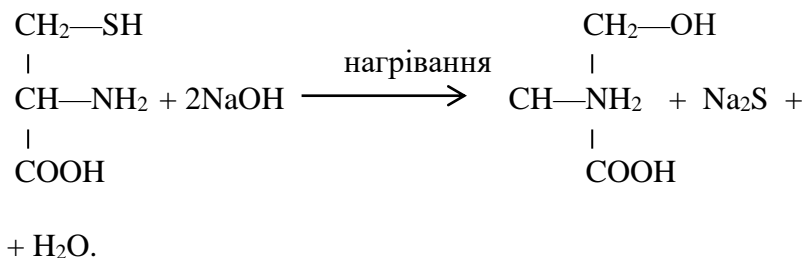
Принцип методу. Під час нагрівання амінокислот із мідь(II) карбонатом утворюється сполука міді, що має синій колір.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками, пробірки градузовані, шпатель, пробіркотримач, спиртівка, 1%-ий водний розчин гліцину, сухий мідь(II) карбонат.

Хід роботи. В пробірку внести 1 мл розчину гліцину, а на кінчику шпателя – сухий мідь(II) карбонат. Суміш нагріти в полум'ї спиртівки до кипіння. В цьому випадку розчин забарвлюється в синій колір.

4. Реакція Фоля на “слабкозв’язану” сірку цистеїну та цистину.

Принцип методу. В процесі кипіння цистеїну та цистину в лужному середовищі від них легко відщеплюється сірка у вигляді сірководню, котрий у лужному середовищі утворює натрію сульфід. Для цистеїну рівняння реакції має вигляд



Утворений натрій сульфід можна виявити за допомогою іонів важких металів, наприклад, іонів свинцю, що утворюють із іонами сірки нерозчинний свинець сульфід чорного кольору. Для виявлення сульфїду сірки можна використати свинець ацетат, котрий під час взаємодії з натрій гідроксидом утворює

натрій плюмбіт. У свою чергу натрій плюмбіт, реагуючи з натрій сульфідом, зумовлює утворення свинець сульфід.

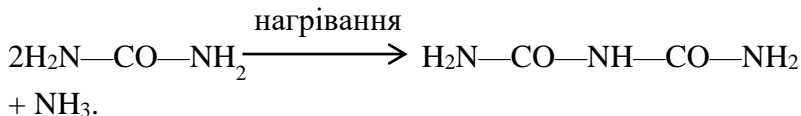
Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, скляна паличка, водяна баня, годинник, 1%-ий водний розчин цистеїну, реактив Фоля (до 10%-го розчину свинець ацетату додати 10%-ий розчин натрій гідроксиду до розчинення осаду, що утворився), 30%-ий розчин натрій гідроксиду.

Хід роботи. В пробірку додати 1 мл розчину цистеїну, 2 мл концентрованого розчину натрій гідроксиду та 1 мл реактиву Фоля. Суміш добре перемішати та кип'ятити на водяній бані впродовж 2 хвилин. Через 3-5 хвилин випадає бурий або чорний осад свинець сульфід.

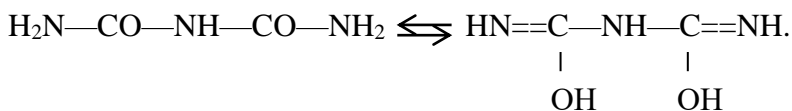
5. Біуретова реакція на пептидні зв'язки.

Принцип методу. Амінокислоти, що здатні утворювати не менше двох пептидних зв'язків ($-\text{CO}-\text{NH}-$), у лужному розчині за присутності мідь(II) сульфату утворюють комплекси з атомами міді, котрі забарвлені в фіолетовий колір. Уперше реакція утворення таких комплексних сполук міді була проведена для біурету, тому вона й названа біуретовою.

Біурет, який може бути отриманий у процесі нагрівання сечовини до температури 180°C , не є амінокислотою, але має два пептидні зв'язки



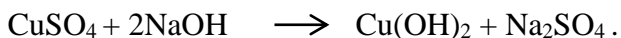
У лужному середовищі біурет зазнає енолізації за схемою



Дві молекули енольної форми біурету взаємодіють із мідь(II) гідроксидом і утворюють комплекс, у якому координаційні зв'язки утворені за рахунок електронних пар атомів азоту імінних груп.

Подібний комплекс із міддю можуть утворювати деякі амінокислоти, в яких пептидні зв'язки виникають за рахунок карбоксильної та аміної груп. Прикладом такої амінокислоти може бути аспарагін.

Мідь(II) гідроксид для проведення біуретової реакції отримують, як правило, в результаті реакції взаємодії мідь(II) сульфату з натрій (або калій) гідроксидом.



Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градузовані, крапельниця, скляна паличка, 1%-ий водний розчин аспарагіну, 10%-ий розчин натрій (або калій) гідроксиду, 10%-ий розчин мідь(II) сульфату.

Хід роботи. В пробірку з 3 мл розчину аспарагіну додати 1 мл розчину натрій (або калій) гідроксиду, 1-2 краплі розчину мідь(II) сульфату та вміст перемішати. Вміст пробірки в цьому випадку забарвлюється в синьо-фіолетовий колір.

6. Ксантопротеїнова реакція.

Принцип методу. В ароматичних амінокислотах, які містять бензольні кільця (тирозин, триптофан, фенілаланін), під дією нітратної кислоти відбувається реакція нітрування бензольного кільця з утворенням забарвленої в жовтий колір нітросполуки.

У реакції натрій гідроксиду з хіноїдною формою динітротирозину утворюється натрієва сіль динітротирозину, що має оранжевий колір.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градузовані, спиртівка, пробіркотримач, 1%-ий водний розчин тирозину, концентрована нітратна кислота, 10%-ий розчин натрій гідроксиду.

Хід роботи. В пробірку внести 3 мл розчину тирозину та 1 мл концентрованої нітратної кислоти. Суміш обережно нагріти в полум'ї спиртівки до появи жовтого забарвлення. Після охолодження в пробірку додати розчину натрій гідроксиду до появи оранжевого забарвлення.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Поняття про амінокислоти, їхня різноманітність у рослинних організмах.
2. Класифікація амінокислот.
3. Хімічна будова основних протеїногенних амінокислот.
4. Фізико-хімічні властивості амінокислот.
5. Загальні хімічні властивості амінокислот.
6. Якісні реакції на амінокислоти.

Інформаційні ресурси:

Біохімія рослин / М. М. Сирий, М. М. Кулешов, Н. М. Гаджиева. Харків : Харківський нац. аграр. ун.-т. ім. В. В. Докучаєва, 2006.

Биохимия / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Биохимия. Практикум / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Боєчко Ф. Ф. Біологічна хімія. Київ : Вища школа, 1995.

Кобилецька М. С., Терек О. І. Біохімія рослин. Львів : Вид.-во Львівського нац. ун-ту, 2017.

Красільнікова Л. О., Авксентьева О. О., Жмурко В. В. Біохімія рослин. Харків : Вид. група «Основа», 2007.

Холодова Ю. Д., Шатурський Я. П. Біоорганічна хімія. Київ : Альфа-Принт, 2000.

Черних В. П., Зіменковський Б. С., Гриценко І. С. Органічна хімія. Харків : Вид-во НФаУ, 2008.

Амінокислоти. URL:
<https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/6157/aminokisloti>.

Хімічні властивості амінокислот. URL:

<https://subject.com.ua/chemistry/zno/188.html>.

Роль амінокислот у захисті культур від стресів. URL:
<https://agrovio.com.ua/article.php?id=96>.

Лабораторне заняття № 15

Тема: Розподіл амінокислот методом хроматографії на папері. Якісні реакції на білки.

Мета заняття: Засвоїти методику якісного визначення амінокислот методом хроматографії на папері; проробити якісні реакції на білки та з'ясувати їхні характерні фізико-хімічні властивості.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Білки разом із нуклеїновими кислотами є обов'язковими компонентами організмів. Вони входять до складу всіх без винятку живих тіл – починаючи від найпростіших вірусів і закінчуючи людиною. В організмі рослин білки складають 20-25% у перерахунок на суху масу.

У тілі рослин білки виконують ряд важливих функцій: 1) будівельну або структурну (входять до складу клітинної мембрани, становлять основу гіалоплазми протопласта, беруть участь у побудові всіх його органел); 2) каталітичну (всі ферменти є простими або складними білками); 3) рухову (забезпечують рух джгутиків у статевих клітинах і зооспорах, рух цитоплазми в клітині, переміщення хромосом під час поділу клітини); 4) транспортну (здійснюють перенесення речовин через клітинну оболонку та мембрани, транспортують фітогормони); 5) захисну (отруйні та токсичні речовини, що забезпечують захист рослин від інших організмів, можуть мати білкову природу); 6) запасаючу (можуть відкладатися в рослинних клітинах як запасні речовини); 7) рецепторну (окремі групи білків, насамперед глікопротеїни, вибірково впізнають і зв'язують інші речовини); 8) регуляторну (спеціальні білки впливають на активність генів, можуть бути активаторами або інгібіторами ферментів).

Білки представляють собою високомолекулярні гетерополімерні сполуки, що побудовані з залишків α -амінокислот, які сполучені між собою пептидними (амідними) зв'язками. До складу білків входить, як правило, 20 протейногенних амінокислот або їхніх форм. Порядок сполучення конкретних амінокислот у поліпептидному ланцюгу білка визначає його первинну будову. В свою чергу вона задає його вторинну та третинну, а для окремих білків – і четвертинну будову. Прості білки складаються лише з амінокислот, а складні білки містять ще й інші компоненти – вуглеводи, ліпіди, ортофосфору кислоту, іони металів і ін.

Фізико-хімічні та хімічні властивості конкретного білка визначаються як наявністю багатьох пептидних зв'язків, так і природою амінокислот, які входять до його складу.

Білки представляють собою поліелектроліти й тому здатні рухатись в електричному полі. Сумарний заряд білкової макромолекули залежить, насамперед, від її амінокислотного складу та значення рН середовища. Значення рН, за якого сумарний заряд макромолекули дорівнює нулю й вона не здатна до руху в електричному полі, називається ізоелектричною точкою.

Кислотно-основні властивості білків визначаються, головним чином, бічними радикалами амінокислот, здатними до іонізації. Внесок кінцевих NH_2 - і COOH -груп досить невеликий. Білки, маючи амфотерні властивості, виконують роль буферів.

Переважає більшість білків є гідрофільними речовинами та розчинними у водних розчинах. Розчинність їх, як і інших високомолекулярних речовин, визначається природою тих груп, які опиняються на поверхні молекули в процесі її просторової укладки. Більша частина білкової макромолекули утворена групами, здатними до гідратації. Розчинність білків у воді зростає з додаванням невеликих кількостей нейтральних солей (Na_2SO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та ін.); цей ефект називають сольовим розчиненням. Високі концентрації нейтральних солей, навпаки, осаджують (висалюють) білки з водних

розчинів і найбільш активно це відбувається в ізоелектричній точці білка. Розчинність білків залежить також від величини рН розчинника, його складу, температури.

У розчинах білки проявляють колоїдні властивості: вони повільно дифундують, не проходять через напівпроникний бар'єр, розсіюють світло, характеризуються високою в'язкістю. Завдяки гідрофільним і гідрофобним групам, білки можуть впливати на розчинність інших речовин, виступаючи в ролі емульгаторів.

Білки піддаються денатурації. Під денатурацією розуміють порушення нативної просторової структури білкової молекули, що зумовлює зменшення або повну втрату її розчинності, зміну інших фізико-хімічних властивостей білка, втрату специфічної біологічної активності. В результаті денатурації порушуються нативна третинна та, в значній мірі, й вторинна структури. Денатурацію білкових молекул викликають як деякі хімічні речовини (формамід, органічні речовини, іони важких металів, іонні детергенти та ін.), так і фізичні (нагрівання, високий тиск, різні види випромінювань) фактори.

Усі білки, як правило, поглинають ультрафіолетове світло. Вони є оптично активними речовинами та повертають під час пропускання через них плоскополяризоване світло.

Під час нагрівання з концентрованими кислотами білки піддаються гідролізу, внаслідок чого розриваються пептидні зв'язки та утворюється суміш амінокислот. Подібно до вільних амінокислот білки дають специфічні кольорові реакції, що обумовлені присутністю в їхньому складі відповідних амінокислот.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Визначення окремих амінокислот методом розподільної хроматографії на папері.

Принцип методу. Застосування методу розподільної хроматографії на папері для розділення суміші амінокислот

ґрунтується на відмінностях у коефіцієнтах розподілу окремих амінокислот між двома рідинами, що не змішуються. Використовуваний як інертний носій хроматографічний папір, здатний утримувати в порах значну масу нерухомої рідкої фази.

Коефіцієнт розподілу R_f , який визначається як відношення відстаней, пройдених амінокислотою та рухомою фазою від точки старту, є характерною величиною для кожної амінокислоти в певних умовах досліду (склад розчинника, температура, сорт хроматографічного паперу).

Положення амінокислот на папері визначають за допомогою кольорової реакції з нінгідриним. За присутності нінгідрину окремі амінокислоти виявляються у вигляді плям, забарвлених у синій, фіолетовий або інший кольори (залежно від хімічної природи амінокислоти).

Ідентифікацію амінокислот у складі суміші проводять за розподілом відомих амінокислот (стандартів).

Обладнання та реактиви. Ексикатор або чашки Петрі, пульверизатор, мікропіпетки на 5-10 мкл, сушильна шафа, олівець, лінійка, годинник, хроматографічний папір, розчинник – суміш *n*-бутанолу, оцтової кислоти та води в співвідношенні 4:1:1, суміш амінокислот і їхні стандартні розчини (0,1%-ві розчини аланіну, лейцину та глутамінової кислоти), свіжоприготовлений нінгідриний реактив (змішати 95 мл 0,5%-го розчину нінгідрину в 95%-му ацетоні, 1 мл льодяної оцтової кислоти та 4 мл дистильованої води).

Хід роботи. Хроматографічний папір вирізати у формі круга, діаметр якого дорівнює поверхневому радіусу ексикатора або чашки Петрі. Простим олівцем круг розділити на сегменти. В центрі зробити невеликий отвір (діаметром 0,5-1 см), у який вставити згорнутий у трубочку фільтрувальний папір (гніт). Змінюючи товщину й довжину гніта, що опущений у розчинник, можна регулювати швидкість подачі розчинника на хроматографічний папір.

Олівцем в основі гніта на хроматографічному папері в кожному сегменті намітити точку нанесення амінокислот. На

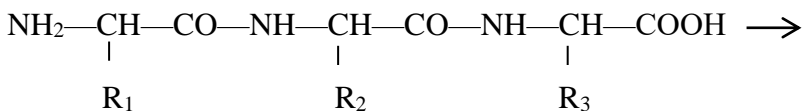
один із сегментів за допомогою мікропіпетки нанести суміш амінокислот (5-10 мкл суміші аланіну, лейцину та глютамінової кислоти), на інші сегменти – такий же об'єм стандартного розчину чистих амінокислот. Після цього хроматографічний папір висушити на повітрі впродовж 10 хвилин. В ексікатор або чашку Петрі налити розчинник – суміш *n*-бутанолу, оцтової кислоти та води, таким об'ємом, щоб гніт був занурений у розчинник. Кругову хроматограму далі помістити в ексікатор або між двома половинками чашки Петрі. Хроматограма з діаметром 12 см утвориться приблизно через 1 год., із діаметром 20 см – через 2 год. Після завершення розподілу (коли фронт розчинника дійде до встановленої відмітки) хроматограму висушити та проявити, обприскавши її нінгідриновим реактивом із пульверизатора та прогрівши в сушильній шафі впродовж 10 хвилин за температури 110⁰ С.

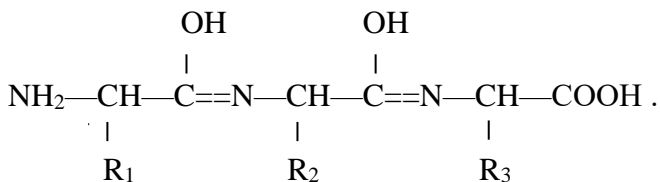
Порівнюючи положення плям суміші амінокислот із положенням плям амінокислот-стандартів, провести ідентифікацію плям суміші амінокислот. За допомогою лінійки визначити відстані, пройдені фронтом розчинника та амінокислот, і обчислити значення коефіцієнта розподілу.

2. Біуретова реакція на виявлення пептидних зв'язків у білках.

Принцип методу. Білки (поліпептиди) в лужному розчині за присутності мідь(II) сульфату утворюють комплексні сполуки міді, що забарвлені в синьо-фіолетовий колір, інтенсивність якого залежить від числа пептидних зв'язків у молекулі білка.

Спочатку пептидні групи білка зазнають у лужному середовищі енолізації





Енольна форма поліпептиду взаємодіє з мідь(II) гідроксидом і утворює забарвлений у синьо-фіолетовий колір комплекс. Продукти неповного гідролізу білка (пептиди) дають у біуретовій реакції червоне або рожеве забарвлення.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, скляна паличка, крапельниця, 1%-ий розчин яєчного білка, 10%-ий розчин натрій (або калій) гідроксиду, 1%-ий розчин мідь(II) сульфату.

Хід роботи. В пробірку внести 3 мл розчину яєчного білка, додати 1 мл розчину натрій гідроксиду, 1-2 краплі розчину мідь(II) сульфату та перемішати. Вміст пробірки в цьому випадку забарвлюється в червоно-фіолетовий колір.

3. Кольорові реакції з білками на виявлення карбонових амінокислот.

Принцип методу. Для якісного виявлення залишків карбонових амінокислот, які входять до складу білків, використовують характерні для цих амінокислот кольорові реакції. Так, для виявлення α -амінокислот використовують нінгідринову реакцію, для виявлення залишків цистину та цистеїну – реакцію Фоля.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, скляні палички, крапельниця, водяна баня, термометр, лабораторний, годинник, 1%-ий розчин яєчного білка, 1%-ий розчин нінгідрину в 95%-му розчині ацетону, реактив Фоля (див. лабор. заняття № 14).

Хід роботи:

А. Нінгідринова реакція. В пробірку внести 1 мл розчину яєчного білка, додати сюди 3 краплі розчину нінгідрину. Суміш перемішати та поставити на водяну баню з температурою 70⁰ С на 5 хвилин. У результаті спостерігається

утворення синьо-фіолетового забарвлення, що свідчить про присутність у молекулі білка залишків α -амінокислот.

Б. Реакція Фоля. В пробірку внести 3 мл розчину яєчного білка, додати сюди 3 мл реактиву Фоля й після перемішування кип'ятити на водяній бані впродовж 2 хвилин. Після охолодження пробірки спостерігається утворення бурого або чорного осаду, що свідчить про наявність у молекулі білка залишків цистеїну та цистину.

4. Кольорові реакції з білками на виявлення циклічних амінокислот.

Принцип методу. Для якісного виявлення залишків циклічних амінокислот у складі молекули білка використовують характерні для цих амінокислот реакції. Так, для виявлення залишків ароматичних амінокислот використовують ксантопротеїнову реакцію, залишків тирозину – реакцію Мілона, залишків триптофану – реакції Адамкевича та Вуазене, залишків гістидину та тирозину – реакцію Паулі.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, бюретка, скляні палички, крапельниці, термометр лабораторний, годинник, ванночка з льодом, 1%-ий розчин яєчного білка, концентрована сульфатна кислота, 10%-ий розчин натрій карбонату, 2,5%-ий розчин формальдегіду, 1%-ий розчин сульфанілової кислоти в 5%-ому розчині хлоридної кислоти, 0,5%-ий розчин натрій нітриту.

Хід роботи:

А. Реакція Вуазене. В пробірку внести 2 мл розчину яєчного білка та 1 краплю розчину формальдегіду. До отриманої суміші, ретельно перемішуючи та охолоджуючи пробірку в ванночці з льодом, обережно краплями за допомогою бюретки додати 6 мл концентрованої сульфатної кислоти. Через 10 хвилин у пробірку прилити, перемішуючи, 10 крапель розчину натрій нітриту. В цьому випадку спостерігається утворення синьо-фіолетового забарвлення.

Б. Реакція Паулі. В пробірку внести 1 мл розчину сульфанілової кислоти в розчині хлоридної кислоти, 2 мл

розчину натрій нітриту та, після ретельного перемішування, 2 мл розчину яєчного білка й 6 мл розчину натрій карбонату. Після перемішування суміш забарвлюється у вишнево-червоний колір.

5. Реакції осадження білків.

Принцип методу. Під впливом різноманітних факторів білки втрачають свою нативну структуру, денатурують і внаслідок цього переходять у нерозчинний стан. Осадження білків спостерігається, наприклад, під час їхнього нагрівання, дії органічних розчинників, алкалоїдних речовин, нейтральних солей високої концентрації, солей важких металів, мінеральних і органічних кислот та інших факторів.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, крапельниці, шпатель, 1%-ий розчин яєчного білка, 5%-ий розчин свинець ацетату, 5%-ий розчин мідь(II) сульфату, 3%-ий розчин срібло нітрату, кристалічний натрій хлорид, 96%-ий етиловий спирт, 95%-ий ацетон, концентрована хлоридна кислота, концентрована сульфатна кислота, концентрована нітратна кислота, 20%-ий розчин сульфосаліцилової кислоти, 5%-ий розчин трихлороцтової кислоти.

Хід роботи:

А. Осадження білків солями важких металів. У три пробірки внести по 3 мл розчину яєчного білка. В першу з них краплями додати розчин свинець ацетату, в другу – розчин мідь(II) сульфату, в третю – розчин срібло нітрату. В результаті спостерігається випадання осаду білка. В першу та другу пробірки додати надлишок відповідно розчину свинець ацетату та розчину мідь(II) сульфату. В цьому випадку осад зникає.

Б. Осадження білків органічними розчинниками. В пробірку внести 2 мл розчину яєчного білка, додати декілька кристаликів натрій хлориду та 2 мл етилового спирту. Вміст пробірки добре збовтати. В результаті спостерігається випадання осаду білка. Аналогічну реакцію проробити з ацетоном.

В. Осадження білків мінеральними кислотами. В три пробірки обережно налити по 1 мл, відповідно, концентрованих хлоридної, сульфатної та нітратної кислот. Нахиливши пробірки, по їхній стінці долити 1 мл розчину яєчного білка. На межі двох рідин спостерігається поява осаду білка у вигляді мутнобілого кільця. Вміст кожної з пробірок обережно струсити. В цьому випадку відбувається розчинення осаду в надлишку кислот.

Г. Осадження білків органічними кислотами. В дві пробірки внести по 1 мл розчину яєчного білка. В одну з них додати 2 мл розчину сульфосаліцилової кислоти, в іншу – 1 мл розчину трихлороцтової кислоти. В цьому випадку спостерігається випадання осаду білка.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Принцип методу визначення окремих амінокислот за допомогою розподільної хроматографії на папері.
2. Білки, їхній уміст у рослинних організмах. Різноманітність білків, їхні біологічні функції.
3. Хімічна будова білків. Пептидний зв'язок.
4. Характеристика структурних рівнів організації білкових макромолекул.
5. Загальні фізико-хімічні та хімічні властивості білків.
6. Кольорові реакції на білки.
7. Які речовини можна використати для осадження білків ?
8. Денатурація білків і денатуруючі фактори.
9. Класифікація білків. Основні групи простих і складних білків.

Інформаційні ресурси:

Биологическая химия. Практикум / под. ред. Ю. Е. Хмелевского. Киев : Выща школа, 1985.

Біохімія рослин / М. М. Сирий, М. М. Кулешов, Н. М. Гаджиева. Харків : Харківський нац. аграр. ун.-т. ім. В.В. Докучаєва, 2006.

Биохимия / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Биохимия. Практикум / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Боєчко Ф. Ф. Біологічна хімія. Київ : Вища школа, 1995.

Кобилецька М. С., Терек О. І. Біохімія рослин. Львів : Вид.-во Львівського нац. ун-ту, 2017.

Красільнікова Л. О., Авксентьева О. О., Жмурко В. В. Біохімія рослин. Харків : Вид. група «Основа», 2007.

Холодова Ю. Д., Шатурський Я. П. Біоорганічна хімія. Київ : Альфа-Принт, 2000.

Білки. URL:
<https://subject.com.ua/chemistry/zno1/188.html>.

Білки. Теоретичні відомості. URL:
https://срo.stu.cn.ua/Oksana/harch_himia_lab_prakt/110.html.

Будова пептидів та білків. URL:
https://срo.stu.cn.ua/Oksana/harch_himia_lekcii/290.html.

Лабораторне заняття № 16-17

Тема: Вивчення властивостей ферментів. Визначення активності ферментів.

Мета заняття: З'ясувати загальні фізико-хімічні властивості ферментів; засвоїти методику визначення активності окремих груп ферментів у рослинному матеріалі.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Ферменти або ензими є біологічними каталізаторами, що забезпечують протікання біохімічних реакцій у живих організмах. Завдяки ферментам швидкість протікання біохімічних процесів зростає в сотні та десятки тисяч раз. Через ферментативний апарат, регуляцію його активності відбувається й регуляція швидкості обміну речовин у цілому та їхньої спрямованості.

За хімічною природою всі ферменти є простими або складними білками. Вони володіють вузькою специфічністю, вибірково діючи лише на певні субстрати (речовини, що піддаються каталітичному перетворенню).

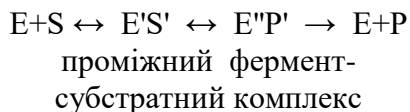
У випадку ферментів, які представляють собою складні білки, білкова частина називається апоферментом; небілковий компонент таких ферментів називають коферментом або кофактором, якщо він слабо зв'язаний із білковою частиною та легко дисоціює з такого комплексу, або простетичною групою, якщо небілковий компонент міцно зв'язаний із білком і в циклі біохімічних реакцій не від'єднується від нього.

Як правило, каталітичною активністю володіє не вся молекула ферменту, а лише певна його частина, найчастіше досить невелика, що називається активним центром. Саме в активному центрі відбувається контакт між ферментом і субстратом, зв'язування останнього, утворення проміжного фермент-субстратного комплексу та повне перетворення субстрату. Активний центр створюється певними бічними радикалами амінокислотних залишків поліпептидного ланцюга, а у випадку складних білків до складу активного центру можуть входити групи небілкової частини. Активні центри ферментів розміщені в заглибинах на поверхні білкової макромолекули. Мікросередовище активного центру відрізняється від решти оточення ферменту більш низькою діелектричною провідністю, що близька до такої для деяких органічних розчинників.

Із коферментів і простетичних груп до складу ферментів найчастіше входять: НАД⁺ (нікотинамідаденіндинуклеотид), НАДФ⁺ (нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат), ФМН (флавінмононуклеотид), ФАД (флавінаденіндинуклеотид), АТФ та інші нуклеозидтрифосфати (ГТФ, УТФ, ЦТФ), кофермент ацетилювання – коензим А (КоА-SH).

Завдяки утворенню фермент-субстратного комплексу значно знижується енергія активації взаємодіючих молекул, що й зумовлює помітне зростання швидкості реакції під впливом ферменту.

Ферментативний каталіз має ознаки як гомогенного, так і гетерогенного каталізу, котрий відбувається на межі розподілу двох фаз. У каталітичній дії ферментів можна виділити 3 основні стадії: 1) приєднання молекул субстрату (S) до ферменту (E); 2) перетворення субстрату; 3) від'єднання кінцевих продуктів реакції (P) від ферменту. В найпростішому випадку схема ферментативної реакції буде мати вигляд:



Як правило, найшвидшою є перша стадія реакції, повільною – друга. Утворення проміжного фермент-субстратного комплексу є можливим завдяки певній спорідненості ферменту до свого субстрату. В утворенні цього комплексу беруть участь іонні, водневі зв'язки та гідрофобні взаємодії. В цьому процесі молекули ферменту та субстрату не тільки зближуються, але й певним чином взаємно зорієнтовуються. Між структурою субстрату та структурою активного центру ферменту крім стеричної відповідності існує й топохімічна, завдяки якій забезпечується взаємодія впізнаваючих груп ферменту та груп субстрату, що розпізнаються. Важливою особливістю ферментативних реакцій є те, що перетворення субстрату протікає як поліфункціональний каталіз, який забезпечується різноманітністю амінокислотних залишків білкової частини ферменту та функціональних груп кофакторів в активному центрі.

Для оцінки ферментативної активності згідно останньої міжнародної угоди використовують одиницю, що називається катал (кат). 1 катал – це така кількість ферменту, яка в певних умовах каталізує перетворення субстрату зі швидкістю 1 моль/с. За стандартну одиницю активності (E) будь-якого ферменту приймається така його кількість, яка каталізує перетворення 1 мікромоль даного субстрату за 1 хвилину за

оптимальних умов (звичайно за температури 30⁰ С, оптимальних для даного ферменту значеннях рН і концентрації субстрату). Якщо реакцію проводять не за температури 30⁰ С, то потрібно зазначити фактичну температуру реакції. Чистоту ферментного препарату характеризують величиною питомої активності, що виражається числом одиниць ферменту на 1 мг стандартного зразка. Концентрацію ферменту в розчині виражають числом одиниць активності, що припадають на 1 мл розчину. Іноді використовують й інші вираження одиниць активності ферментів.

Активність ферментів у рослинах непостійна й залежить від виду та органу рослини, часу доби, температури й вологості, за яких вирощується рослина, живлення та від ряду інших чинників. Залежно від зміни активності ферментів змінюється інтенсивність і спрямованість біохімічних процесів, що в кінцевому підсумку призводить до зміни величини врожаю та його хімічного складу.

Для впорядкування значного числа ферментів, які виявлені в живих організмах, у 1961 р. Міжнародна комісія з ферментів прийняла їхню класифікацію, згідно якої всі ферменти розподілені на 6 класів у відповідності з характером реакції, що каталізується. Ці класи поділені на підкласи, а вони, в свою чергу, – на підпідкласи або групи, в межах яких ферментам присвоюється порядковий номер. Таким чином, кожен фермент має свій індивідуальний чотиризначний шифр (наприклад, глюкооксидаза – КФ. 1.1.3.4).

Згідно прийнятої класифікації виділено 6 наступних класів ферментів:

- 1) оксидоредуктази (каталізують окисно-відновні реакції);
- 2) трансферази (каталізують реакції переносу груп з однієї речовини на іншу);
- 3) гідролази (каталізують реакції гідролітичного розщеплення речовин);

4) ліази (каталізують реакції негідролітичного розщеплення речовин із утворенням подвійних зв'язків або з приєднанням за місцем подвійних зв'язків);

5) ізомерази (каталізують реакції ізомеризації речовин);

6) лігази або синтетази (каталізують реакції синтезу нових речовин).

Для вивчення дії ферментів і визначення їхньої активності звичайно використовують якісні або кількісні реакції, що супроводжуються використанням речовин, на які діє фермент (субстратів), або появою продуктів реакції, що утворюються в результаті дії ферменту. Для одержання препаратів ферментів використовують витяжки з рослинних тканин, у яких ферменти знаходяться в розчиненому стані. Для більш детального вивчення дії ферментів їх вилучають із тканин рослин, очищують шляхом фракціонування екстрактів нейтральними солями або органічними розчинниками, іонообмінною хроматографією, гель-фільтрацією або іншими методами. Поєднаннями різноманітних методів очищення можна одержати ферменти в кристалічному стані.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Визначення оптимальної температури дії ферментів.

Принцип методу. Швидкість ферментативної реакції закономірно зростає приблизно в 2-3 рази з підвищенням температури на кожні 10^0 С. На відміну від неферментативних процесів таке зростання спостерігається лише у вузькому інтервалі температур оптимального значення. Після досягнення температури $40-50^0$ С швидкість більшості ферментативних процесів починає зменшуватись, що пояснюється тепловою денатурацією молекули ферменту та втратою її ферментативної активності.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, крапельниця, ванночка з льодом, водяна баня, термометр лабораторний, годинник, 1%-ий розчин крохмалю, розведена слина (1:10), реактив Люголя.

Хід роботи. В чотири пронумеровані пробірки внести 2 мл розчину крохмалю та додати в кожну з них 0,5 мл розведеної слини. Одну з пробірок поставити у ванночку з льодом (температура приблизно 0⁰ С), другу – залишити в штативі за кімнатної температури, третю – поставити на водяну баню з температурою 37-40⁰ С, четверту – на водяну баню з температурою 70-80⁰ С. Через 5-7 хвилин у пробірки додати по 1-2 краплі реактиву Люголя. Вміст пробірок забарвлюються в різні кольори або відтінки. Різне забарвлення з йодом і, відповідно, різна глибина гідролізу крохмалю зумовлені різною швидкістю ферментативної реакції за різних температур. Результати спостережень зпівставити з приведеними нижче даними:

	0 ⁰ С	20 ⁰ С	40 ⁰ С	80 ⁰ С
забарвлення досліджуваного розчину в реакції з йодом	фіолетове	червоно-буре	жовте	оранжеве
назва забарвлених продуктів реакції	амінодекстрини	еритродекстрини	мальтоза	охродекстрини

2. Специфічність дії ферментів.

Принцип методу. Ферменти характеризуються строгою специфічністю дії на субстрати. Вони здатні перетворювати лише певну речовину або невелику групу близьких за хімічною природою речовин. Так, наприклад, амілаза каталізує гідролітичне розщеплення глікозидних зв'язків крохмалю та нездатна гідролізувати дисахариди (сахарозу, мальтозу).

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, скляна паличка, водяна баня, термометр

лабораторний, годинник, 1%-ий розчин крохмалю, розведена слина (1:10), препарат сахарози, реактив Фелінга.

Хід роботи: В дві пробірки внести по 3 мл розчину крохмалю. В одну з пробірок додати 1 мл розведеної слини, що містить у собі амілазу, а в другу – 1 мл препарату сахарози. Вміст пробірок перемішати й поставити на водяну баню з температурою 37⁰ С на 10 хвилин для гідролізу. Після проведення гідролізу вміст пробірок перевірити за допомогою реактиву Фелінга (див. лабор. заняття № 9-10) на наявність у ньому продуктів гідролізу крохмалю. За результатами реакцій зробити відповідні висновки про специфічність дії амілази.

3. Групова специфічність дії сахарози.

Принцип методу. Фермент сахарози специфічний по відношенню до фруктозної частини дисахариду сахарози та трисахариду рафінози. Тому розщепленню піддається β-глікозидний зв'язок, який знаходиться ближче до фруктозної частини зазначених молекул. Продукти ферментативного гідролізу сахарози та рафінози дають позитивну реакцію з реактивом Фелінга.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, скляні палички, термостат, нагрівач, годинник, 1%-ий розчин рафінози, 1%-ий розчин сахарози, препарат сахарози, реактив Фелінга.

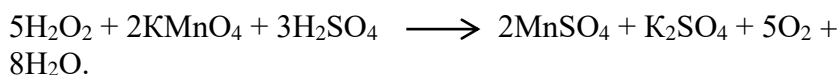
Хід роботи: В дві пробірки внести по 1 мл препарату сахарози. В одну з пробірок додати 2 мл розчину сахарози, в другу – 2 мл рафінози. Вміст пробірок перемішати й поставити на 5-10 хвилин у термостат із температурою 38⁰ С. Потім в обидві пробірки додати по 3 мл реактиву Фелінга, добре перемішати й суміш нагріти до кипіння. В цьому випадку в обох пробірках спостерігається утворення червоного осаду мідь(І) оксиду.

4. Визначення активності каталази методом О.М. Баха та А.І. Опаріна.

Принцип методу. Каталаза (К.Ф. 1.11.1.6) – фермент, який каталізує реакцію розкладання пероксиду водню на воду й молекулярний кисень. Незначною мірою вона також сприяє

окисненню різних спиртів і інших сполук пероксидами. Цей фермент досить широко розповсюджений у рослинних тканинах і є тут одним із найактивніших.

Активність каталази визначають за кількістю пероксиду водню, що розклався під дією ферменту. В реакційну суміш вносять надлишок пероксиду водню. В контрольному зразку каталазу інактивують сульфатною кислотою. В досліджуваному зразку частина внесеного пероксиду водню розкладається під дією ферменту, а ту частину, що не розклалася, визначають титруванням калій перманганатом у кислому середовищі. В цьому випадку відбувається така реакція



Об'єм пероксиду водню, що розклався під дією ферменту у відповідності до наведеної реакції, знаходять за різницею між дослідним і контрольним титруваннями.

Обладнання та реактиви. Технохімічні ваги, центрифуга, термостат, годинник, ступки фарфорові з товкачиком, мірні циліндри, пробірки центрифужні, хімічний стакан на 50 мл, конічні колби на 200 мл, бюретки, піпетки градуйовані, шпатель, термометр лабораторний, годинник, 0,1 н розчин пероксиду водню (H_2O_2), 10%-ий розчин сульфатної кислоти, 0,1 н розчин калій перманганату (KMnO_4), кальцій карбонат, дистильована вода, індикаторні папірці, кварцовий пісок, рослинний матеріал.

Хід роботи: На технохімічних вагах відважити 2-3 г свіжого рослинного матеріалу та розтерти його в ступці з кварцовим піском. Якщо реакція рослинного матеріалу кисла (визначити за допомогою індикаторних папірців), то в ступку додати на кінчику шпателя невелику кількість кальцій карбонату. В процесі розтирання в ступку невеличкими порціями додати точно 40 мл води. Розтерту масу кількісно (змити ступку й товкачик 10 мл дистильованої води)

перенести в центрифужні пробірки та відцентрифугувати 10-15 хвилин за 3-5 тис. об./хв. Потім надосадову рідину з центрифужних пробірок перелити в хімічний стакан.

Для визначення активності ферменту зі стакану взяти дві проби по 20 мл ферментної витяжки та перенести їх у конічні колби на 200 мл. В одну з колб, яка служить контролем, долити 5 мл розчину сульфатної кислоти для інактивації ферменту. Потім в обидві колби додати по 20 мл розчину пероксиду водню. Реакцію розкладання пероксиду водню проводять за 20⁰ С впродовж 30 хвилин. Після додавання кожного з реактивів уміст колб старанно перемішати. Через 30 хвилин фермент у досліджуваній колбі інактивувати додаванням у неї 5 мл розчину сульфатної кислоти.

Потім надлишок перекису водню в кожній колбі відтитрувати розчином калій перманганату до утворення стійкого рожевого забарвлення, що не зникає впродовж 1 хвилини

Активність каталази (Е) виразити в мікромолях пероксиду водню, що розклався під дією ферменту за 1 хвилину в розрахунку на 1 г свіжого рослинного матеріалу. Розрахунок провести за формулою

$$E = \frac{(V_k - V_e) \cdot T \cdot 50 \cdot 50}{m \cdot 20 \cdot 30},$$

де V_k – об'єм 0,1 н розчину $KMnO_4$, витраченого на титрування контрольного зразка, мл; V_e – об'єм 0,1 н розчину $KMnO_4$, витраченого на титрування досліджуваного зразка, мл; T – поправка на титр 0,1 н розчину $KMnO_4$; 50 – коефіцієнт перерахунку на мікромолі H_2O_2 ; 50 – загальний об'єм екстракту, мл; 20 – об'єм ферментного розчину, взятого для аналізу, мл; 30 – час ферментативної реакції, хвилин; m – наважка матеріалу, взятого для аналізу, г.

5. Визначення активності тирозинази.

Принцип методу. Тирозиназа або монофенол-

монооксигеназа (К.Ф. 1.14.18.1) широко розповсюджена в рослинах. Вона міститься в картоплі, цукровому буряку, багатьох плодових культурах, у зернах злаків та інших рослинах. Активна тирозиназа міститься в зерні жита та в окремих сортах пшеничного борошна. Темний колір житнього хліба частково пояснюється саме дією тирозинази; цією ж причиною пояснюється потемніння макаронів під час сушіння.

Тирозиназа – фермент, який містить мідь і відноситься до типових оксидаз. Для її дії необхідна наявність вільного кисню. Тирозиназа каталізує окиснення тирозину, фенолів, пірокатехіну, крезолів, пірогалолу та інших сполук.

У процесі дії на тирозин тирозиназа каталізує двостадійну реакцію гідроксилування з наступним дегідруванням. Тирозин, окиснюючись, перетворюється в дигідроксифенілаланін, а потім у дофахінон. Після цього можливе протікання реакції перетворення дофахінону в дигідроксиіндол і в індол-5,6-хінон, а внаслідок конденсації двох останніх продуктів утворюється димер, до якого можуть окиснювальним шляхом приєднуватися наступні дигідроксиіндольні ланки з утворенням, у кінцевому результаті, високополімерних темнозбарвлених сполук – меланінів. Потемніння очищеної картоплі, розрізаного цукрового буряка, розрізаних плодів пояснюється утворенням меланінів під дією тирозинази за присутності кисню повітря.

Тирозиназу, що міститься в рослинному матеріалі, вилучають водою. У водну витяжку, що містить фермент, вносять певну кількість тирозину та інкубують у термостаті за температури 40⁰ С. Під час інкубації частина тирозину перетворюється в темнозбарвлений пігмент – меланін. Після цього фермент інактивують нагріванням розчину до кипіння, а меланін осаджують хлоридом барію в присутності соди. В фільтраті визначають кількість неокисненого тирозину броматометричним методом. Для визначення кількості тирозину в розчин вносять надлишок 0,03 н розчину бромат-бромідної суміші, підкислюють хлоридною кислотою й залишають на 10 хвилин. За цей час відбувається бромовання

тирозину. Надлишок бромиду відтитровують розчином метилоранжу, який руйнується й знебарвлюється під дією бромиду.

Титрування ведуть до появи червоного забарвлення, що не зникає, та обумовлене надлишком метилоранжу. Нормальність розчину метилоранжу встановлюють за титрованим розчином бромат-бромиду. Молярна маса калій бромату (KBrO_3) дорівнює 167,00, молярна маса тирозину $\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ дорівнює 181,19.

Обладнання та реактиви: Піпетки градуйовані, ступка з товкачиком, колби мірні на 50 мл, 100 мл, 200 мл і 1 л, колби конічні на 250 мл, хімічний стакан, лійка, фільтр, бюретки, крапельниця, центрифуга, термостат, годинникове скло, годинник, прожарений пісок, толуол, 0,05%-ий розчин тирозину (0,1 г тирозину перенести в мірну колбу на 200 мл, додати 1,2 мл 5%-ого розчину Na_2CO_3 , долити 150 мл дистильованої води, нагріти до розчинення тирозину, а потім охолодити, довести водою до мітки й перемішати; зберігати в темній посудині в холодильнику), 0,03 н розчин бромат-бромиду (зважити на аналітичних вагах 0,8349 г KBrO_3 , перенести в мірну колбу на 1 л, додати 10 г KBr , розчинити у воді, розбавити водою до 1 л і старанно перемішати), 0,2%-ий розчин метилоранжу (зважити 2,0 г метилоранжу, перенести в мірну колбу на 1 л, долити дистильованої води, перемішати й довести водою до мітки, розчин відфільтрувати), 10%-ий розчин барій хлориду (10 г $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ перенести в мірну колбу на 100 мл, розчинити в дистильованій воді, довести водою до мітки й перемішати), 5%-ий розчин натрій карбонату (50 г безводної солі Na_2CO_3 перенести в мірну колбу на 1 л, розчинити в дистильованій воді й довести водою до 1 л), розчин хлоридної кислоти (з розведенням 1:1) (50 мл концентрованої хлоридної кислоти перенести в мірну колбу на 100 мл, довести водою до мітки й перемішати).

Нормальність приготовленого розчину метилоранжу встановлюють за калій броматом. Для цього в колбу для титрування перенести точно 10 мл 0,03 н розчину бромат-

броміду, додати 30 мл дистильованої води, 4 мл розчину хлоридної кислоти (з розведенням 1:1) і відтитрувати розчином приготовленого метилоранжу до появи червоного забарвлення, що не зникає. Нормальність (N) розчину метилоранжу розрахувати за формулою

$$N = \frac{10 \cdot 0,03}{V} = \frac{0,3}{V},$$

де V – об'єм розчину метилоранжу, затраченого на титрування 10 мл 0,03 н розчину бромат-броміду, мл.

Хід роботи. На технохімічних вагах відважити 2-5 г свіжого рослинного матеріалу та перенести його в фарфорову ступку й ретельно розтерти з невеликою кількістю дистильованої води. Якщо матеріал розтирається погано, то в ступку додати невелику кількість прожареного піску. Після розтирання суспензію перенести в мірну колбу на 50 мл, споліскуючи ступку невеликою кількістю води. Вміст колби довести водою до мітки, ретельно перемішати й дати осаду осісти, а потім відфільтрувати. Якщо осад осаджується погано, то його відцентрифугувати впродовж 15 хвилин за 5 тис. оберт./хв. Відібрати піпеткою 10 мл прозорої рідини над осадом або 10 мл фільтрату та перенести в конічну колбу на 250 мл. У колбу додати 10 мл розчину тирозину, 2-3 краплі толуолу, поставити колбу в попередньо нагрітій до 40⁰ С термостат і витримати за цієї температури 2 години. За час інкубації під дією тирозинази, що міститься в рослинному матеріалі, проходить окиснення частини внесеного тирозину в меланіни.

Після закінчення інкубації в колбу додати 1 мл розчину натрій карбонату, 3 мл розчину барій хлориду, нагріти до кипіння й відфільтрувати через паперовий фільтр у колбу для титрування. Колбу, де проводилось осадження, та осад на фільтрі промити 3 рази гарячою водою порціями по 8-10 мл. Фільтрат охолодити, додати 10 мл бромат-бромідного розчину та 4 мл розчину хлоридної кислоти, накрити колбу

годинниковим склом, перемішати та залишити на 10 хвилин Надлишок бромю відтитрувати розчином метилоранжу до появи червоного забарвлення, що не зникає. Щоб уникнути втрат бромю під час титрування, після додавання наступної порції метилоранжу перемішувати вміст колби коловими рухами без енергійного збовтування.

Паралельно провести контрольний дослід. Для цього 10 мл досліджуваного розчину, отриманого під час фільтрування або центрифугування, перенести в колбу для титрування, додати 25 мл дистильованої води та кип'ятити 5 хвилин для інактивації ферменту. Після охолодження в колбу додати 10 мл розчину тирозину, 10 мл бромат-бромідного розчину, 4 мл розчину хлоридної кислоти, накрити колбу годинниковим склом, перемішати вміст колби й залишити на 10 хвилин. Після цього вміст колби відтитрувати розчином метилоранжу до появи червоного забарвлення, що не зникає.

Активність тирозинази розрахувати за формулою

$$E = \frac{166,8 \cdot 50 \cdot N \cdot (V_e - V_k)}{10 \cdot m \cdot 2} = \frac{417,0 \cdot N \cdot (V_e - V_k)}{m},$$

де E – активність тирозинази, мкмоль окисненого тирозину за 1 год. на 1 г досліджуваного матеріалу; 50 – загальний об'єм досліджуваного розчину, мл; 10 – об'єм досліджуваного розчину, що взятий для визначення активності ферменту, мл; 2 – час взаємодії ферменту з тирозином, год.; V_e – об'єм розчину метилоранжу, витраченого на титрування дослідного розчину, мл; V_k – об'єм розчину метилоранжу, витраченого на титрування контрольного розчину, мл; N – нормальність титрованого розчину метилоранжу; m – наважка досліджуваного матеріалу, г; 166,8 – коефіцієнт перерахунку мг нормального розчину тирозину в мікромолі ($30200 : 181,2 = 166,8$).

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Роль ферментів в обміні речовин у рослинних організмах.
2. Поняття про ферменти, їхня природа та загальні властивості.
3. Механізм дії ферментів. Фермент-субстратний комплекс.
4. Вплив різних факторів на швидкість ферментативних реакцій.
5. Одиниці активності ферментів.
6. Класифікація ферментів.
7. Принцип методу визначення активності каталази методом О.М. Баха та А.І. Опаріна в рослинному матеріалі.
8. Принцип методу визначення активності тирозинази в рослинному матеріалі.

Інформаційні ресурси:

Биологическая химия. Практикум / под. ред. Ю. Е. Хмелевского. Киев : Выща школа, 1985.

Біохімія рослин / М. М. Сирий, М. М. Кулешов, Н. М. Гаджиева. Харків : Харківський нац. аграр. ун.-т. ім. В. В. Докучаєва, 2006.

Биохимия / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Биохимия. Практикум / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Боечко Ф. Ф. Біологічна хімія. Київ : Вища школа, 1995.

Кобилецька М. С., Терек О. І. Біохімія рослин. Львів : Вид.-во Львівського нац. ун-ту, 2017.

Красільнікова Л. О., Авксентьева О. О., Жмурко В. В. Біохімія рослин. Харків : Вид. група «Основа», 2007.

Холодова Ю. Д., Шатурський Я. П. Біоорганічна хімія. Київ : Альфа-Принт, 2000.

Ферменти.

URL:

<https://biohim.pdmu.edu.ua/storage/common/docs/jQPS3zXHxijx>

ROuoDtg7rgOU039wLsp9RlmMrV1T.pdf.

Класифікація та номенклатура ферментів. URL:
https://spo.stu.cn.ua/Oksana/harch_himia_lekcii/720.html.

Загальні відомості про ферменти. URL:
https://spo.stu.cn.ua/Oksana/harch_himia_lekcii/710.html.

Лабораторне заняття № 18

Тема: Виділення та встановлення складу нуклеопротейнів.

Мета заняття: Засвоїти методи виділення нуклеопротейнів, їхнього якісного та кількісного визначення.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Нуклеїнові кислоти, як і білки, є обов'язковими речовинами всіх живих організмів. Незважаючи на те, що вони були відкриті ще в 1868 р. (швейцарський дослідник Ф. Мішер виділив їх уперше з ядер лейкоцитів людини), їхня біологічна роль остаточно була з'ясована лише в 40-50-х роках минулого століття.

Відомо два типи нуклеїнових кислот – дезоксирибонуклеїнова кислота (ДНК) та рибонуклеїнова кислота (РНК). Функцією ДНК є зберігання та відтворення спадкової інформації. РНК забезпечує безпосередню реалізацію цієї інформації в процесі росту та розвитку організму. Виділяють декілька типів РНК, які відрізняються функціями, розміром, складом і локалізацією: матрична або інформаційна РНК (переносить інформацію від ДНК до білоксинтезуючого комплексу); транспортна РНК (транспортуює амінокислоти до білоксинтезуючого комплексу); рибосомальна РНК (входить до складу рибосом).

За хімічною природою нуклеїнові кислоти представляють собою гетерополімери, мономерами яких є нуклеотиди. В свою чергу нуклеотид складається з трьох компонентів – залишків пентози, азотистої основи та

ортофосфорної кислоти. Пентоза представлена рибозою (в РНК) або 2'-дезоксирибозою (в ДНК) у β -D-фуранозній формі. Азотисті основи представлені п'ятьма різними сполуками, з яких тимін, цитозин і урацил належать до піримідинів, а гуанін і аденін – до пуринів. Гуанін, аденін, цитозин входять до складу як ДНК, так і РНК. Тимін зустрічається лише в складі ДНК, а урацил – лише в складі РНК. Крім названих азотистих основ у складі нуклеїнових кислот зрідка в невеликих кількостях зустрічаються деякі інші азотисті основи, що називаються мінорними, наприклад, 5-метилцитозин, тіоурацил, гіпоксантин та ін. У складі нуклеїнових кислот усі оксопохідні азотисті основи присутні в формі лактамів.

У молекулі нуклеотиду пуринові азотисті основи через 9-й атом, а піримідинові – через 1-й утворюють N-глікозидний зв'язок із рибозою або 2'-дезоксирибозою.

Для нуклеїнових кислот, як і для білків, виділяють первинну, вторинну й третинну структури. Первинна структура представляє собою послідовність чергування нуклеотидів у полінуклеотидному ланцюгу. Нуклеотиди сполучаються в макромолекулу нуклеїнової кислоти за рахунок 3',5'-фосфодиефірного зв'язку, що з'єднує С-3' атом D-рибози (або 2'-дезоксирибози) одного нуклеотиду з С-5' атомом іншого. 5'-ОН кінцева група нуклеотиду вважається початком молекули, а 3'-ОН кінцева група – її кінцем.

Вторинна структура ДНК утворює подвійну спіраль із двох антипаралельних полінуклеотидних ланцюгів. Ланцюги закручені один навколо іншого, їх вуглецево-фосфатні групи розміщуються зовні, а азотисті основи – всередині. Азотиста основа одного з ланцюгів утворює комплементарну пару з азотистою основою іншого ланцюга. Така комплементарність забезпечується за рахунок виникнення водневих зв'язків між парою нуклеотидів. У цьому випадку між гуаніном і цитозином виникає три водневих зв'язки, а між аденіном і тиміном – два водневі зв'язки.

Залежно від особливостей вторинної структури відомі

декілька форм ДНК – правозакручені (B-, A-, C-форма), лівозакручена (Z-форма), незакручена (SBS-форма). З цих форм найчастіше зустрічається B-форма, в якій на один виток спіралі припадає 10 пар нуклеотидів, крок спіралі становить 3,4 нм, діаметр 2,0 нм.

Вторинна структура РНК виникає внаслідок закручування полінуклеотидного ланцюга на себе та утворення в полінуклеотидних ділянках коротких двоспіральних “шпильок”, у яких азотисті основи утворюють комплементарні пари.

Третинна структура ДНК виражається в багаторазовій суперспіралізації молекули, однак в еукаріотичних організмів вона підтримується в комплексі з гістоновими та негістоновими білками. Такі комплекси зумовлюють утворення хромосом. В організації хромосом виділяють декілька рівнів – нуклеосомний, соленоїдний і петлеподібний.

Молекули РНК також мають складну просторову структуру. Так, усі транспортні РНК нагадують “листок конюшини”. Рибосомні РНК мають V- або Y-подібну форму.

Полінуклеотидний ланцюг містить багато фосфатних груп, які легко дисоціюють, унаслідок чого він набуває від’ємного заряду. Тому нуклеїнові кислоти в клітині найчастіше сполучені з основними білками й утворюють нуклеопротеїни.

Нуклеїнові кислоти є речовинами білого кольору, погано розчинними у воді. Однак, вони розчинні в розчинах солей. Для нуклеїнових кислот характерна висока оптична активність і їхні розчини здатні обертати площину поляризованого світла. Всі нуклеїнові кислоти мають здатність поглинати світло в ультрафіолетовій області з максимумом 260 нм. Нуклеїнові кислоти також піддаються денатурації, під час якої відбувається розрив водневих зв’язків і порушення вандерваальсових взаємодій. Унаслідок цього деспіралізуються й розходяться полінуклеотидні ланцюги ДНК і двоспіральних ділянок РНК.

У зв’язку з наявністю азотистих основ і пентоз у складі

нуклеїнових кислот, які містять різні функціональні групи, вони можуть вступати в різні хімічні реакції. Нуклеїнові кислоти під впливом кислот піддаються гідролізу.

Якісні реакції на нуклеїнові кислоти та методи кількісного визначення вмісту їхніх окремих типів ґрунтуються на хімічних властивостях складових компонентів цих сполук.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Виділення нуклеопротейнів.

Принцип методу. Дезоксирибонуклеопротейни добре розчиняються в лужних та сольових розчинах і осаджуються після нейтралізації розчинів або в процесі розбавлення розчинів солей. Рибонуклеопротейни також розчиняються в лужних розчинах і можуть бути осаджені в ізоелектричній точці шляхом додавання кислот (наприклад, оцтової кислоти).

Обладнання та реактиви. Технохімічні ваги, центрифужні пробірки, порцелянова ступка з товчачиком, піпетка, мірні циліндри, колба конічна на 100 мл, центрифуга, 0,4%-ий і 0,02 моль/л розчини натрій гідроксиду, 5%-ий розчин оцтової кислоти, сухі дріжджі.

Хід роботи. Для одержання рибонуклеопротейнів наважку 10 г сухих дріжджів ретельно розтирати в порцеляновій ступці впродовж 15 хвилин із 50 мл 0,4%-ого розчину натрій гідроксиду, котрий додавати невеликими порціями. Одержаний гомогенат відцентрифугувати впродовж 10 хвилин за 2 тис. оберт./хв. До відібраної надосадової рідини долити в процесі помішування 15-20 мл розчину оцтової кислоти й осад, який випав, відокремити центрифугуванням упродовж 15 хвилин за 5000 оберт./хв. Осад після центрифугування розчинити в 15-20 мл 0,02 моль/л розчину натрій гідроксиду. Отриманий розчин нуклеопротейнів надалі використати для якісних реакцій.

2. Виявлення вуглеводів у складі нуклеопротейнів (реакція з орцином).

Принцип методу. Нуклеопротейни, на відміну від

простих білків, вступають у специфічні кольорові реакції з рядом речовин, що дозволяє виявити вуглеводний компонент у складі їхніх молекул. Так, нуклеопротейни, що містять у своїй молекулі рибозу, дають із орциновим реактивом синьо-зелене забарвлення.

Обладнання та реактиви: Штатив, центрифужні пробірки, пробірки градуйовані, водяна баня, годинник, лужний розчин рибонуклеопротейнів, який отриманий за допомогою приведеного вище методу, орциновий реактив (50 мл $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ розчинити в 250 мл концентрованої хлоридної кислоти й зберігати в посудині з темного скла, а перед використанням додати орцин із розрахунку 4,76 мг на 1 мл розчину), концентрована хлоридна кислота.

Хід роботи. До 1 мл розчину рибонуклеопротейнів додати однаковий об'єм орцинового реактиву, перемішати й поставити на киплячу водяну баню на 20 хвилин. Після цього суміш охолодити та розбавити дистильованою водою до об'єму 4 мл. У цьому випадку спостерігається поява синьо-зеленого забарвлення.

3. Виявлення пуринових основ у складі нуклеопротейнів.

Принцип методу. Метод ґрунтується на утворенні комплексів пуринових основ із солями срібла.

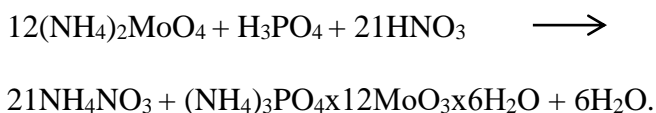
Обладнання та реактиви: Технохімічні ваги, штатив із пробірками, круглодонна колба, пробірки градуйовані, мірні циліндри, корок із отвором, скляна трубка довжиною 25-30 см, нагрівач, лакмусові папірці, 10%-ий розчин сульфатної кислоти, концентрований розчин аміаку, 1%-ий розчин срібло нітрату, гідролізат нуклеопротейнів дріжджів (у круглодонну колбу для гідролізу помістити 1 г пекарських дріжджів, долити 20 мл 10%-ого розчину сульфатної кислоти та 20 мл дистильованої води. Колбу закрити корком, у який вставити скляну трубку довжиною 20-30 см, яка слугує за холодильник. Вміст колби кип'ятити у витяжній шафі впродовж 1 год. на азбестовій сітці за слабого нагрівання. Після закінчення

гідролізу рідину охолодити, довести водою до початкового об'єму й відфільтрувати).

Хід роботи. До 1 мл гідролізату додати концентрованого розчину аміаку для одержання лужного середовища (перевірити лакмусовим папірцем) і 0,5 мл розчину срібло нітрату. Через 3-5 хвилин утвориться пухкий осад срібних солей пуринових основ.

4. Виявлення ортофосфатної кислоти в складі нуклеопротейнів.

Принцип методу. Метод ґрунтується на взаємодії ортофосфатної кислоти з молібденовим реактивом із утворенням забарвленої сполуки фосфатної солі – амоній фосфатномолібденовокислий



Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, нагрівач, гідролізат нуклеопротейнів дріжджів (отриманий у попередньому досліді), молібденовий реактив (7,5 г амоній молібдату $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ розчинити в 100 мл води та додати 100 мл 32%-ого розчину нітратної кислоти з відносною густиною 1,2 (повне розчинення $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ відбувається після додавання нітратної кислоти)).

Хід роботи. В пробірку внести 1 мл гідролізату, додати 1 мл молібденового реактиву та кип'ятити. Рідина в цьому випадку забарвлюється в лимонно-жовтий колір, а під час охолодження випадає кристалічний осад жовтого кольору, що обумовлений утворенням амонію фосфатномолібденовокислого.

5. Виявлення білків у складі нуклеопротейнів.

Принцип методу. Для підтвердження наявності білків у складі нуклеопротейнів проводять біуретову реакцію. Ця реакція характерна для сполук, які містять не менше двох пептидних зв'язків. Такі сполуки з наявними пептидними

зв'язками (білки) в лужному середовищі утворюють із мідь(II) сульфатом забарвлені комплексні сполуки, колір яких залежить від довжини поліпептидного ланцюга. Розчин нативного білка дає синьо-фіолетове забарвлення, а продукти його гідролізу (пептиди) – червоно-фіолетове.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, крапельниця, гідролізат нуклеопротейнів дріжджів, 10%-ий розчин натрій гідроксиду, 1%-ий розчин мідь(II) сульфату, розчин лакмусу.

Хід роботи. В пробірку внести 0,5 мл гідролізату, нейтралізувати його розчином натрій гідроксиду (значення рН перевірити лакмусом), потім додати 0,5 мл розчину натрій гідроксиду та 2-3 краплі розчину мідь(II) сульфату. Суміш перемішати й спостерігати появу забарвлення, що свідчить про присутність у пробі поліпептидів, які утворюються в результаті гідролізу білкової частини нуклеопротейнів.

6. Якісне визначення ДНК за Діше

Принцип методу. Метод ґрунтується на здатності вуглеводного компоненту нуклеїнових кислот (рибози або дезоксирибози) давати специфічні кольорові реакції з цистеїн хлоридом.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, колба на 50 мл, мікропіпетки, пробірки градуйовані, водяна баня, термометр лабораторний, годинник, 0,01-0,1%-ий водний розчин натрієвої солі ДНК, 5%-ий розчин цистеїн хлориду, розчин сульфатної кислоти (змішати 6 мл води та 15 мл концентрованої кислоти).

Хід роботи. В пробірку внести 1 мл розчину ДНК, додати 0,04 мл розчину цистеїн хлориду та 5 мл розчину сульфатної кислоти. Суміш нагрівати на водяній бані за температури 40° С упродовж 5 хвилин. У цьому випадку вміст пробірки забарвлюється в рожевий колір, який не зникає впродовж декількох годин.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Вміст, знаходження та склад нуклеїнових кислот.

2. Будова нуклеотиду.
3. Види та біологічна роль нуклеїнових кислот.
4. Первинна структура нуклеїнових кислот.
5. Вторинна структура ДНК, її форми.
6. Третинна структура ДНК.
7. Характеристика різних типів РНК.
8. Властивості нуклеїнових кислот.
9. Принципи методів визначення складових компонентів нуклеїнових кислот.

Інформаційні ресурси:

Биологическая химия. Практикум / под. ред. Ю. Е. Хмелевского. Киев : Выща школа, 1985.

Біохімія рослин / М. М. Сирий, М. М. Кулешов, Н. М. Гаджиєва. Харків : Харківський нац. аграр. ун.-т. ім. В. В. Докучаєва, 2006.

Биохимия / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Биохимия. Практикум / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Боечко Ф. Ф. Біологічна хімія. Київ : Вища школа, 1995.

Кобилецька М. С., Терек О. І. Біохімія рослин. Львів : Вид.-во Львівського нац. ун-ту, 2017.

Красільнікова Л. О., Авксентьева О. О., Жмурко В. В. Біохімія рослин. Харків : Вид. група «Основа», 2007.

Холодова Ю. Д., Шатурський Я. П. Біоорганічна хімія. Київ : Альфа-Принт, 2000.

Нуклеїнові кислоти. URL: https://moodle.znu.edu.ua/pluginfile.php/24621/mod_resource/content/3/%D0%9B%D0%B5%D0%BA%D1%86%D1%96%D1%8F%20%D0%9D%D1%83%D0%BA%D0%BB%D0%B5%D1%97%D0%BD%D0%BE%D0%B2%D1%96%20%D0%BA%D0%B8%D1%81%D0%BB%D0%BE%D1%82%D0%B8.pdf.

Нуклеїнові кислоти. URL: https://stud.com.ua/76651/meditsina/nukleyinovi_kisloti.

Нуклеїнові
[https://sites.google.com/site/nukleienovikisloti2/species-
description.](https://sites.google.com/site/nukleienovikisloti2/species-description)

кислоти.

URL:

Лабораторне заняття № 19-20

Тема: Вивчення властивостей пігментів фотосинтетичної системи рослин.

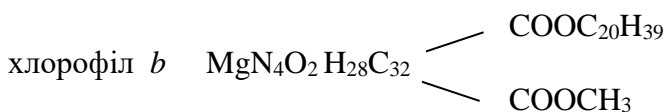
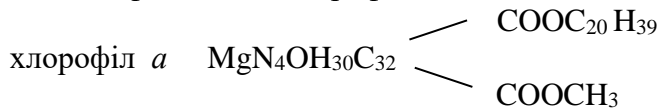
Мета заняття: з'ясувати загальні фізико-хімічні та хімічні властивості фотосинтезуючих пігментів листка.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Пігментна фотосинтезуюча система хлоропластів вищих рослин представлена двома типами пігментів: зеленими – хлорофіли *a* і *b* та жовтими – каротиноїди.

Основний функціонуючий пігмент – хлорофіл *a* виявлений, за винятком бактерій, у всіх фотосинтезуючих організмів. Цей пігмент служить безпосереднім донором енергії для фотосинтетичних реакцій, інші пігменти лише передають йому поглинену ними енергію. В більшості надземних вищих рослин вміст хлорофілу *a* в два-три з половиною рази вищий, ніж вміст хлорофілу *b*.

За хімічною природою хлорофіли *a* і *b* є складними ефірами дикарбонової кислоти хлорофіліну та двох спиртів – метилового й одноатомного ненасиченого спирту фітолу. Тому за хімічною номенклатурою хлорофіли можна розглядати як фітилметилхлорофіліди:



Структурною основою молекули хлорофілу є порфіринове ядро, що утворене чотирма пірольними кільцями, які сполучені одне з одним метиновими містками. В центрі ядра знаходиться атом магнію, що утримується в цьому положенні за рахунок зв'язків із атомами азоту. Чотири атоми азоту надають ядру гідрофільного характеру. Істотною структурною особливістю хлорофілу є наявність у його молекулі ізоциклічного угруповання – циклопентану. Таким чином, асиметрична молекула хлорофілу включає гідрофільну “головку” та ліпофільний “хвіст”, який представлений довгим ланцюгом фітолу.

Завдяки наявності кон'югованих подвійних зв'язків молекули хлорофілів беруть участь у первинному поглинанні та зв'язуванні світлової енергії.

Каротиноїди – це спряжені полієнові сполуки з 40 атомами вуглецю в ланцюзі, які можна розглядати як похідні п'ятивуглецевої сполуки ізопрену. Хроматофорну систему каротиноїдів також складають кон'юговані подвійні зв'язки. Каротиноїди поділяють на каротини та ксантофіли.

Каротини – це ненасичені вуглеводні з емпіричною формулою $C_{40}H_{56}$. За хімічною структурою вони можуть бути ациклічними, моноциклічними та біциклічними сполуками. В циклічних каротинах шестичленні кільця представлені двома типами: α -іононовими й β -іононовими. У фотосинтезуючих організмів група жовтих каротинових пігментів представлена лікопіном, α -каротином, β -каротином і γ -каротином. У вищих рослин переважає β -каротин. Його молекула утворена двома симетрично розташованими іононовими кільцями, сполученими довгим вуглецевим ланцюгом із системою подвійних зв'язків, які регулярно чергуються.

Ксантофіли – кисневмісні похідні каротинів, які в рослинах представлені лютеїном ($C_{40}H_{56}O_2$), зеаксантином ($C_{40}H_{56}O_2$), віолаксантином ($C_{40}H_{56}O_4$) і неоксантином ($C_{40}H_{56}O_4$). Однак, переважає лютеїн, який за хімічною структурою близький до α -каротину, але, на відміну від останнього, представляє собою двоатомний спирт, тобто в

кожному його іононовому кільці один атом водню заміщений на гідроксильну групу. Завдяки присутності гідроксильних та інших кисневмісних груп ксантофіли легко розчиняються в спирті та трохи гірше (на відміну від каротинів) – у неполярних розчинниках.

Каротиноїди також поглинають сонячну енергію й біля 50% поглинутої енергії передають хлорофілу, тобто вони виконують роль світлозбирачів, виступаючи додатковими пігментами. Одночасно, каротиноїди захищають хлорофіл від його фотодинамічного пошкодження досить активною формою кисню – синглетним киснем, який виникає під час взаємодії зі збудженими хлорофілами під впливом сонячного випромінювання.

Фотосинтезуючі пігменти разом із спеціальними білками та іншими речовинами згруповані в дві фотосистеми, що є безпосередніми функціональними одиницями процесів фотосинтезу.

Рослинні пігменти характеризуються відповідними фізико-хімічними властивостями, що дозволяє проводити їхнє якісне та кількісне визначення.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Отримання спиртового розчину (витяжки) пігментів.

Принцип мето.ду. Як правило, пігменти з рослинних тканин вилучають органічними розчинниками (етиловий спирт, ацетон, бензол), які руйнують зв'язок хлорофілів і ксантофілів із ліпопротеїнами пластид і тим самим забезпечують їхнє повне екстрагування. Неполарні розчинники (петролейний ефір, гексан, бензин та ін.) не порушують зв'язку цих пігментів із білками й тому не можуть їх вилучати зі свіжих листів. Для одержання витяжки пігментів використовують як сирий, так і сухий рослинний матеріал. В останньому випадку висушені листки попередньо обробляють гарячою водою, щоб полегшити наступне вилучення пігментів.

Обладнання та реактиви: Конічна колба на 200 мл із корком і зворотнім холодильником, колби конічні на 100 мл, мірний циліндр, водяна баня, годинник, 96%-ий етиловий спирт, дистильована вода, сухі листки кропиви.

Хід роботи. Сухі листки кропиви помістити в конічну колбу та ошпарити окропом, потім воду злити. В колбу долити 100 мл етилового спирту, закрити її корком із зворотнім холодильником і поставити на водяну баню з киплячою водою для екстрагування пігментів. Після п'ятихвилинного кип'ятіння вміст колби охолодити й розчин обережно злити в іншу колбу. Екстракт використати в наступних дослідах.

2. Розподіл пігментів за Краусом.

Принцип методу. Метод ґрунтується на різній розчинності пігментів у спирті та бензині. Зазначені розчинники в одній посудині не змішуються, а утворюють дві фази – верхню бензинову та нижню спиртову, завдяки чому розділяються компоненти суміші пігментів.

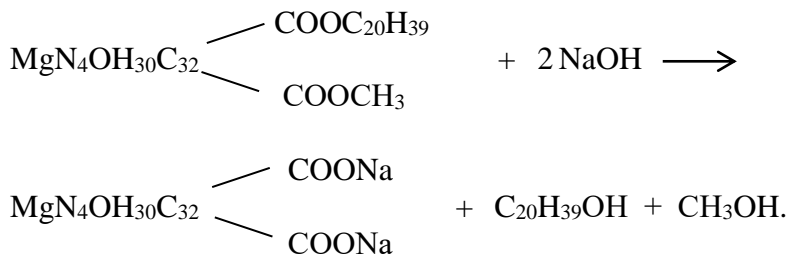
Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, корок, пробірки градуйовані, крапельниця, бензин, етиловий спирт, дистильована вода.

Хід роботи. В пробірку внести 2-3 мл спиртового екстракту пігментів і додати 3-4 мл бензину. Вміст пробірки сильно струсити, попередньо закривши її корком або великим пальцем, і залишити відстоятися. В міру розшарування емульсії бензиновий шар буде забарвлюватися в зелений колір через кращу розчинність у ньому хлорофілів. У бензин переходить також каротин, але його забарвлення маскується забарвленням хлорофілу. Ксантофіл залишається в спиртовому шарі та надає йому золотисто-жовтого забарвлення.

Якщо пігменти розділяються недостатньо чітко, то потрібно додати три-чотири краплі води та знову струсити. За надлишку води можливе помутніння нижнього шару. В цьому випадку варто долити невеликий об'єм етилового спирту та збовтати вміст пробірки.

3. Омилення хлорофілу лугом.

Принцип методу. Діючи на хлорофіл лугом, можна викликати омилення ефірних груп, тобто відщеплення залишків метилового спирту та фітолу



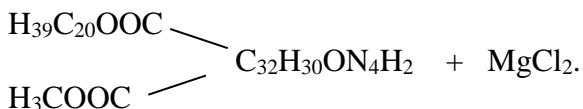
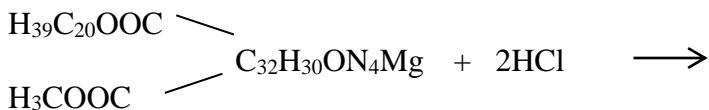
Сіль хлорофілінової кислоти, що утвориться в цій реакції, зберігає зелене забарвлення та оптичні властивості хлорофілу, однак відрізняється від нього більшою гідрофільністю.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, крапельниця, корок, водяна баня, 20%-ий розчин натрій гідроксиду, бензин, дистильована вода.

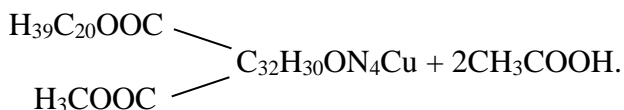
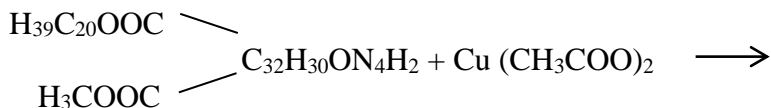
Хід роботи. В пробірку з 2-3 мл спиртового розчину пігментів долити 1 мл розчину натрій гідроксиду та збовтати вміст пробірки. Після змішування екстракту з лугом пробірку поставити на киплячу водяну баню. Як тільки розчин закипить, пробірку вийняти та охолодити. До охолодженого розчину додати 3-4 мл бензину та декілька крапель води для кращого розподілу суміші. Потім вміст пробірки різко струсити та дати відстоятися. В цьому випадку в бензиновий шар переходять каротин і ксантофіл, а в спиртовий – натрієва сіль хлорофілінової кислоти.

4. Одержання феофітину та зворотне заміщення водню атомом металу.

Принцип методу. Атом магнію порівняно слабо утримується в порфіриновому ядрі хлорофілу й за обережної дії сильних кислот легко заміщується двома протонами з утворенням феофітину бурого кольору



Якщо на феофітин діяти солями міді, цинку або ртуті, то замість двох протонів у ядро входить відповідний метал і продукти реакції забарвлюються в зелений колір. Однак, отримане забарвлення трохи відрізняється від забарвлення хлорофілу



Таким чином, колір хлорофілів обумовлений металоорганічним зв'язком у їхніх молекулах. Зворотне введення магнію в феофітин відбувається досить важко.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, крапельниця, корок, водяна баня, 10%-ий розчин хлоридної кислоти, кристали мідь ацетату.

Хід роботи. В дві пробірки внести по 2-3 мл спиртової витяжки пігментів і додати по одній-дві краплі розчину хлоридної кислоти, вміст пробірки збовтати. Під час збовтування зелене забарвлення хлорофілу переходить у буре, що характерне для феофітину. Одну пробірку з феофітином

залишити для контролю, а в другу внести кілька кристалів мідь ацетату та нагріти розчин на водяній бані до кипіння. В міру нагрівання бурий колір розчину змінюється на зелений у результаті утворення хлорофілоподібного похідного міді.

5. Фотосенсibiliзуюча дія хлорофілу на процес переносу водню за Гуревичем

Принцип методу. Сутність світлової фази фотосинтезу полягає в окисненні води до молекулярного кисню з використанням променевої енергії, що поглинається хлорофілом. Електрони, що вивільняються в цьому процесі, передаються на НАДФ⁺, який відновлюється до НАДФ(Н)Н⁺.

Фотоокиснення води та виділення кисню відбувається під час реакцій, які протікають у фотосистемі II, тоді як НАДФ⁺ відновлюється в фотосистемі I. Обидві фотосистеми пов'язані одна з одною послідовністю переносників електронів, які утворюють між ними “міст”, що спрямований ніби “під гору”. В результаті електрони від води проходять Z-подібний шлях. Під впливом індукованого світлом потоку електронів виникає трансмембранний протонний градієнт, унаслідок чого з внутрішньої сторони тилакоїдної мембрани середовище стає більш кислим, ніж із зовнішньої. Подальше повернення іонів Н⁺ із тилакоїда в струму через вмонтовану в мембрані АТФ-азу призводить до утворення АТФ із АДФ і неорганічного фосфату, тобто відбувається фотофосфорилування.

Фотосенсibiliзуюча роль хлорофілу може бути продемонстрована на модельних реакціях із виділенням із рослин пігментом. Для цього як джерело водню беруть аскорбінову кислоту, а як акцептор водню – метиленовий червоний, який, приєднуючи водень, відновлюється до незабарвленої лейкосполуки. Аскорбінова кислота окиснюється в цьому процесі в дегідроаскорбінову кислоту.

Обладнання та реактиви: Ваги технічні, штатив із пробірками, пробірки градузовані, пробірочки градузовані, крапельниця, шпатель, електрична лампочка потужністю 300 Вт, годинник, чорний папір, насичений спиртовий розчин

метиленового червоного, 96%-ий розчин етилового спирту, спиртова витяжка хлорофілу, кристалічна аскорбінова кислота.

Хід роботи. Взяти чотири пробірки: в три з них налити по 5 мл спиртової витяжки хлорофілу, в четверту – 5 мл етилового спирту. В першу, другу та четверту пробірки внести по 50 мг кристалічної аскорбінової кислоти й декілька раз їх струсити. В усі пробірки з хлорофілом додати краплинами відфільтрований спиртовий розчин метиленового червоного до тих пір, поки зелене забарвлення не перейде в червоно-буре. В четвертій пробірці забарвлення розчину за допомогою цього індикатора довести до яскраво-червоного. Другу пробірку закрити чохлам із чорного паперу. Потім усі пробірки поставити в штатив і освітлювати електричною лампочкою (на 300 Вт), розмістивши її на відстані приблизно 15 см від штативу.

Після десяти-п'ятнадцятихвилинного освітлення в першій пробірці в результаті відновлення метиленовий червоний знебарвиться й розчин знову набуде зеленого кольору. В інших пробірках забарвлення розчину не зміниться, оскільки без світла, аскорбінової кислоти або хлорофілу метиленовий червоний не відновлюється. Результати досліду записати в таблицю 19.1.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Поняття про рослинні пігменти, їхній склад, функціональна роль і локалізація в клітині.
2. Загальне поняття про хлорофіли рослин, їхня загальна структура.
3. Хімічна будова хлорофілів *a* і *b*.
4. Загальне поняття про фікобіліни.
5. Каротиноїди, їхній склад, функціональна роль, окремі представники.
6. Основні фізико-хімічні та хімічні властивості рослинних пігментів і їхнє визначення в лабораторних умовах.

7. У чому проявляється фотосенсибілізуюча роль хлорофілу та її демонстрація в лабораторних умовах.

Табл. 19.1. *Визначення фотосенсибілізуючої дії хлорофілу*

варіант	склад суміші в пробірках				умови	результат
	хлорофіл, мл	етиловий спирт, мл	крист. аскорбінова кислота, мг	спирт. розчин метиленового червоного		
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
1	5	-	50	додають до появи червоно-бурого кольору	світло	
2	5	-	50	те саме	темнота	
3	5	-	-	те саме	світло	
4	-	5	50	додають до появи яскраво-червоного кольору	світло	

Інформаційні ресурси:

Біохімія рослин / М. М. Сирий, М. М. Кулешов, Н. М. Гаджиева. Харків : Харківський нац. аграр. ун.-т. ім. В. В. Докучаєва, 2006.

Биохимия. Практикум / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Кобилецька М. С., Терек О. І. Біохімія рослин. Львів : Вид.-во Львівського нац. ун-ту, 2017.

Красільнікова Л. О., Авксентьева О. О., Жмурко В. В. Біохімія рослин. Харків : Вид. група «Основа», 2007.

Основні пігменти рослин: опис та їх роль. URL: <https://what.com.ua/osnovni-pigmenti-roslin-opis/>.

Пігменти пластид. URL: <https://ua.waykun.com/articles/pigmenti-plastid.php>.

Лабораторне заняття № 21-22

Тема: Якісні реакції на вітаміни. Визначення вмісту різних вітамінів у рослинному матеріалі.

Мета заняття: Засвоїти методику якісного та кількісного визначення вмісту окремих груп вітамінів у рослинному матеріалі.

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Вітаміни розглядають як низькомолекулярні, фізіологічно активні органічні сполуки, що є невід'ємними компонентами організму та забезпечують нормальне протікання біохімічних і фізіологічних процесів шляхом участі в регуляції метаболізму.

Багато вітамінів представляють собою вихідний матеріал для біосинтезу коферментів і простетичних груп ферментів. У цьому полягає одна з головних причин необхідності вітамінів для нормального протікання обмінних процесів.

Структура кожного коферментного вітаміну унікальна та, як правило, характеризується наявністю спряжених зв'язків, чітко вираженими електронодонорними або електроноакцепторними властивостями. Ці властивості значно підсилюються, коли вітамін стає коферментом, сполучаючись із металом або апоферментом у результаті входження в активний центр ферменту. Ряд вітамінів самостійно володіє регуляторними функціями, зокрема, бере участь у регуляції проникності мембран, транспорту через них катіонів.

Згідно положень Міжнародної біохімічної номенклатури (1956 р.) вітаміни поділяють на три групи: 1) розчинні у воді; 2) розчинні в жирах; 3) вітаміноподібні сполуки.

В організмі вищих рослин присутні вітаміни в готовій формі або в формі, що легко перетворюється у відповідний вітамін, тобто в формі провітаміну. Нижчі рослини потребують надходження деяких вітамінів із середовища існування.

Із жиророзчинних вітамінів у рослинах знаходяться: провітаміни А, що представляють собою різні каротиноїди (їх особливо багато в коренеплодах моркви, в плодах помідорів і перцю, в листках шпинату); провітаміни D, які представляють собою ергостерин і 7-дегідрохолестерин; вітаміни групи Е або токофероли (найбільше їх міститься в рослинних оліях, особливо в кукурудзяній, бавовниковій, соняшниковій, в олії з пшеничних зародків); вітаміни групи К або хінони (найбільше їх міститься в хлоропластах рослин, особливо в шпинаті, капусті, гарбузі).

Із водорозчинних вітамінів у рослинах знаходяться: вітамін В₁ або тіамін (особливо багато його в бобових рослинах – квасолі, горосі, сочевиці, сої); коферментні форми вітаміну В₂ або рибофлавіну у вигляді ФМН і ФАД (переважають у зернах злаків, в овочах і фруктах); вітамін В₃ або пантотенова кислота (досить багаті на цей вітамін кольорова капуста, картопля, помідори); вітамін В₅ (РР, нікотинова кислота, нікотинамід, ніацин) (цей вітамін досить часто зустрічається в рослинах, особливо багато його в зернових культурах); вітамін В₆ (піридоксин, піридоксаль, піридоксамін) (досить багаті на цей вітамін плодове оболонки зерен злаків); вітамін В_с або фолацин (основним джерелом цього вітаміну є латук посівний, шпинат, капуста, морква, помідори, зелена цибуля); вітамін Н або біотин (найбільше міститься в кінських бобах, оболонці рисових зерен, пшеничному борошні, кольоровій капусті); вітамін С або аскорбінова кислота (є одним із найбільш поширених вітамінів у рослинному світі, особливо багато його в листках і

плодах); вітамін Р, що представляє собою різні біофлавоноїди – катехіни, лейкоантоціани, флавонони, флавоноли, флаволи, антоціани (він широко представлений у рослинах, особливо багато його в чорноплідній горобині, чорній смородині, щавлі, агрусі, темній черешні, персиках); інозитол (представляє собою циклічний шестиатомний спирт циклогексану, що утворюється внаслідок циклізації молекули глюкози, часто зустрічається в рослинах, особливо багато його в кукурудзі, картоплі, зеленому горосі, яблуках, динях, а також у грибах). Із вітаміноподібних речовин у рослинах зустрічаються: вітамін В₁₅ або пангамова кислота, параамінобензойна кислота, вітамін N або ліпоева кислота, вітамін U або метилметіонін, вітамін F, який представляє собою есенціальні поліненасичені жирні кислоти.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

1. Якісні реакції на вітамін К.

Принцип методу. Спиртовий розчин вітаміну К у лужному середовищі з діетилмалоновим ефіром дає червоно-фіолетове забарвлення, а за присутності діетилдитіокарбому в цих умовах утворює сполуку, забарвлену в блакитний колір. За наявності аніліну спиртовий розчин вітаміну К забарвлюється в червоний колір внаслідок утворення 1-метил-2-феніламінафтохінону.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, крапельниця, скляні палички, спиртовий розчин вітаміну К, 0,05%-ий спиртовий розчин вікасолу, 1%-ий розчин діетилмалонового ефіру, 1%-ий розчин калій гідроксиду, 5%-ий розчин діетилдитіокарбому, 4%-ий спиртовий розчин натрій гідроксиду, розчин аніліну.

Хід роботи:

А. Реакція з діетилмалоновим ефіром. У пробірку з 2 мл спиртового розчину вітаміну К додати 0,5 мл розчину діетилмалонового ефіру та 0,1 мл розчину калій гідроксиду. В результаті цього спостерігається поява червоно-фіолетового забарвлення.

Б. Реакція з діетилдитіокарбоматом. У пробірку з 2 мл спиртового розчину вітаміну К додати 2 мл розчину діетилдитіокарбому та 0,5 мл розчину натрій гідроксиду в етанолі. В результаті цього розчин набуває блакитного забарвлення.

В. Реакція з аніліном. У пробірку з 1 мл спиртового розчину вікасолу додати 2 краплі аніліну. Після перемішування вміст пробірки забарвлюється в червоний колір.

2. Якісні реакції на вітамін Е.

Принцип методу. Взаємодія α -токоферолу з концентрованою нітратною кислотою зумовлює забарвлення реакційної суміші в червоний колір. Це обумовлено тим, що продукт окиснення α -токоферолу має хіноїдну структуру. В процесі взаємодії з залізо(III) хлоридом α -токоферол окиснюється до α -токоферилхінону – сполуки, забарвленої в червоний колір.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, крапельниця, пробірки градуйовані, скляна паличка, 0,1%-ий спиртовий розчин α -токоферолу, концентрована нітратна кислота, 1%-ий розчин залізо(III) хлориду.

Хід роботи:

А. Реакція з нітратною кислотою. В суху пробірку внести 5 крапель спиртового розчину α -токоферолу й додати 1 мл концентрованої нітратної кислоти. Пробірку інтенсивно струсити. В результаті цього спостерігається поява червоного забарвлення.

Б. Реакція з залізо(III) хлоридом. У суху пробірку внести 0,5 мл спиртового розчину α -токоферолу та 0,5 мл залізо(III) хлориду. Вміст пробірки добре перемішати скляною паличкою. В результаті реакції спостерігається поява червоного забарвлення.

3. Реакція відновлення вітаміну В₂ (рибофлавіну).

Принцип методу. Водень, який утворюється в результаті додавання металічного цинку до концентрованої хлоридної кислоти, відновлює жовтий рибофлавін спочатку до

родофлавіну (проміжної сполуки) червоного кольору, а потім до безбарвного лейкофлавіну.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, пробірки градуйовані, 0,025%-ий розчин вітаміну В₂ (завись рибофлавіну), концентрована хлоридна кислота, металічний цинк.

Хід роботи. В пробірку внести 1 мл розчину вітаміну В₂, 0,5 мл концентрованої хлоридної кислоти та опустити в неї шматок металічного цинку. Водень, який виділяється в цій реакції, реагує з рибофлавіном і відновлює його. В результаті цього вміст пробірки поступово забарвлюється в рожевий колір, а потім знебарвлюється. В процесі збовтування знебарвленого розчину лейкофлавін знову окиснюється киснем повітря в рибофлавін.

4. Якісні реакції на вітамін С.

Принцип методу. Аскорбінова кислота здатна легко вступати в окисно-відновні реакції та відновлювати 2,6-дихлорфеноліндофенол, калій гексоціано-(III) феррат, срібло нітрат, метиленовий синій. У результаті цього окиснена форма 2,6-дихлорфеноліндофенолу (синій колір) і метиленовий синій відновлюються в безбарвні лейкосполуки, а $K_3Fe(CN)_6$ відновлюється до $K_4Fe(CN)_6$, який із іонами заліза дає сіль $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ синього або зеленого забарвлення.

Обладнання та реактиви: Штатив із пробірками, крапельниці, пробірки градуйовані, термостат, 0,4%-ий розчин аскорбінової кислоти, 0,1%-ий розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу, 10%-ий розчин хлоридної кислоти, 0,01%-ий розчин метиленового синього, 10%-ий розчин натрій карбонату, 1%-ий розчин калій гексоціано-(III) феррату ($K_3Fe(CN)_6$), 1%-ий розчин залізо(III) хлориду, дистильована вода.

Хід роботи:

А. Реакція з 2,6-дихлорфеноліндофенолом. У пробірку внести 0,5 мл розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, 1-2 краплі розчину хлоридної кислоти та краплями розчин аскорбінової

кислоти. В результаті реакції розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу знебарвлюється.

Б. Реакція з метиленовим синім. У дві пробірки внести по одній краплі розчину метиленового синього та по одній краплі розчину натрій карбонату. В першу пробірку прилити 5 крапель розчину аскорбінової кислоти, в другу – 5 крапель води та обидві пробірки поставити в термостат із температурою 37-40° С. Через деякий час рідина в пробірці з розчином аскорбінової кислоти знебарвиться.

В. Реакція з калій гексоціано-(III) ферратом. До 1 мл розчину аскорбінової кислоти додати 1 мл розчину $K_3Fe(CN)_6$ і 0,5 мл розчину залізо(III) хлориду. В результаті цього спостерігається утворення синьо-зеленого забарвлення.

5. Кількісне визначення вмісту вітаміну С за Тільмансом.

Принцип методу. Метод кількісного визначення аскорбінової кислоти ґрунтується на її здатності окиснюватися 2,6-дихлорфеноліндофенолом до дегідроаскорбінової кислоти. За об'ємом 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витраченого на титрування, визначають вміст аскорбінової кислоти в досліджуваному матеріалі. Як тільки весь вміст вітаміну С окисниться, розчин, який титрується, в кислому середовищі набуває рожевого забарвлення внаслідок утворення недисоційованих молекул 2,6-дихлорфеноліндофенолу. В лужному середовищі 2,6-дихлорфеноліндофенол має синє забарвлення, в кислому – червоне, а в процесі відновлення знебарвлюється.

Обладнання та реактиви: Ваги технічні, порцелянова ступка з товчачиком, конічні колби на 50 мл, мікробюретка, піпетки градуйовані, лійка, фільтр, скляні палички, скляний пісок, годинник, 2%-ий розчин хлоридної кислоти, 0,0005 моль/л розчин натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу (молекулярна маса – 290, еквівалентна маса – 145), різні види харчових продуктів (капуста, хвоя, картопля, шипшина).

Хід роботи. Зважити 1 г харчового продукту, ретельно розтерти його в порцеляновій ступці зі скляним піском. До розтертої маси долити 9 мл розчину хлоридної кислоти та відстояти. Через 10 хвилин вміст перемішати та відфільтрувати. Для кількісного визначення взяти 3 мл фільтрату, помістити його в конічну колбу та відтитрувати розчином натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, що не зникає впродовж 30 с. 1 мл 0,0005 моль/л розчину натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти.

Масову частку аскорбінової кислоти $w(C)$ (у %) розрахувати за формулою

$$w(C) = \frac{E \cdot V \cdot V_0}{V_1 \cdot m} \cdot 100\%,$$

де E – маса аскорбінової кислоти (0,088 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,0005 моль/л розчину натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу; V – об'єм 0,0005 моль/л розчину натрієвої солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу, витраченого на титрування, мл; V_0 – загальний об'єм екстракту, мл; V_1 – об'єм екстракту, взятого для титрування, мл; m – маса харчового продукту, мг.

6. Кількісне визначення вмісту вітаміну Р у чаї за Левенталем.

Принцип методу. До речовин, які володіють Р-вітамінною активністю, належать, насамперед, рутин і гесперидин. Подібну активність проявляють катехіни й таніни чайного листка. В рослинах ці сполуки беруть участь в окисно-відновних процесах.

За своєю природою рутин є глікозидом, який складається з залишків рамнози, β -глюкози та флавонону кверцитину. Крім чайного листка, рутин у незначній кількості міститься в

бутонах і квітах софори японської, а також у листках і квітах різних видів гречки.

Метод кількісного визначення рутину ґрунтується на його здатності окиснюватися калій перманганатом; як індикатор використовують індигокармін, який вступає в реакцію з KMnO_4 після того, як окисниться весь рутин. Експериментально встановлено, що 1 мл 0,02 моль/л розчину калій перманганату окиснює 6,4 мкг рутину.

Обладнання та реактиви: Ваги технічні, мікробюретка, крапельниця, піпетки градузовані, хімічні стаканчики або колбочки, годинник, електрична плитка, 0,01 моль/л розчин калій перманганату (KMnO_4), індикатор індигокармін (1 г індигокарміну розтерти в фарфоровій ступці, розчинити в 50 мл концентрованої сульфатної кислоти та залити водою до об'єму 1 л; потім суміш відфільтрувати та зберігати в темній посудині), дистильована вода, чай або готовий екстракт.

Хід роботи. Наважку чаю масою 100 мг помістити в колбочку, залити 50 мл гарячої дистильованої води та кип'ятити впродовж 5 хвилин. Отриманий екстракт охолодити, відібрати 10 мл і перенести в іншу колбочку або хімічний стаканчик, куди долити ще 10 мл дистильованої води та 5 крапель індигокарміну (в результаті цього з'являється синє забарвлення). Ретельно перемішуючи рідину в колбочці, вміст її відтитрувати розчином KMnO_4 до появи стійкого жовтого забарвлення. Паралельно провести титрування контрольного розчину, де замість екстракту в колбочку внести 10 мл дистильованої води. Різниця між дослідним і контрольним титруванням представляє собою число мілілітрів 0,01 моль/л розчину KMnO_4 , що витратився на окиснення рутину.

Вміст вітаміну Р $w(\text{P})$ (в мкг) розрахувати за формулою

$$w(\text{P}) = \frac{q \cdot V \cdot V_0}{V_1 \cdot m},$$

де q – стандартний перерахунковий коефіцієнт титрування (3,2); V – об'єм 0,01 моль/л розчину $KMnO_4$, витраченого на титрування, мл; V_0 – об'єм вихідного розчину, в якому розчинена взята для аналізу наважка, мл; V_1 – об'єм розчину, взятого для титрування, мл; m – маса сухої речовини, взятої для аналізу, г.

ПИТАННЯ ДЛЯ САМОПЕРЕВІРКИ

1. Поняття про вітаміни, їхня класифікація.
2. Загальна біохімічна та фізіологічна роль вітамінів. Вітаміни як коферменти.
3. Поширення та форми знаходження вітамінів у рослинах.
4. Загальна характеристика жиророзчинних вітамінів (хімічна будова, біохімічна роль, поширення в рослинах).
5. Загальна характеристика водорозчинних вітамінів (хімічна будова, біохімічна роль, поширення в рослинах).
6. Найважливіші вітаміноподібні сполуки.
7. Якісні реакції на окремі вітаміни.
8. Принцип кількісного визначення вмісту вітаміну С у рослинному матеріалі.
9. Принцип кількісного визначення вмісту вітаміну Р у рослинному матеріалі.

Інформаційні ресурси:

Біохімія рослин / М. М. Сирий, М. М. Кулешов, Н. М. Гаджиева. Харків : Харківський нац. аграр. ун.-т. ім. В. В. Докучаєва, 2006.

Биологическая химия. Практикум / под. ред. Ю. Е. Хмелевского. Киев : Выща школа, 1985.

Биохимия. Практикум / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Боечко Ф. Ф. Біологічна хімія. Київ : Вища школа, 1995.

Кобилецька М. С., Терек О. І. Біохімія рослин. Львів : Вид.-во Львівського нац. ун-ту, 2017.

Красільнікова Л. О., Авксентьєва О. О., Жмурко В. В. Біохімія рослин. Харків : Вид. група «Основа», 2007.

Лекція - Біохімія рослин. Вітаміни. URL: <https://uadoc.zavantag.com/text/30013/index-1.html>.

Фізіологічна роль вітамінів у життєдіяльності рослин. URL: <https://kazedu.com/referat/168816/1>.

ЗАГАЛЬНИЙ СПИСОК ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ

Биологическая химия. Практикум / под. ред. Ю. Е. Хмелевского. Киев : Выща школа, 1985.

Біохімія рослин / М. М. Сирий, М. М. Кулешов, Н. М. Гаджисва. Харків : Харківський нац. аграр. ун.-т. ім. В. В. Докучаєва, 2006.

Биохимия / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Биохимия. Практикум / Н. Е. Кучеренко и др. Киев : Выща школа, 1988.

Боднарюк Ф. М. Органічна хімія. Рівне : НУВГП, 2002.

Боечко Ф. Ф. Біологічна хімія. Київ : Вища школа, 1995.

Володимирець В. О. Біохімія рослин. Інтерактивний комплекс навчально-методичного забезпечення. Рівне : НУВГП, 2006.

Гребинский С. О. Биохимия растений. Львов : Выща школа, 1975.

Кобилецька М. С., Терек О. І. Біохімія рослин. Львів : Вид.-во Львівського нац. ун-ту, 2017.

Красільнікова Л. О., Авксентьева О. О., Жмурко В. В. Біохімія рослин. Харків : Вид. група «Основа», 2007.

Кретович В. Л. Биохимия растений. Москва : Высш. школа, 1986.

Черних В. П., Зіменковський Б. С., Гриценко І. С. Органічна хімія. Харків : Вид.-во НФаУ, 2008.

Чирва В. Я. та ін. Органічна хімія. Львів : БаК, 2009.