Національний університет
водного господарства
та природокористування

Міністерство освіти і науки України
Національний університет водного господарства та природокористування

Кафедра хімії та фізики

05-06-19

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до виконання лабораторних робіт з курсу **„Хімія з основами біогеохімії” (тематичний розділ „Основи біогеохімії”)** для студентів за напрямами підготовки 6.040106 „Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування” та 6.090101 „Агрономія” денної та заочної форм навчання

Рекомендовано методичними комісіями за напрямами підготовки 6.040106 „Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування”, протокол № 2 від 15.10.2013 р.; 6.090101 «Агрономія», протокол № 2 від 11.10.2013 р.

Рівне – 2013 р.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу „Хімія з основами біогеохімії” (тематичний розділ „Основи біогеохімії”) для студентів за напрямами підготовки 6.040106 „Екологія, охорона навколишнього середовища та збалансоване природокористування” та 6.090101 „Агрономія” денної та заочної форм навчання/ М.В.Яцков, О.І.Мисіна, - Рівне: НУВГП, 2013, - 20 с.

Упорядники: М.В.Яцков, завідувач кафедри хімії та фізики;
О.І.Мисіна, ст.викладач кафедри хімії та фізики

Відповідальний за випуск: М.В.Яцков, канд.техн.наук,
завідувач кафедри хімії та фізики

Національний університет
водного господарства
та природокористування

© М.В.Яцков,
О.І.Мисіна, 2013
© НУВГП, 2013

Національний університет
водного господарства
та природокористування

З М І С Т

Стор.

ПЕРЕДМОВА……..……..…....…4

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1. Визначення відносної молекулярної маси амінокислот за амінним Нітрогеном.....5
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2. Реакція осадження білків.....7
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3. Якісні реакції на амінокислоти і білки.....12
ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4. Якісне визначення вітаміну *Р* в рослинному матеріалі.....17

Національний університет
водного господарства
та природокористування

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Васильєв О.М. та ін. Біохімія. – К., 1998.
2. Алейнікова Т.Л., Рубцова Г.В. Біохімія: керівництво для практичних занять. – М., 1988.
3. Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д., Васильєв О.М. та ін. Біохімія: практикум. – К., 1988.
4. Березін І.В., Савін Ю.В. Основи біохімії. – М., 1990.
5. Стеценко О.В., Виноградова Р.П. Біоорганічна хімія. – К., 1992.
6. Проскуріна І.К. Біохімія. – М., 2004.
7. Шевряков М.В., Яковенко Б.В., Явоненко О.Ф. Практикум з біологічної хімії. – Суми, 2003.
8. Ісаєнко В.М., Войціцький В.М., Бабенюк Ю.Д. та ін. Екологічна біохімія. – К., 2005.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

ПЕРЕДМОВА

Лабораторні роботи з тематичного розділу „Основи біогеохімії” навчальної дисципліни „Хімія з основами біогеохімії” максимально наближені до майбутньої спеціальності студентів, охоплюють основні розділи біохімії і спрямовані на більш поглиблене засвоєння знань.

В процесі виконання лабораторної роботи студенти повинні закріпити теоретичні знання з даного розділу програми, навчитися працювати з лабораторним посудом та приладами. Робота в лабораторії вимагає осмислення теоретичного матеріалу, з якими пов’язані досліди, тому студент повинен вивчити теоретичний матеріал з теми лабораторної роботи, який наведений у теоретичному вступі до кожної роботи. Обов’язкові знання студентів з правил техніки безпеки при роботі з приладами і відповідними реактивами, без чого не можна починати практичну частину роботи. Лабораторна робота з відповідним оформленням в зошиті подається у вигляді звіту для захисту.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1.
ВИЗНАЧЕННЯ ВІДНОСНОЇ МОЛЕКУЛЯРНОЇ МАСИ АМІНОКИСЛОТ ЗА АМІННИМ НІТРОГЕНОМ

Мета і завдання роботи:

- сформувати вміння визначати сумарну кількість амінокислот у біологічних системах і білковому гідролізаті шляхом утворення мідного комплексу амінокислот, розраховувати відносну молекулярну масу амінокислоти за вмістом амінного Нітрогену.

Знання і вміння, які повинні отримати студенти:

- знання про можливість визначати амінний Нітроген мідним способом, суть хімічних реакцій, що лежать в основі метода, умови їх перебігу і фактори, що впливають на ці реакції;
- навички переводити амінокислоти в комплексні сполуки Купруму, виділяти їх і визначати вміст амінокислот йодометричним титруванням;
- розраховувати відносні молекулярні маси амінокислот за вмістом амінного Нітрогену.

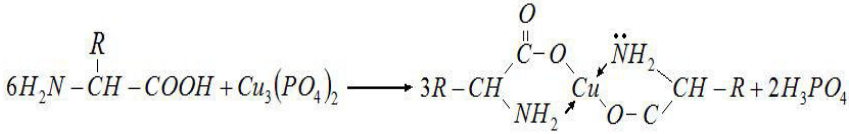
Хід роботи. У мірну колбу (25 см^3) вносять 2 см^3 досліджуваного розчину амінокислоти (w = 1%), додають 2 краплини тимолфталеїну і по краплях розчин натрій гідроксиду (C=*0,5* моль/дм^3) до блідо-блакитного забарвлення (pH розчину – 10,2). Потім додають у колбу суспензію купрум(II) фосфату. Суспензія спочатку розчиняється, бо Купрум використовується на утворення в лужному середовищі розчинного мідного комплексу амінокислоти синьо-фіолетового кольору. Оскільки вміст амінокислоти в розчині невідомий, то додають надлишок суспензії купрум(II) фосфату. Вміст колби доводять водою до мітки, старанно перемішують перевертанням колби і відфільтровують надлишок купрум(II) фосфату крізь цільний фільтр.

Фільтрат має бути абсолютно прозорим. Цього можна досягнути багаторазовим фільтруванням. З фільтрату піпеткою відбирають дві проби по 10 см^3 в конічні колби на 50 см^3 для титрування, підкислюють близько 0,4 см^3 льодяної ацетатної кислоти до зникнення синього забарвлення мідного комплексу, додають 6-8 см^3 розчину *KI* з w=10% і йод, що виділився, титрують розчином $Na_2S_2O_3$ ($C(1/2)$ = *0,01* моль/дм^3). Індикатор крохмаль додають до розчину тоді, коли більша частина йоду вже відтитрована і розчин набув солом'яно-жовтого забарвлення.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Проводять контрольне визначення, у якому замість розчину амінокислоти беруть воду. Об'єм розчину $Na_2S_2O_3$, що витрачався на контрольний розчин, віднімається від його об'єму в досліді.

Хімізм процесу. При взаємодії амінокислоти з суспензією купрум(II) фосфату утворюється забарвлена в синій колір добре розчинна комплексна мідна сіль амінокислоти:



Фосфатна кислота зв'язується боратним буфером, і реакція відбувається до кінця. У фільтраті після відділення надлишку купрум(II) фосфату залишаються лише мідні солі амінокислот (за винятком цистину, мідна сіль якого нерозчинна). Отже, за кількістю Купруму, що ввійшов до складу комплексу, можна визначити вміст амінокислот. При додаванні до розчину мідного комплексу амінокислот концентрованої ацетатної кислоти цей комплекс руйнується і в розчині з'являються йони купруму (Cu^{2+}), вміст яких визначають йодометрією:

$$2Cu^{2+} + 4I^- \rightarrow Cu_2I_2 + I_2 ,$$
$$2Na_2S_2O_3 + I_2 \rightarrow 2NaI + Na_2S_4O_6 .$$

За рівнянням реакції 0,5 моль йоду, що виділився, відповідає 1 моль Купруму, який у свою чергу еквівалентний 28 г амінного Нітрогену. Титр робочого розчину $Na_2S_2O_3$ за визначуваною речовиною, становитиме:

$$\frac{T(Na_2S_2O_3)}{N\ (амінний)} = 0{,}28 мг/см^3 .$$

Усі дані зводять у єдину формулу:

$$m(N_{амінного}) = \frac{V_1 T V_3}{V_2},$$

де V_1 – об'єм розчину $Na_2S_2O_3$ ($C(1/2) = 0{,}01$ моль/дм^3), що пішов на титрування, см^3; V_2 – аліквотний об'єм розчину комплексної мідної солі амінокислоти, см^3; V_3 – загальний об'єм розчину комплексної мідної солі амінокислоти, см^3.

Для розрахунку молярної маси амінокислоти за амінним Нітрогеном слід застосувати співвідношення:

Національний університет
водного господарства
та природокористування

$$\frac{m(амінокислоти)}{m(N_{амінокислоти})} = \frac{M(амінокислтти)}{M(N_{амінного})},$$

$$M(амінокислоти) = \frac{m(амінокислоти) \cdot M(N_{амінного})}{m(N_{амінного})}.$$

Масу взятої для дослідження амінокислоти визначають за формулою:

$$M = V \cdot d \cdot w,$$

де m – маса амінокислоти, г; V – об'єм розчину амінокислоти, см^3; d – густина розчину, г/см^3; w – масова частка амінокислоти в розчині.

В умовах даної роботи d можна прийняти за 1. Звідси:

$$M(амінокислоти) = \frac{V \cdot d \cdot M(N_{амінного}) \cdot V_2 \cdot w}{V_1 \cdot V_3 \cdot T}, г/моль.$$

Особливі умови: необхідно знати кількість атомів амінного Нітрогену в молекулі амінокислоти, яка досліджується.

Після проведення дослідження студент подає викладачу оформлений лабораторний журнал і називає значення визначеної відносної молекулярної маси амінокислоти.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Контрольні завдання

1. Амінокислоти кількісно визначають за реакцією з нінгідрином, вимірюючи об'єм CO_2, що виділився в результаті реакції. Розрахуйте кількість молей карбону (IV) оксиду, що утворився в результаті реакції нінгідрину з 0,1г фенілаланіну. Знайдіть об'єм CO_2, що утворився в результаті реакції з нінгідрином, $1 \cdot 10^{-4}$ моль амінокислоти (температура – 25^{0}С, тиск – 985,5 г Па).

2. Білок містить 0,58% триптофану. Яка мінімальна відносна молекулярна маса цього білка?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2.
РЕАКЦІЯ ОСАДЖЕННЯ БІЛКІВ

Мета і завдання роботи:

- провести реакції осадження білків методом висолювання, при нагріванні, при дії мінеральних і органічних кислот, осадження солями важких металів, фенолами, альдегідами, спиртом тощо;
- з'ясувати механізм зворотного і незворотного осадження білків.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Знання і вміння, які повинні отримати студенти:

- знання способів осадження білків без порушення їх нативності, а також осадження при денатурації;
- виявити дію на білок кислот-окисників і кислот, що не є сильними окисниками;
- знати дію на білок йонів важких металів і практично визначити різницю у денатуруючій дії цих йонів різних хімічних елементів;
- вміти підібрати той чи інший спосіб осадження білків залежно від завдань досліджень з метою їх – виділення з біологічного матеріалу і розділення.

Висолювання білків. У водному розчині білкові молекули заряджені і гідратовані, що забезпечує стійкість білкових розчинів. При високій концентрації солей, йони яких теж, гідратовані, відбувається руйнування водних оболонок білкових молекул. Крім того, йони солей адсорбуються на поверхні білкової молекули, внаслідок чого зменшується заряд молекули білка, частинки білка менше відштовхуються, злипаються, випадають в осад.

Амоній сульфат має різко виражену висолюючу здатність і осаджує білки в нейтральному середовищі, а ще краще – у слабо кислому. Інші солі, наприклад натрій хлорид, осаджують білки лише при підкисненні розчину.

Для висолювання різних білків потрібна різна концентрація одних і тих же солей. Отже, білки можна висолювати фракційно. Так, глобуліни випадають в осад при напівнасичені розчину амоній сульфатом, а альбуміни осаджуються при повному насиченні.

Хід процесів висолювання білків. Наливають у пробірку 1,5-2,0 $см^3$ розчину білка, додають рівний об’єм насиченого розчину амоній сульфату і струшують суміш. З’являється помутніння від утвореного осаду глобулінів. Слід звернути увагу на те, щоб розчин амоній сульфату був дійсно насичений, тобто на дні посудини з розчином був осад.

Мутну рідину фільтрують крізь складчастий фільтр. Частину прозорого фільтрату нагрівають до кипіння і спостерігають згортання альбумінів, що знаходились у розчині. До іншої частини фільтрату додають при перемішуванні надлишок амоній сульфату у вигляді порошку до припинення його розчинення. З’являється помутніння, альбуміни випадають в осад.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Осадження білків солями лужних металів і амонію є оборотним процесом. При додаванні води білки знову розчиняються.

Згортання білків при нагріванні. У п’ять пробірок наливають по 2 $см^3$ розчину білка.

1. Нагрівають вміст першої пробірки. Осад білка з'являється ще до того, як рідина закипить.
2. Додають до другої пробірки одну краплину розчину ацетатної кислоти (w=1%) і нагрівають. Осад випадає швидше внаслідок того, що при підкисненні pH розчину наближається до ізоелектричної точки білка.
3. У третю пробірку додають близько 0,5 $см^3$ розчину ацетатної кислоти (w=10%) і нагрівають. Осад білка не утворюється навіть при кип’ятінні.

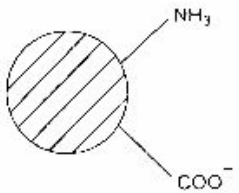
У даному випадку надлишок ацетатної кислоти призводить до перезарядки молекул білка, молекули отримують позитивний заряд, взаємно відштовхуються, і осад не утворюється.

4. У четверту пробірку додають 0,5 $см^3$ розчину ацетатної кислоти (w=10%), декілька крапель насиченого розчину натрій хлориду і нагрівають. Утворюється осад білка.
5. У п'яту пробірку вносять близько 0,5 $см^3$ розчину натрій гідроксиду і нагрівають. Осад білка не утворюється навіть при кипінні.

Причина полягає в тому, що досліджуваний білок кислий і молекули його мають заряд (-), а pI<7,0. Якщо pH середовища більше від значення ізоелектричної точки білка, то білкові молекули матимуть негативний заряд (-). Отже, лужне середовище буде перешкоджати досягненню кислим білком ізоелектричного стану (pH<7,0), і білок не випадатиме в осад.

Сильно кисле середовище теж стимулюватиме досягнення білком ізоелетричного стану, особливо для основних білків, у яких pI>7,0.

Білки як амфотерні електроліти дисоціюють як кислоти і як основи. У водному середовищі, особливо поблизу ізоелектричної точки, молекули білка є біполярними йонами:



Національний університет
водного господарства
та природокористування

У кислому середовищі зменшується дисоціація білка по карбоксильних групах, молекула отримує позитивний заряд і знаходиться в розчині навіть при кип'ятінні.

У лужному середовищі зменшується протонізація аміногруп білка, молекули отримують негативний заряд і залишаються у розчині навіть при кип'ятінні.

Додавання до розчину білка нейтральних солей полегшує і прискорює згортання білків при кип'ятінні внаслідок дегідратації. Згортання білків при нагріванні відбувається внаслідок їх денатурації – порушення четвертинної, третинної, вторинної структури молекул – і є процесом практично незворотним.

Осадження білків концентрованими мінеральними кислотами. У три пробірки наливають по 1-2 $см^3$ концентрованих нітратної, сульфатної і хлоридної кислот. Потім, нахиливши кожну пробірку, по стінці доливають до неї з піпетки по 0,5 $см^3$ досліджуваного розчину білка так, щоб він не змішувався з кислотою. На межі двох рідин з'являється білий аморфний осад білка. При струшуванні осад, що утворився при дії хлоридної і сульфатної кислот, розчиняється у їх надлишку. Розчинення осаду білка у надлишку хлоридної кислоти пояснюється тим, що відбувається перезарядка білкової молекули і перехід із ізоелектричного стану (при $pH<pI$) у стан з позитивним зарядом білкової молекули.

Збільшення осаду білка в надлишку нітратної кислоти відбувається внаслідок процесів нітрування ароматичних амінокислот білка і зшивання поліпептидних ланцюгів за рахунок продуктів реакції. У надлишку концентрованої сульфатної кислоти руйнуються молекули білка до найпростіших низькомолекулярних сполук, які не дають осаду.

Осадження білків органічними кислотами. У дві пробірки наливають по 2-3 $см^3$ розчину білка і додають в одну з них декілька крапель розчину трихлорацетатної кислоти (w=5%), у другу – декілька крапель розчину сульфосаліцилової кислоти (w=20%). В обох випадках випадають осади білка.

Сульфосаліцилова і трихлорацетатна кислоти є чутливими й специфічними реактивами на білок. Трихлорацетатна кислота осаджує тільки білки і не осаджує продуктів розкладу білка і амінокислот, її використовують для повного вилучення білків з біологічних рідин.

Національний університет водного господарства та природокористування

Осадження білків солями важких металів. У дві пробірки наливають по 1-2 $см^3$ досліджуваного розчину білка і повільно, краплинами при струшуванні додають в одну з них розчин купрум(II) сульфату, а в іншу – розчин плюмбум(II) ацетату. Випадають пластівчасті осади із сіллю Купруму – блакитного кольору, із сіллю Плюмбуму – білого кольору.

Солі важких металів необоротно осаджують білки внаслідок зшивання поліпептидних ланцюгів багатовалентними атомами металів. Тому білки застосовують при отруєнні солями важких металів. Деякі з таких осадів (наприклад, із солями Купруму, Плюмбуму, Цинку) розчиняються у надлишку солі внаслідок адсорбції йонів цих металів на поверхні білкових частинок, у результаті цього білкові частинки набувають заряду і переходять у розчин.

Розчинення осадів денатурованих білків у надлишку солі важких металів називається адсорбційною пептизацією. Такі явища вивчає колоїдна хімія.

Осадження білків фенолом і формальдегідом. У дві пробірки вносять по 1-2 $см^3$ розчину білка, додають: у першу – рівний об'єм насиченого водного розчину фенолу, а в другу – рівний об'єм розчину формальдегіду (w=40%). В обох пробірках випадає осад білка. Утворення осаду при дії на білок формальдегіду пояснюється взаємодією його з ароматичними амінокислотами білка з утворенням нерозчинних сполук типу феноло-формальдегідних смол.

Осадження білків спиртом. У пробірку наливають 1-1,5 $см^3$ розчину білка і додають трохи кристалічного натрій хлориду. Доливають поступово 5-6 $см^3$ етилового спирту. Випадає пластинчастий осад білка внаслідок дегідратації молекул при додаванні спирту.

Осадження білків натрій вольфраматом. До 3 $см^3$ розчину білка додають 0,5 $см^3$ розчину сульфатної кислоти ($C(1/2)$ = 0,66 $моль/дм^3$) і після перемішування 0,5 $см^3$ розчину натрій вольфрамату (w=10%). Випадає осад. Натрій вольфрамат дуже добре осаджує білки і часто застосовується для вилучення їх з біологічних рідин і екстрактів.

Контрольні завдання

Білкова частина вірусу тютюнової мозаїки складається з 2130 субодиниць, молекулярна маса – 17500. Розрахуйте загальну

Національний університет водного господарства та природокористування

довжину всіх поліпептидних ланцюгів, якщо частка спіральної конфігурації в них дорівнює 30%.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3.
ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА АМІНОКИСЛОТИ І БІЛКИ

Мета і завдання роботи:

- провести якісні реакції на амінокислоти і білки: біуретову, нінгідринову, ксантопротеїнову, нітропрусидну та реакції Адамкевича та Паулі.

Знання і вміння, які повинні отримати студенти:

- знати різні якісні реакції на амінокислоти і білки;
- вміння підбирати та проводити ту чи іншу якісну реакцію на амінокислоти і білки залежно від завдань досліджень з метою їх виявлення.

Національний університет водного господарства та природокористування

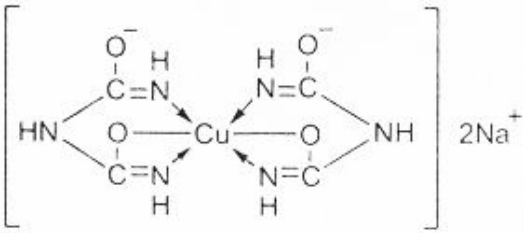
Характеристика реакцій та хід роботи

1. Біуретова реакція становить процес виникнення мідного комплексу, забарвленого в рожево-фіолетовий колір, при взаємодії пептидів і білків з купрум(II) гідроксидом у лужному середовищі. Ця реакція не є специфічною, бо подібний комплекс утворюють не тільки пептиди і білки, а й біурет:

$$H_2N-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-\underset{\underset{H}{|}}{N}-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-NH_2 \quad , \text{ який теж має зв'язок } \quad -\underset{\underset{O}{\|}}{C}-\underset{\underset{H}{|}}{N}-$$

Саме тому реакція отримала назву біуретової. Правильно було б сказати, що це реакція утворення пептидами і білками мідного комплексу – такого ж, як і з біуретом.

Мідний комплекс біурету

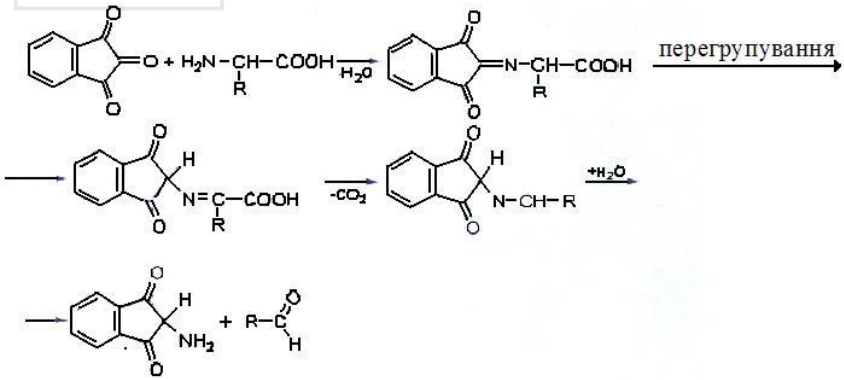


Національний університет
водного господарства
та природокористування

Хід роботи. До 1-2 см^3 розведеного розчину білка додають подвійний об'єм розчину натрій гідроксиду (w = 30%), добре перемішують і вносять за допомогою скляної палички декілька крапель розчину купрум(II) сульфату (w = 1%). Знову ретельно перемішують. З'являється рожево-фіолетове забарвлення. Якщо було внесено велику кількість розчину купрум(II) сульфату, то надлишок купрум(II) гідроксиду, що при цьому утвориться, маскуватиме рожево-фіолетове забарвлення мідного комплексу білка, весь розчин набуде синього кольору.

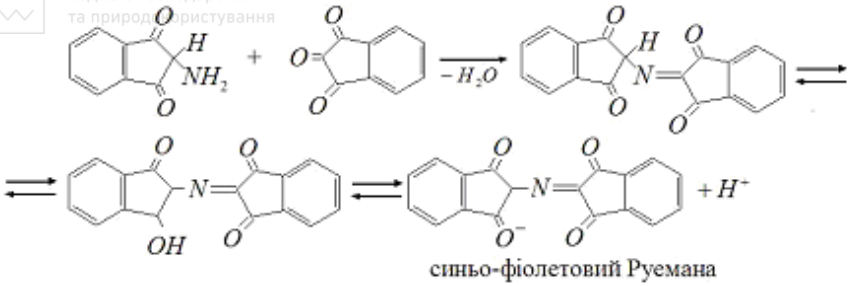
2. Нінгідринова реакція – це реакція ароматичного трикетону нінгідрину з речовинами, що мають вільні аміногрупи. Амінокислоти, пептиди і білки мають такі вільні аміногрупи і при взаємодії з нінгідрином утворюють барвник Руемана синьо-фіолетового кольору. Як і біуретова, нінгідринова реакція не є специфічною на амінокислоти, пептиди і білки. Будь-які речовини, що містять вільну аміногрупу, в тому числі амоніак, дають позитивну реакцію. У нуклеїнових кислот теж така реакція. Тому говорять про нінгідринпозитивні речовини.

Взаємодія нінгідрину з амінокислотою:



амінодекетогідринден

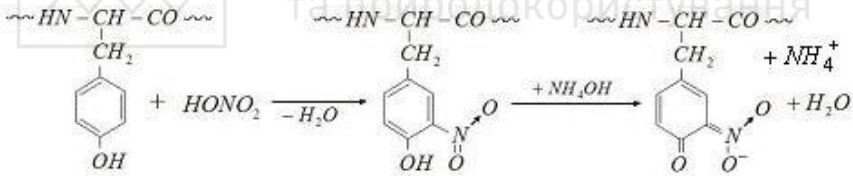
Національний університет
водного господарства
та природокористування



Хід роботи. До 2-3 см^3 розведеного розчину білка додають розчин нінгідрину (w=1%) в ацетоні (w=95%). Перемішують і нагрівають на киплячій водяній бані при 70^{0}С 15-20 хвилин. Встановлюється синьо-фіолетове забарвлення.

3. Ксантопротеїнова реакція – це реакція нітрування ароматичних амінокислот у складі пептидів і білків, у результаті якої утворюються нітропохідні жовтого кольору. Реакція не специфічна, бо нітропохідні вільних ароматичних вуглеводнів теж мають таке забарвлення.

Національний університет
водного господарства
та природокористування



Хід роботи. До 2-3 см^3 розведеного розчину білка додають 5-6 крапель концентрованої нітратної кислоти до появи білого осаду або помутніння, нагрівають на киплячій водяній бані. При цьому осад і розчин забарвлюються у жовтий колір, осад потім майже повністю розчиняється.

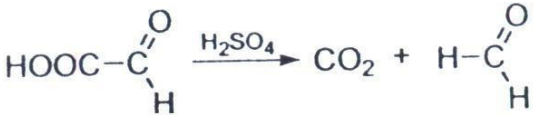
Охолоджують суміш, не перемішуючи, додають краплинами до кислого розчину надлишок концентрованого розчину амоніаку або лугу до лужної реакції середовища. Вміст забарвлюється в яскраво-оранжевий колір.

4. Реакція Адамкевича – це реакція на амінокислоту триптофан з гліоксалевою кислотою, у результаті якої відбувається конденсація двох залишків триптофану з утворенням сполуки, що має довгий

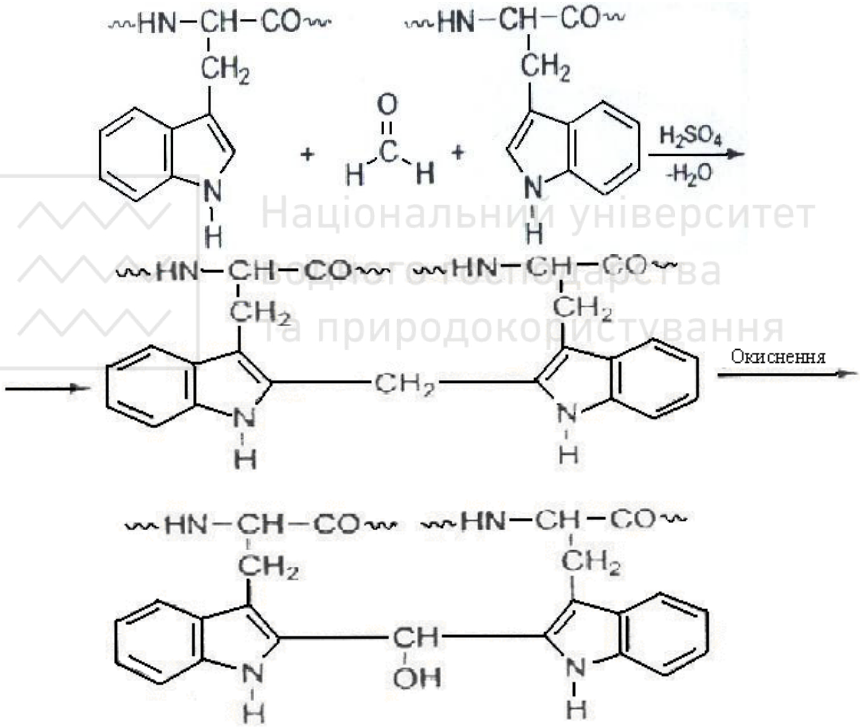
Національний університет
водного господарства
та природокористування

ланцюг спряжених подвійних зв'язків, який зумовлює виникнення червоно-фіолетового забарвлення.

Гліоксалева кислота за участі концентрованої сульфатної кислоти декарбоксилюється:



Утворений формальдегід вступає в реакцію конденсації з двома залишками триптофану у складі білка:



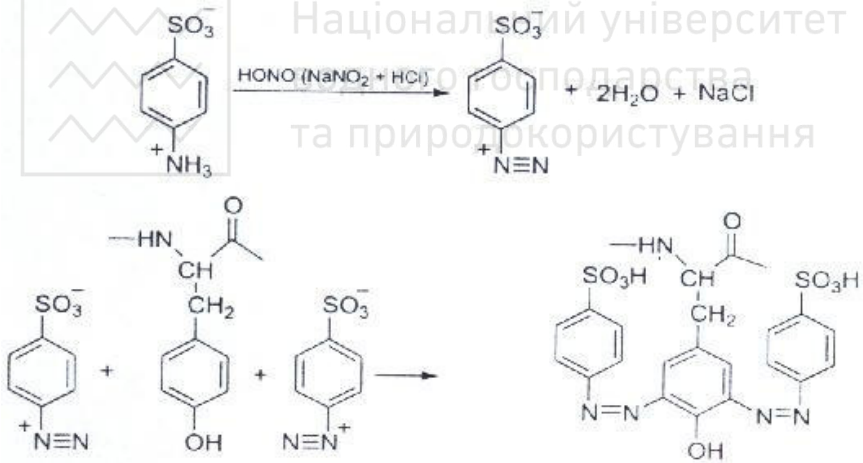
Хід роботи. У пробірку вносять приблизно 0,5 см^3 нерозведеного білка, додають 2 см^3 льодяної ацетатної кислоти, до якої внесено трохи гліоксалевої кислоти. Суміш нагрівають до розчинення осаду, який утворився. Охолоджують пробірку із сумішшю, а потім, нахиливши її, обережно по стінці приливають до 1 см^3 концентрованої сульфатної кислоти так, щоб рідини не змішалися, а

Національний університет водного господарства та природокористування

утворили два шари. На межі двох рідин з'являється червоно-фіолетове кільце.

5. Реакція Паулі – це реакція азосполучення n-сульфофенілдіазоній хлориду з ароматичними амінокислотами - як вільними, так і в складі пептидів і білків. Спочатку проводять на холоді діазотування сульфанілової кислоти, а потім реакцію азосполучення з ароматичними амінокислотами у складі білків. З'являється оранжево-червоне забарвлення в результаті утворення азобарвника.

Хід роботи. До 1 см^3 розчину сульфанілової кислоти (w = 1%) в розчині хлоридної кислоти (w = 5%) додають 2 см^3 розчину натрій нітриту (w = 0,5%), ретельно перемішують і додають спочатку 2 см^3 розведеного розчину білка, а потім (після перемішування вмісту пробірки) 6 см^3 розчину натрій карбонату (w = 10%), знову перемішують. З'являється вишнево-червоне забарвлення.



6. Нітропрусидна реакція – це реакція на амінокислоту цистеїн, що містить сульфгідрильну групу – *SH*. При взаємодії натрій нітропрусиду зі сполуками, що містять – *SH*-групу, або S^{2-}, з'являється пурпурове забарвлення. Ця реакція на білки теж не специфічна.

Хід роботи. У пробірку вносять 1-2 см^3 розведеного білка, додають рівний об'єм насиченого розчину амоній сульфату і 2-3

Національний університет
водного господарства
та природокористування

краплини розчину натрій нітропрусиду (w = 5%). Потім вносять декілька крапель концентрованого розчину амоніаку.

$$Na_2[Fe(CN)_5NO] + HS-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH \rightarrow NH_4OH +$$

$$+Na_2\left[Fe(CN)_5 \quad \overset{\displaystyle O}{\overset{||}{\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{S}}}} -CH_2- \underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}} -COOH\right]$$

Якщо в білку є цистеїн, то відбувається реакція, у результаті якої з'являється пурпурове забарвлення.

Загалом слід зазначити, що специфічних реакцій на білки немає, і тому для ідентифікації білків застосовується декілька реакцій.

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4.
ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ *P* В РОСЛИННОМУ МАТЕРІАЛІ

Мета і завдання роботи:

- освоїти методику кількісного визначення вітаміну *P* в рослинному матеріалі перманганатометричним титруванням;
- визначити фізіологічні межі його в різних рослинах;
- поглибити знання про фізіологічну роль рутину.

Знання і вміння, які повинні отримати студенти:

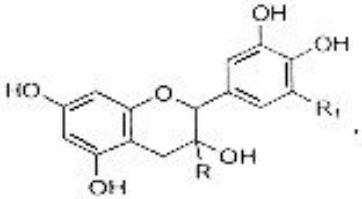
- знання про різні форми вітаміну, поширеність у рослинному світі, біологічну дію;
- вміння кількісно визначати вміст вітаміну у рослинному матеріалі, фізіологічні межі рутину в досліджуваному об'єкті.

Загальні відомості про вітамін *P*

Вітамін *P* об'єднує групу речовин – флавононів, які обумовлюють забарвлення рослин: еридиктіол, гесперидин, кверцетин, рутин. А.Сент-Дьордьї відкрив вітамін як фактор стійкості капілярів.

Національний університет
водного господарства
та природокористування

Флавоноїдні сполуки, що містяться в рослинах, можуть бути у вільному стані та у вигляді глікозидів. Із сполук, що містяться у вільному стані, найбільшу *P*-вітамінну активність виявляють катехіни:



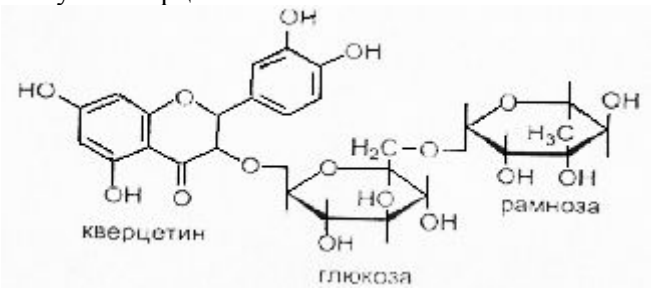
де *R* і R_1-*H* або *OH*.

Катехіни легко окиснюються, у значних кількостях містяться в яблуках, грушах, вишнях, винограді, смородині, суницях. У найбільшій кількості (до 20%) катехіни містяться в чайному листі.

Із флавоноїдних сполук, що часто містяться в плодах, ягодах та інших органах рослин у вигляд глікозидів, найбільше значення мають гесперидин і рутин.

Гесперидин являє собою глікозид, побудований із залишків рамнози, *β*-глюкози і аглікона гесперетина:

Рутин побудований із залишків рамнози, *β*-глюкози, а в ролі аглікона виступає кверцетин:



Рутин уперше був виділений в 1842 році в напівчагарниковій рослини родини рутових (Ruta graveolens), звідки й дістав назву.

Національний університет водного господарства та природокористування

Пізніше він був виділений із зеленої маси гречки, де його вміст може досягати 1,5-6,0% на суху речовину. Рутин є також у листях Eucaliptus masror (близько 24 %) і в листях китайського дерева Sophorica japonica (близько 44,5%). Будову рутину встановив А.Перкін у 1927 році.

Гесперидин і рутин мають досить високу *Р*-вітамінну активність.

Гесперидин, кверцетин і рутин слабо розчиняються у воді, мають жовте або лимонно-жовте забарвлення.

Багато вітаміну Р міститься в шкірах цитрусових (до 500 мг%), листях гречки, у шкірці чорної смородини (до 500 мг%), шипшини (до 700 мг%), в листях чаю, червоному перці.

При нестачі або відсутності вітаміну в їжі з'являються крововиливи у шкірі, м'язах, суглобах і внутрішніх органах тварин і людини у вигляді крапок. Вітамін *С* не усуває цих явищ. Капіляри стають крихкими і ламаються. Виникає швидка втома і загальна слабкість, з'являються болі в суглобах і раптові кровотечі. Для попередження розвитку цих явищ людина повинна отримувати щоденно 50 мг вітаміну *Р*.

Вітамін бере участь у багатьох окисно-відновних реакціях. Вважають, що він впливає на судинну систему через залози внутрішньої секреції, з іншої точки зору – через деякі ферментні системи і клітинне дихання. Вітамін запобігає окисненню адреналіну, а адреналін стимулює діяльність гіпофізу по біосинтезу АКТГ. АКТГ впливає на біосинтез кортикостероїдів, а вони підсилюють міцність капілярів.

Існує біохімічна кореляція дії вітамінів *Р* і *С*. Очевидно, обидва вітаміни створюють єдину систему перенесення протонів і електронів в організмі.

Вітамін *Р* в організмі людини і тварин є ефективним природним антиоксидантом, пригнічує моторику травного тракту, виявляє протизапальну, протигістамінну і противиразкову дію.

Препарати вітаміну застосовуються при *Р*-авітамінозах, геморагічному діатезі, ревматизмі, гіпертонічній хворобі, алергіях, променевій хворобі, цукровому діабеті, хронічних захворюваннях верхніх дихальних шляхів, ускладненнях, пов'язаних із застосуванням антикоагулянтів, саліцилатів. Протипоказане вживання препарату вітаміну *Р* при тромбофлебітах, тромбозах.

Принцип методу визначення вітаміну *Р*. Метод ґрунтується на здатності рутину окиснюватись $KMnO_4$. Як індикатор застосовується

Національний університет водного господарства та природокористування

індигокармін, який вступає в реакцію з $KMnO_4$ після окиснення всього рутину.

Експериментально визначено, що 1 см^3 розчину $KMnO_4$ з $C(1/5)$=0,02 моль/дм^3 окиснюється 6,4 мкг рутину.

Хід роботи. Чай або висушені шкіри цитрусових масою 100 мг заливають дистильованою водою об'ємом 50 см^3 і кип'ятять протягом 5 хвилин. Одержаний екстракт охолоджують, відбирають 10 см^3 і переносять у конічну колбу на 100 см^3, додають 10 см^3 дистильованої води і 5 крапель розчину індигокарміну (1 г індигокарміну розтирають у фарфоровій ступці, розчиняють в 50 см^3 сульфатної кислоти (w=98%), вносять у мірну колбу на 1 дм^3, що містить близько 300 см^3 дистильованої води, перемішують вміст колби і доводять водою до 1 дм^3). З'являється синє забарвлення. Ретельно перемішуючи рідину в колбі, титрують розчином $KMnO_4$ з $C(1/5)$=0,01 моль/дм^3 до появи стійкого жовтого забарвлення.

Різниця між дослідним і контрольним титруванням дає об'єм розчину $KMnO_4$ ($C(1/5)$=0,01 моль/дм^3), який пішов на окиснення вітаміну P.

Для розрахунків вмісту вітаміну (мкг/100 г матеріалу) користуються формулою:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot T \cdot V \cdot 100}{a \cdot V_3} \text{ мкг/100 г матеріалу,}$$

де X – вміст вітаміну P, мкг/100 г матеріалу; V_1 – об'єм розчину $KMnO_4$ ($C(1/5)$=0,01 моль/дм^3), що пішов на титрування дослідної проби, см^3; V_2 – об'єм розчину $KMnO_4$ ($C(1/5)$=0,01 моль/дм^3), використаний на титрування контрольної проби, см^3; V загальний об'єм екстракту вітаміну, см^3; V_3 – аліквотний об'єм екстракту вітаміну, взятий для титрування, см^3; a – маса рослинного матеріалу, взятого для аналізу, г; T – титр розчину $KMnO_4$ ($C(1/5)$=0,01 моль/дм^3) за рутином (3,2 мкг/см^3).

Контрольні завдання

Визначте вміст вітаміну P в капусті в мг %, якщо відомо, що на титрування 5 см^3 екстракту, взятого з 50 см^3 вітамінної витяжки, яка отримана з 1г капусти, пішло 10,3 см^3 розчину $KMnO_4$, ($C(1/5)$=0,01 моль/дм^3).