

БИОХИМИЯ

Учебная программа дисциплины

Учебное пособие

- **Методические указания по лабораторным работам**
- Методические указания по самостоятельной работе
- Банк тестовых заданий в системе UniTest**



УДК 577.1
ББК 28.072
З-26

Электронный учебно-методический комплекс по дисциплине «Биохимия» подготовлен в рамках реализации в 2007 г. программы развития ФГОУ ВПО «Сибирский федеральный университет» на 2007–2010 гг. по разделу «Модернизация образовательного процесса».

Рецензенты:

Красноярский краевой фонд науки;
Экспертная комиссия СФУ по подготовке учебно-методических комплексов дисциплин

З-26 Биохимия. Версия 1.0 [Электронный ресурс] : метод. указания по лаб. работам / сост. : Т. Н. Замай, Н. М. Титова. – Электрон. дан. (1 Мб). – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – (Биохимия : УМКД № 295-2007 / рук. творч. коллектива Т. Н. Замай). – 1 электрон. опт. диск (DVD). – Систем. требования : *Intel Pentium* (или аналогичный процессор других производителей) 1 ГГц ; 512 Мб оперативной памяти ; 1 Мб свободного дискового пространства ; привод *DVD* ; операционная система *Microsoft Windows 2000 SP 4 / XP SP 2 / Vista* (32 бит) ; *Adobe Reader 7.0* (или аналогичный продукт для чтения файлов формата *pdf*).

ISBN 978-5-7638-1080-6 (комплекса)

Номер гос. регистрации в ФГУП НТЦ «Информрегистр» 0320802381 от 21.11.2008 г. (комплекса)

Настоящее издание является частью электронного учебно-методического комплекса по дисциплине «Биохимия», включающего учебную программу, учебное пособие, методические указания по самостоятельной работе, контрольно-измерительные материалы «Биохимия. Банк тестовых заданий», наглядное пособие «Биохимия. Презентационные материалы».

В методических указаниях по лабораторным работам изложены основные теоретические положения с конкретными практическими работами с целью привития студентам элементарных навыков химической работы, некоторые методы биохимических исследований, применяемых в спортивной практике при определении реакции организма на спортивные нагрузки и степени тренированности.

Предназначены для студентов направлений подготовки бакалавров 032100.62 «Физическая культура» и специалистов 032101.65 «Физическая культура и спорт» укрупненной группы 030000 «Гуманитарные науки».

© Сибирский федеральный университет, 2008

Рекомендовано к изданию
Инновационно-методическим управлением СФУ

Редактор Н. Ф. Ткачук

Разработка и оформление электронного образовательного ресурса: Центр технологий электронного обучения информационно-аналитического департамента СФУ; лаборатория по разработке мультимедийных электронных образовательных ресурсов при КрЦНИТ

Содержимое ресурса охраняется законом об авторском праве. Несанкционированное копирование и использование данного продукта запрещается. Встречающиеся названия программного обеспечения, изделий, устройств или систем могут являться зарегистрированными товарными знаками тех или иных фирм.

Подп. к использованию 10.09.2008

Объем 1 Мб

Красноярск: СФУ, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

Оглавление

Список основных сокращений	4
Предисловие	5
Применение кредитно-рейтинговой системы к проведению лабораторных работ и семинарских занятий	6
Техника безопасности при работе в биохимической лаборатории	7
Правила выживания в химической лаборатории	8
Лабораторные работы	10
Лабораторная работа № 1. Физико-химические свойства углеводов	10
Лабораторная работа № 2. Физико-химические свойства липидов	13
Лабораторная работа № 3. Физико-химические свойства белков	16
Лабораторная работа № 4. Физико-химические свойства нуклеотидов	24
Лабораторная работа № 5. Аналитическое занятие	26
Лабораторная работа № 6. Количественное определение концентрации аскорбиновой кислоты	26
Лабораторная работа № 7. Физико-химические свойства ферментов	31
Лабораторная работа № 8. Определение влияния адреналина на содержание глюкозы в плазме крови	38
Лабораторная работа № 9. Ферментативный гидролиз жиров. Обнаружение кетоновых тел в биологических материалах	41
Лабораторная работа № 10. Исследование биохимических свойств мочи	44
Лабораторная работа № 11. Количественное определение креатинина в моче	46
Лабораторная работа № 12. Определение содержания лактата и рН в слюне после физической нагрузки	47
Семинарские занятия	51
Тема 1. Гликолиз, цикл трикарбоновых кислот	51
Тема 2. Субстратное и окислительное фосфорилирование. Хемиосмотическая теория митчелла	51
Тема 3. Интеграция углеводного, липидного и белкового обмена	52
Тема 4. Биохимические механизмы мышечного сокращения	52
Тема 5. Соотношение анаэробных и аэробных механизмов ресинтеза АТФ в условиях физической нагрузки	52
Тема 6. Биохимический контроль в спорте. Способы повышения физической работоспособности	53
Библиографический список	54

СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АДФ	- аденозиндифосфат
АКТГ	- адренокортикотропный гормон
АТФ	- аденозинтрифосфат
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
КоQ	- убихинон
НАД	- никотинамидадениндинуклеотид
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ФАД	- флавинадениндинуклеотид
ФМН	- флавиномононуклеотид
3`,5`-сАМР	- циклический аденозинмонофосфат



ПРЕДИСЛОВИЕ

Роль биохимии в современной спортивной практике все более возрастает. Без знания биохимии мышечной деятельности, механизмов регуляции метаболизма при выполнении физических упражнений невозможно эффективное управление процессом тренировки и его дальнейшая рационализация. Знание биохимии необходимо для оценки уровня тренированности спортсмена, выявления перегрузок и перенапряжения, для правильной организации режима питания. В настоящее время для преподавателя физической культуры и тренера требуется не только понимание биохимических процессов, происходящих в организме спортсмена, но и умение провести несложные биохимические анализы и оценить их результаты. Это делает необходимым углубленное изучение биохимии.

Задачей практических занятий по курсу общей биохимии спорта является углубление знаний студентов, иллюстрация основных теоретических положений конкретными практическими работами, привитие студентам элементарных навыков химической работы, ознакомление студентов с некоторыми методами биохимических исследований, применяемых в спортивной практике при определении реакции организма на спортивные нагрузки и степени тренированности.

Для того чтобы студент мог осознанно подойти к предлагаемой работе, связывая ее с теоретическим курсом, каждая тема начинается с краткого введения, в котором в предельно сжатой форме приведен смысл и значение выполняемых им работ. Количество отдельных практических работ, соответствующих курсу и программе, увеличено с учетом принципа их взаимозаменяемости. Это позволит преподавателю выбирать те или иные практические работы в зависимости от конкретных условий.

Применение кредитно-рейтинговой системы к проведению лабораторных работ и семинарских занятий

На лабораторном практикуме студент должен выполнить 12 лабораторных работ, выбор работ в которых осуществляет преподаватель. На проведение семинарских занятий, на которых обсуждаются вопросы, наиболее сложные для понимания, отводится 12 часов.

Преподаватель в течение семестра контролируют успехи студента в освоении дисциплины, оценивая в баллах выполнение им лабораторных работ и участие его в обсуждении изучаемых вопросов на семинарских занятиях. Максимальное количество баллов, которое студент может набрать за выполнение лабораторных работ – 14 (по 2 балла за 1 лабораторную работу), за участие в работе на семинарских занятиях – 10 (по 1–2 балла за одно семинарское занятие).

ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Работая в лаборатории, необходимо соблюдать меры предосторожности, придерживаясь следующих правил:

Общие сведения

- Запрещается входить в лабораторию в верхней одежде.
- Работа в биохимической лаборатории допускается только в специальном халате, так как вероятна возможность загрязнения, порчи одежды при попадании на нее едких реактивов.

Обращение с реактивами

- Все концентрированные кислоты и щелочи должны находиться в вытяжном шкафу.
- Все опыты с ядовитыми и неприятно пахнущими веществами проводить в вытяжном шкафу.
- Наливать или насыпать реактивы следует только над столом.
- Не следует оставлять открытыми банки с реактивами.
- Пролитые или рассыпанные реактивы нужно немедленно удалить со стола, вытерев стол тряпкой и обмыв водой.
- Пролитые концентрированные кислоты следует засыпать песком, затем собрать песок лопаткой. Облитое место необходимо облить раствором соды и вытереть тряпкой.
- При работе с органическими растворителями (спирты, эфиры, ацетон, бензин и др.) нельзя определять вещество по запаху, так как может произойти отравление их парами.
- Наполнение пипеток растворами органических растворителей, кислот, щелочей проводят только при помощи груши.
- Внимательно следить за тем, чтобы реактивы (особенно кислоты и щелочи) не попадали на лицо, руки и одежду.
- Не ходить по лаборатории с концентрированными кислотами, а наливать их только в определенном, отведенном для этого месте.
- Не загрязнять реактивы во время работы (не путать пробки от склянок, содержащих разные реактивы; избыток взятого реактива не выливать обратно в склянку; пользуясь пипеткой, набирать каждый реактив только предназначенной для этого пипеткой, ни в коем случае не путать их).
- В случае попадания на кожу концентрированной кислоты облитое место нужно промыть большим количеством воды, а затем разбавленным раствором соды. При попадании растворов щелочей на кожу пораженное место нужно обмыть сначала разбавленной кислотой, а потом водой.

Обращение с нагревательными приборами

- Перед тем как зажечь спиртовку – убедиться, что поблизости нет горючих жидкостей (спирт, эфир и др.).
- Зажигать спиртовку можно только спичкой.
- В пробирке можно нагревать только небольшое количество раствора, жидкость должна занимать не более 1/3 объема пробирки.
- Пробирку при нагревании нужно направить в сторону от себя и рядом находящихся людей.
- Нельзя наклоняться над спиртовкой. Вначале пробирку с раствором нужно прогреть всю, а затем нагревать в нужном месте, не вынимая из пламени спиртовки.
- Нельзя нагревать пробирку долго в одном месте, так как жидкость быстро закипит и выплеснется из пробирки.
- Нагревать пробирку нужно ниже уровня жидкости в ней.
- При нагревании жидкости держать пробирку отверстием в сторону от себя и тех, кто находится рядом, не касаться пробиркой горящего фитиля, всегда соблюдать большую осторожность при нагревании, не допускать выплескивания жидкости (время от времени отводить пробирку от пламени, не нагревать ее в вертикальном положении), не приближать лицо к сосуду, в котором нагревается жидкость.
- После нагревания следует сразу затушить спиртовку, накрыв пламя колпачком.
- Работа с водяной баней осуществляется только под тягой.
- При неосторожной работе могут быть ожоги нагретой стеклянной посудой. При ожогах на обожженное место нужно положить ватку, смоченную раствором марганцевокислого калия.

Закончив работу, привести рабочее место в порядок.

Правила выживания в химической лаборатории

- Если вы откупорили что-либо – **закупорьте**.
- Если в руках у вас жидкое – **не разлейте**, порошкообразное – **не рассыпьте**, газообразное – **не выпустите наружу**.
- Если включили – **выключите**.
- Если открыли – **закупорьте**.
- Если разобрали – **соберите**.
- Если вы не можете собрать – **позовите на помощь умельца**.
- Если вы не разбирали – **не вздумайте собирать**.
- Если вы одолжили что-нибудь – **верните**.
- Если вы пользуетесь чем-либо – **держите в чистоте и порядке**.
- Если вы привели что-нибудь в беспорядок – **восстановите статус-кво**.
- Если вы сдвинули что-либо – **верните на место**.

- Если вы хотите воспользоваться чем-либо, принадлежащим другому, **попросите разрешения.**
- Если вы не знаете, как это делается, ради Бога, **не трогайте.**
- Если это вас не касается – **не вмешивайтесь.**
- Если вы не знаете, как это делается, **сразу спросите.**
- Если не можете что-то понять – **почешите в затылке.**
- Если все же не поймете – **то и не пытайтесь.**
- Если вы горите на работе – **постарайтесь, чтобы у вас ничего не загоралось.**
- Если у вас что-либо взорвалось, **проверьте, остались ли вы живы.**
- Если не усвоили этих правил – **не входите в лабораторию.**

Академик Михаил Григорьевич Воронков (Химия. Т.17. Москва : Аванта⁺, 2000. – С. 431).

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа № 1. Физико-химические свойства углеводов.

Углеводами называют полиоксиальдегиды и полиоксикетоны с общей формулой $(\text{C}_n\text{H}_2\text{O})_n$, а также производные этих соединений. В организме человека и животных углеводы выполняют разнообразные функции. Они служат источником энергии, являются пластическим материалом для построения клеток, а также используются в качестве исходных продуктов для синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот. Углеводы классифицируются на моносахариды, олигосахариды и полисахариды.

Моносахариды, или простые сахара, состоят из одной полиоксиальдегидной или полиоксикетонной единицы.

Олигосахариды содержат в своем составе 2–10 остатков моносахаридов, связанных между собой гликозидными связями.

Полисахариды содержат более 10 остатков моносахаридов и подразделяются на гомополисахариды и гетерополисахариды.

Цель лабораторной работы – изучить основные свойства углеводов

Задачи:

1. Провести реакции на открытие в растворе углеводов, фруктозы и крахмала.
2. Определить, какие углеводы обладают восстанавливающими свойствами.
3. Провести гидролиз крахмала.

Работа 1. Реакция Подобедова-Молиша

Чувствительными реакциями на углеводы являются реакции с α -нафтолом и тимолом.

Реактивы: раствор сахарозы, α -нафтол, тимол, концентрированная H_2SO_4 .

Оборудование: пробирки, капельницы, пипетки.

ХОД РАБОТЫ. В 2 пробирки наливают по 0,5 мл раствора сахарозы. В первую пробирку добавляют 1–2 капли раствора α -нафтола, во вторую – 1–2 капли раствора тимола. В обе пробирки осторожно настилают концентрированную серную кислоту. Серная кислота опускается на дно пробирки и на границе двух жидкостей образуется в случае с α -нафтолом фиолетовое кольцо, в случае с тимолом – красноватое. Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, образующиеся из углеводов под действием серной кислоты, конденсируясь с двумя молями сульфированного α -нафтола или тимола дают хромогены, которые окисляются серной кислотой в окрашенное хиноидное соединение.

Подобные реакции дают все углеводы (кроме глюкозамина).

Работа 2. Открытие фруктозы (реакция Селиванова)

Реактивы: раствор фруктозы, раствор глюкозы, реактив Селиванова.

Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

ХОД РАБОТЫ. В первую пробирку вносят 0,5 мл раствора фруктозы, во вторую пробирку – 0,5 мл раствора глюкозы. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл реактива Селиванова. Осторожно нагревают на спиртовке. В пробирке с фруктозой постепенно появляется красное окрашивание. На первой стадии образуется оксиметилфурфурол, который во второй стадии, конденсируясь с резорцином, дает красное окрашивание.

Работа 3. Реакция крахмала и гликогена с йодом

Реактивы: раствор крахмала, раствор Люголя, 10 % раствор NaOH, этиловый спирт.

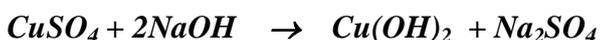
Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

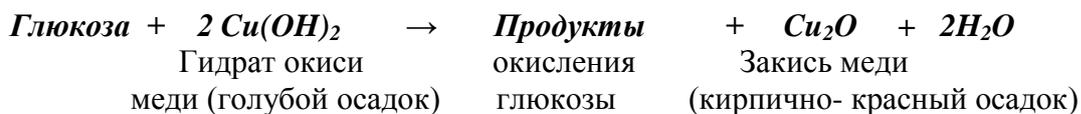
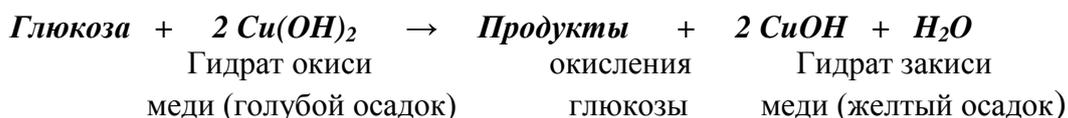
ХОД РАБОТЫ. К 2 мл раствора крахмала прибавляют 1–2 капли раствора Люголя. Раствор окрашивается в синий цвет. Содержимое пробирки делят на 3 части: к первой части прибавляют 1 мл раствора NaOH, ко второй – 2 мл этилового спирта, третью часть нагревают. Во всех случаях окраска исчезает, но в третьей пробе окраска вновь появляется при охлаждении. Реакция основана на образовании нестойкого адсорбционного соединения йода с амилозой.

Работа 4. Реакция Троммера

Углеводы, в составе которых имеются свободные карбонильные группы, дают ряд реакций, основывающихся на окисляемости этой группы.

В основе реакции Троммера лежит окислительно-восстановительный процесс: в щелочной среде при нагревании альдегидная группа сахара окисляется, а гидрат окиси меди (осадок голубого или синего цвета) восстанавливается в гидрат закиси меди (кирпично-красный осадок). Углевод при этом дает различные продукты окисления, так как при окислении в щелочной среде моносахариды претерпевают глубокие изменения с расщеплением углеродной цепи. Среди продуктов окисления не удается выделить кислоту с тем же числом атомов углерода, как у исходного сахара (в отличие от окисления обычных альдегидов). Сахара, не имеющие свободной альдегидной группы, пробу Троммера не дают. Окислительно-восстановительную реакцию можно представить в виде следующей схемы:





Реактивы: 0,5 %-ные растворы глюкозы, фруктозы, сахарозы, мальтозы и крахмала; 2 н раствор NaOH; 0,2 н раствор CuSO₄.

Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

ХОД РАБОТЫ. В пробирку наливают раствора глюкозы и 6-8 капель NaOH. Затем по каплям добавляют раствор CuSO₄ до образования нерастворимого голубого осадка. Осторожно нагревают пробирку на спиртовке. Голубой, не растворимый в воде осадок гидрата окиси меди (II), постепенно переходит в желтый, а затем в красный осадок закиси меди (I). Это указывает на положительную реакцию Троммера.

Аналогичный опыт проводят с сахарозой, мальтозой, фруктозой и крахмалом. Делают заключение о восстанавливающих свойствах этих углеводов.

Избыток медной соли маскирует реакцию, так как гидроокись меди (II) при нагревании теряет воду и дает черный оксид меди (II).

Работа 5. Кислотный гидролиз крахмала

Реактивы: 0,1 %-ный раствор крахмала; 2 н раствор H₂SO₄; раствор Люголя; 2 н раствор CuSO₄; 2 н раствор NaOH.

Оборудование: колбочка, пробирки, пипетки, спиртовка.

ХОД РАБОТЫ. В колбочку помещают 5 мл раствора крахмала 3 мл раствора серной кислоты. Нагреть на спиртовке в течение 5 мин, отбирая пипеткой каждую мин по 0,5 мл гидролизата и добавляя в них по 1 капле раствора Люголя.

Обратить внимание на изменение окраски гидролизата с йодом в ходе гидролиза. С оставшимся гидролизатом проделать реакцию Троммера. По результатам реакции сделать вывод о строении крахмала.

Работа 6. Выделение гликогена из печени

Исследуемый материал: печень крысы.

Реактивы: 5 %-ный раствор ТХУ; дистиллированная вода; раствор Люголя.

Оборудование: ступка, пестик, фильтры, пробирки, пипетки.

ХОД РАБОТЫ. 0,5 г печени крысы помещают в ступку, добавляют 3 мл раствора ТХУ и растирают пестиком 10 мин. Затем к экстракту добавляют 5 мл дистиллированной воды, суспензию перемешивают и фильтруют через

бумажный фильтр, смоченный водой. С фильтратом проделывают реакцию с раствором Люголя. Сделать соответствующий вывод.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и выводы.

Контрольные вопросы

1. Что называют углеводами?
2. Классификация углеводов.
3. Напишите структурные формулы глюкозы и фруктозы (линейные и циклические) и отметьте асимметричные атомы.
4. Напишите структурные формулы альдотриозы и кетотриозы. Имеют ли они стереоизомеры? Если имеют, напишите их структурные формулы.
5. Какие углеводы относятся к восстанавливающим?
6. Принципы методов обнаружения: а) глюкозы? б) фруктозы? в) сахарозы?
7. В чем сходство и различие в строении крахмала и гликогена?

Лабораторная работа № 2. Физико-химические свойства липидов

Липиды – органические соединения, нерастворимые в воде, но растворимые в органических растворителях. К липидам относятся нейтральные жиры и жироподобные вещества (липоиды). Липиды экстрагируют из тканей при помощи органических растворителей (хлороформ, спирт, эфир и пр.). По своей химической природе липиды чаще всего являются сложными эфирами жирных кислот и многоатомных спиртов. Биологическая роль липидов многообразна, но в основном они выполняют структурную функцию (входят в состав мембран) и энергетическую (при окислении липидов освобождается большое количество энергии).

Классификация липидов. 1. Простые липиды: а) нейтральные жиры (глицериды, глицеролы); б) воска. 2. Сложные липиды: а) фосфолипиды; б) гликолипиды. 3. Липоиды: а) стерины и стероиды; каротиноиды; в) терпеноиды.

Цель лабораторной работы – изучить некоторые свойства липидов.

Задачи:

1. Определить кислотное число растительного масла
2. Определить число омыления растительного масла
3. Провести качественные реакции на открытие в растворе желчных кислот

Работа 7. Определение кислотного числа

Кислотное число характеризует кислотность жира и измеряется оно количеством миллиграммов гидроксида калия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Кислотное число наряду с другими физико-химическими показателями характеризует качество масла. Например, если масло получено из зрелых семян, то свободных жирных кислот в нем мало, в масле же незрелых семян содержание свободных жирных кислот значительно. При хранении масла наблюдается гидролиз глицеридов. Который приводит к накоплению свободных жирных кислот, то есть к нарастанию кислотности. Повышенная кислотность масла указывает на снижение его качества.

Метод определения кислотного числа основан на том, что свободные жирные кислоты, имеющиеся в масле, оттитровывают 0,1 н раствором КОН. Обычно титрование проводят гидроксидом калия, а не гидроксидом натрия, так как образующиеся калиевые мыла лучше растворимы в условиях опыта.

Реактивы: масло растительное или жир животный; этиловый спирт; 0,1 н раствор КОН в этиловом спирте; фенолфталеин.

Оборудование: весы, колба коническая, цилиндр мерный, пипетки, бюретка.

ХОД РАБОТЫ. Для определения кислотного числа навеску жира (масла) в 2 г помещают в коническую колбу и растворяют в 10 мл нейтральной смеси спирта и эфира (1:1). После растворения жира в колбу вносят 1-2 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н спиртовым раствором гидроксида калия до слабо-розового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать 1 мин.

Кислотное число определяют по формуле:

$$\text{Кислотное число} = V \cdot T / a,$$

где V – количество (в мл) 0,1 н раствора КОН, израсходованное на титрование взятой навески жира; T – титр 0,1 н раствора КОН (в мг); a – навеска жира (в г).

Работа 8. Определение числа омыления

Числом омыления называется количество миллиграммов КОН, необходимое для нейтрализации как свободных, так и связанных жирных кислот, содержащихся в 1 г масла.

Содержание свободных жирных кислот в масле характеризуется кислотным числом, а содержание связанных в виде эфиров кислот – эфирным числом, то есть количеством миллиграммов КОН, необходимого для нейтрализации освобождающихся при омылении эфирных связей жирных кислот на 1 г масла.

Экспериментально эфирное число определяется по разности между числом омыления и кислотным числом.

Реактивы: 0,5 н спиртовой раствор КОН; 0,5 н HCl; фенолфталеин.

Оборудование: весы, баня водяная, колбы конические, пробирки с обратным холодильником, пипетки, бюретка.

ХОД РАБОТЫ. В пробирку вносят 0,5 г жира, а в другую – 0,5 мл воды затем в обе пробирки добавляют по 5 мл 0,5 н спиртового раствора КОН. Пробирки закрывают пробками с обратными воздушными холодильниками и нагревают на кипящей водяной бане 30 мин при периодическом встряхивании. По окончании омыления содержимое пробирок выливают в колбы, добавляют по 5 мл воды, 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 н раствором HCl до исчезновения розовой окраски (определяют количество несвязавшейся щелочи). Исходя из того, что 1 мл 0,5 н раствора КОН соответствует 28 мг его, расчет числа омыления ведут по формуле:

$$\text{Число омыления} = (V_1 - V_2) \cdot 28 / a,$$

где V_1 – количество (в мл) 0,5 н. раствора HCl, затраченное на титрование контроля (колба с водой), V_2 – количество (в мл) 0,5 н. раствора HCl, затраченное на титрование опыта (колба с жиром), а – навеска жира (в г).

Работа 9. Обнаружение желчных кислот в моче (проба Петенкофера)

Проба основана на образовании окрашенного продукта при взаимодействии желчных кислот и оксиметилфурфурола, который образуется из сахарозы при действии концентрированной серной кислоты.

Исследуемый материал: моча.

Реактивы: концентрированная серная кислота, 5 %-ный раствор сахарозы.

Оборудование: пробирки, пипетки.

ХОД РАБОТЫ. В пробирку налить 5 мл мочи, добавить 10 капель раствора сахарозы и осторожно, по стенке пробирки, добавить 10 капель концентрированной серной кислоты. Не взбалтывать! Оставить на 10-15 мин пробирку в штативе.

При наличии в моче желчных кислот на границе жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо.

Работа 10. Качественные реакции на обнаружение витамина E

Взаимодействие α -токоферола с концентрированной азотной кислотой приводит к окрашиванию реакционной смеси в красный цвет. Это обусловлено тем, что продукт окисления α -токоферол имеет хиноидную структуру. При взаимодействии с хлорным железом (III) α -токоферол окисляется до α -токоферилхинона – соединения, окрашенного в красный цвет.

Реактивы: спиртовый раствор α -токоферола, концентрированная HNO_3 , 1 %-ный раствор FeCl_3 .

Оборудование: пробирки, пипетки.

ХОД РАБОТЫ. *Реакция с азотной кислотой.* В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора витамина Е и добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты. Пробирку интенсивно встряхивают и наблюдают постепенное появление красного окрашивания.

Реакция с хлорным железом. В сухую пробирку вносят 0,5 мл спиртового раствора витамина Е, затем 0,5 мл раствора хлорного железа и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдают появление красного окрашивания.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и выводы.

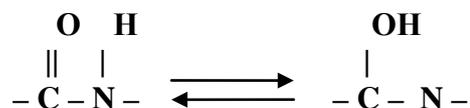
Контрольные вопросы

1. Классификация липидов.
2. Что такое число омыления и как оно определяется?
3. Что такое кислотное число, как оно определяется и что характеризует?
4. Принцип метода определения желчных кислот.
5. Принцип метода определения витамина Е.

Лабораторная работа № 3. Физико-химические свойства белков

Белки представляют собой высокомолекулярные полимерные органические соединения, структурными единицами которых являются аминокислоты. Аминокислоты в молекуле белка соединены между собой пептидными связями ($-\text{CO}-\text{NH}-$), образуя полипептидные цепи. Пептидная связь возникает между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой, что сопровождается выделением молекулы воды. В белках различают несколько уровней структурной организации. *Первичная структура* белка определяется числом и последовательностью аминокислотных остатков, соединенных между собой при помощи пептидной связи. *Вторичная структура* возникает за счет образования водородных связей между группами $\text{N}-\text{H}$ и $\text{O}=\text{C}$ данной полипептидной цепи, что приводит к упорядоченному расположению гибкой полипептидной цепи в виде спиральной или складчатой структуры. *Третичная структура* возникает в результате взаимодействия между боковыми цепями аминокислотных остатков полипептидных цепей. К таким взаимодействиям относятся водородные, дисульфидные и ионные связи, ван-дер-ваальсовы и гидрофобные силы. В результате таких взаимодействий полипептидная цепь свертывается очень сложным, но вместе с тем определенным образом, приобретая характерную пространственную конфигурацию. Межмолекулярные взаимодействия между отдельными полипептидными цепями, обладающими вторичной и третичной структурой, могут приводить к образованию агрегатов, то есть к возникновению *четвертичной структуры*

пептидную связь, в щелочной среде присутствует в своей таутомерной енольной форме:



При избытке щелочи происходит диссоциация ОН-группы, появляется отрицательный заряд, с помощью которого кислород взаимодействует с медью, возникает солеобразная связь, кроме того, медь образует дополнительные координационные связи с атомами азота, участвующими в пептидной связи, путем использования их электронных пар. Возникающий таким образом комплекс очень стабилен. Интенсивность окраски комплекса зависит от концентрации белка и количества медной соли в растворе.

Биуретовой реакцией обнаруживаются все без исключения белки, а также продукты их неполного гидролиза – пептоны и полипептиды. Для ди- и трипептидов биуретовая реакция ненадежна. Оттенок зависит от длины полипептидной цепочки. Пептоны при этой реакции дают розовое или красное окрашивание. Биуретовая реакция положительна и с веществами небелкового характера, имеющими в составе не менее двух –СО–NH₂-групп, к ним относится, например, оксамид –NH₂–СО–СО–NH₂, биурет –N₂H–СО–NH–СО–NH₂.

Исследуемый материал: раствор яичного белка; 1 % раствор желатины.

Реактивы: 10 % раствор NaOH, 1 % раствор CuSO₄.

Оборудование: пробирки, капельницы.

ХОД РАБОТЫ. К 5 каплям водного раствора белка добавляют 3 капли 10 % раствора NaOH и 1 каплю 1 % раствора CuSO₄ и перемешивают. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовый цвет. Нельзя добавлять избыток CuSO₄, так как синий осадок маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса.

Работа 13. Нингидриновая реакция на α-аминокислоты

Белки, полипептиды и свободные α-аминокислоты дают синее или фиолетовое окрашивание с нингидрином. При нагревании белка с водным раствором нингидрина аминокислоты окисляются и распадаются, образуя СО₂, NH₃ и соответствующий альдегид. Нингидрин, являясь сильным окислителем, вызывает окислительное дезаминирование α-аминокислоты, приводящее к образованию аммиака, двуокиси углерода, соответствующего альдегида и восстановленной формы нингидрина. Нингидрин восстанавливается и связывается со второй молекулой нингидрина посредством молекулы аммиака, образуя продукты конденсации, окрашенные в синий, фиолетовый, красный, а в случае пролина – в желтый цвет.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1 % раствор желатины.

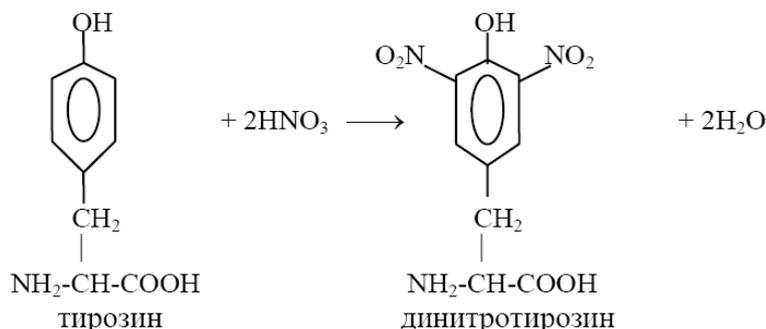
Реактивы: нингидрин, 1 % водный раствор.

Оборудование: пробирки, капельницы.

ХОД РАБОТЫ. К 5 каплям раствора белка приливают 5 капель 0,1 % водного раствора нингидрина и кипятят 1-2 минуты. Появляется розово-фиолетовое окрашивание. С течением времени раствор синееет. Данная реакция не является специфичной, так как ее дают некоторые амины и амиды кислот.

Работа 14. Ксантопротеиновая реакция на циклические аминокислоты (Мульдера)

Ксантопротеиновая реакция открывает наличие в белках циклических аминокислот - триптофана, фенилаланина, тирозина, содержащих в своем составе бензольное ядро. Большинство белков при нагревании с концентрированной азотной кислотой дает желтое окрашивание, переходящее в оранжевое при подщелачивании. Реакция обусловлена нитрованием бензольного кольца этих аминокислот с образованием нитросоединений желтого цвета. При подщелачивании возникает хиноидная структура, окрашенная в оранжевый цвет.



Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1 % раствор желатины.

Реактивы: концентрированная HNO_3 , 10 % раствор NaOH .

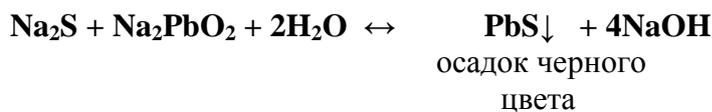
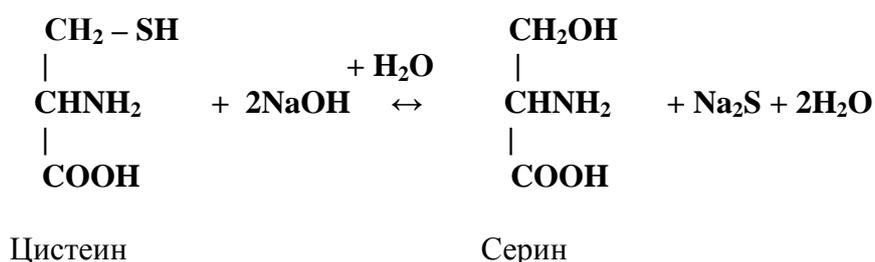
Оборудование: пробирки, капельницы.

ХОД РАБОТЫ. К 5 каплям раствора белка добавляют 3 капли концентрированной HNO_3 и осторожно кипятят. Вначале появляется осадок свернувшегося белка (под влиянием кислоты), который при нагревании окрашивается в желтый цвет. После охлаждения в пробирку наливают по каплям 10 % раствор NaOH до появления оранжевого окрашивания вследствие образования натриевой соли динитротирозина.

Работа 15. Реакция Фоля на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу (цистеин, цистин)

Реакция Фоля указывает на присутствие в белке аминокислот цистина и цистеина, содержащих слабосвязанную серу. В метионине сера имеет прочное соединение, поэтому эту реакцию не дает. Реакция состоит в том, что при кипячении белка со щелочью цистеин или цистин легко отщепляет серу в виде сернистого натрия, который с плюмбитом дает черный или бурый осадок сернистого свинца. Интенсивность окраски зависит от количества в белке аминокислот цистина и цистеина и от концентрации белка в растворе.

Реакция протекает по следующим уравнениям:



Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1 % раствор желатины.

Реактивы: 30 % раствор NaOH, 5 % раствор (CH₃COO)₂Pb.

Оборудование: пробирки, капельницы.

ХОД РАБОТЫ. В одну пробирку наливают раствор яичного белка, в другую – раствор желатины. В каждую пробирку добавляют по 5 капель раствора 30 % NaOH и по 1 капле 5 % раствора (CH₃COO)₂Pb. При интенсивном кипячении жидкость в пробирке с яичным белком темнеет, образуя черный осадок сернистого свинца. В пробирке с желатиной черного осадка не образуется, так как желатина почти не содержит серосодержащих аминокислот.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и выводы. Результаты работы оформить в виде таблицы.

Цветные реакции на белки

Название реакции	Исследуемый материал	Употребляемые реактивы	Наблюдаемая окраска	Чем обусловлена реакция?

Работа 16. Хромопротеины

Хромопротеины являются сложными белками, простетическая группа которых представлена каким-либо окрашенным соединением небелкового характера (пигментом). Окрашенная простетическая группа различных хромопротеинов может принадлежать к разным классам органических соединений (порфиринам, каротиноидам, производным витаминов и др.). Важнейшую группу хромопротеинов составляют белки, содержащие окрашенное соединение порфириновой природы, к ним относятся гемоглобин крови, миоглобин мышц, некоторые ферменты (каталаза, пероксидаза, цитохромы и др.).

Гемоглобин состоит из белка глобина и пигментной части – гема. По химической природе гем представляет собой соединение протопорфирина с двухвалентным железом, которое в особых условиях может переходить в трехвалентное.

Геминовая проба Тейхмана

При нагревании высушенной крови с ледяной уксусной кислотой кровяной пигмент распадается на глобин и гематин. Гематин при действии хлористого водорода, возникающего при взаимодействии хлористого натрия (имеющегося в крови или добавленного) и уксусной кислоты, переходит в хлорпроизводное – гемин, который выкристаллизовывается при остывании. Пробой Тейхмана пользуются в судебно-медицинской экспертизе для доказательства наличия кровяных пятен. Гемин отличается от гема наличием трехвалентного железа, соединенного с атомом хлора.

Исследуемый материал: кровь.

Реактивы: ледяная CH_3COOH , насыщенный раствор NaCl .

Оборудование: стекла предметные и покровные, стеклянная палочка, микроскоп.

ХОД РАБОТЫ. Каплю свежей крови помещают на предметное стекло и дают ей высохнуть, держа стекло высоко над пламенем горелки во избежание нагревания выше $60\text{ }^\circ\text{C}$ (не кипятить, контролировать нагрев прикосновением стекла к тыльной поверхности кисти руки). К подсушенной крови добавляют 1–2 капли концентрированной уксусной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, накрывают покровным стеклом и осторожно нагревают до начала кипения кислоты. При этом предметное стекло следует держать высоко над пламенем горелки, чтобы избежать выкипания жидкости. Затем препарат охлаждают и рассматривают под микроскопом образовавшиеся при разрушении гемоглобина кристаллы солянокислого гемина, имеющие форму ромбоидальных палочек. Если обнаружить кристаллы не удастся, то приподнимают покровное стекло, добавляют 2–3 капли концентрированной уксусной кислоты, нагревают и после охлаждения вновь исследуют под микроскопом.

При исследовании старых пятен геминую пробу производят с соскобом пятна или же кусочек ткани с пятном режут на мелкие части. Перед обработкой ледяной уксусной кислотой добавляют один маленький кристаллик хлористого натрия.

Работа 17. Фосфопротеины

Фосфопротеины представляют собой сложные белки, состоящие из простого белка и небелковой части – фосфорной кислоты. Фосфорная кислота связана с белком через гидроксильную группу оксиаминокислот – серина и треонина. К этой группе белков относятся казеиноген молока, виттелин яичного желтка, ихтулин икры и некоторые другие. Фосфопротеины служат одним из питательных материалов для развития эмбрионов.

Исследуемый материал: казеин.

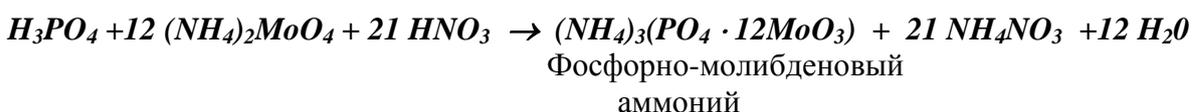
Реактивы: CH_3COOH , 1 % раствор CuSO_4 , 10 % раствор NaOH , 10 % раствор HNO_3 , фенолфталеин, молибденовый реактив.

Оборудование: воронки, фильтры, пробирки, стеклянная палочка, пипетки, спиртовка.

ХОД РАБОТЫ. 1. *Гидролиз казеина.* В пробирку помещают выделенный из молока казеин и приливают 2 мл 10 % раствора едкого натра. Кипятят 10–15 мин на асбестовой сетке с обратным холодильником, затем охлаждают пробирку и проводят реакцию на продукты гидролиза.

2. *Обнаружение белка.* Белок обнаруживают биуретовой реакцией. В пробирку к 3 каплям гидролизата добавляют 1 каплю 1 % раствора сернокислой меди. Появляется розо-фиолетовое окрашивание.

3. *Обнаружение фосфата.* Оставшийся гидролизат подкисляют несколькими каплями 10 % раствора азотной кислоты в присутствии 1–2 капель фенолфталеина до обесцвечивания и отфильтровывают в сухую пробирку. К 5 каплям фильтрата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят несколько минут. Жидкость окрашивается в желтый цвет, а затем при охлаждении выпадает желтый осадок фосфорно-молибденового аммония, указывающий на присутствие фосфата в гидролизате.



Работа 18. Гликопротеиды. Открытие углеводного компонента в яичном белке

Гликопротеиды – сложные белки, в простетические группы которых входят углеводы и их производные. Гликопротеиды содержатся почти во всех тканях и жидкостях организма, носят общее название муцинов и мукоидов и выполняют опорную и защитную функции.

Исследуемый материал: яичный белок.

Реактивы: концентрированная H_2SO_4 , 1 % раствор тимола, концентрированная CH_3COOH .

Оборудование: пробирки, капельницы.

ХОД РАБОТЫ. При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз – оксиметилфурфурол. Они дают с тимолом или α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты продукты конденсации красного цвета. К 10 каплям профильтрованного гидролизата добавляют 2–3 капли 1 % раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно наслаивают 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфурола с тимолом.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и выводы. Результаты работ по сложным белкам оформить в таблицу.

Качественные реакции на открытие составных частей сложных белков

Наименование сложного белка	Химическая структура простетической группы	Употребляемые реактивы	Продукты реакции	Чем обусловлена реакция?

Контрольные вопросы

1. Что такое белок?
2. Как связаны между собой аминокислоты в молекуле белка? Напишите трипептид из различных аминокислот. С помощью какой реакции можно их открыть?
3. Напишите аминокислоты, имеющие в своем составе бензольное кольцо. С помощью какой реакции их можно открыть?
4. Напишите аминокислоты, содержащие серу, с помощью какой реакции их можно открыть?
5. Что открывает нингидриновая реакция?
6. Значение цветных реакций на белки.
7. Классификация аминокислот. Строение (формулы) и номенклатура аминокислот.

8. Перечислите существующие структуры белков.
9. Какие существуют дополнительные связи (помимо основной пептидной), сохраняющие пространственную конфигурацию молекулы белка?

Лабораторная работа № 4. Физико-химические свойства нуклеотидов

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные соединения, построенные из большого количества моонуклеотидов, соединенных друг с другом фосфодиэфирной связью. Моонуклеотиды состоят из пуринового или пиримидинового основания, углеводного компонента (рибозы или дезоксирибозы) и фосфорной кислоты. Нуклеиновые кислоты обладают кислотными свойствами вследствие диссоциации имеющихся у них остатков фосфорной кислоты. Различные нуклеиновые кислоты характеризуются входящими в их состав пуриновыми и пиримидиновыми основаниями и пентозами. Дезоксирибонуклеиновая (ДНК) кислота представляет собой полимер, состоящий из мономеров – дезоксирибонуклеозидмонофосфатов. Рибонуклеиновая кислота является полимером, состоящим из рибонуклеозидмонофосфатов.

Цель лабораторной работы – определить структурные компоненты нуклеотидов.

Задачи:

1. Провести кислотный гидролиз нуклеотидов
2. Определить состав нуклеотидов с помощью качественных реакций.

Работа 18. Кислотный гидролиз нуклеиновых кислот

Для изучения состава нуклеиновых кислот проводят кислотный гидролиз дрожжей в присутствии серной кислоты. При продолжительном гидролизе нуклеиновые кислоты распадаются на моонуклеотиды, которые в свою очередь гидролизуются на пуриновые или пиримидиновые основания, пентозу и фосфорную кислоту.

Исследуемый материал: дрожжи.

Реактивы: 10 % раствор H_2SO_4 , концентрированный NH_3 , 1 % раствор $AgNO_3$, молибденовый реактив, концентрированная H_2SO_4 , тимол.

Оборудование: круглодонная колба с воздушным холодильником, воронка с фильтром, мерный цилиндр, пробирки.

ХОД РАБОТЫ. Помещают 1 г пекарских дрожжей в круглодонную колбу на 100 мл, добавляют 20 мл 10 % раствора серной кислоты и 20 мл дистиллированной воды. Колбу закрывают пробкой с длинной стеклянной трубкой и кипятят под тягой в течение часа на асбестовой сетке при слабом нагревании. Через час после начала кипения нагревание жидкости прекращают, дают ей остыть, переносят в цилиндр, доводят водой до

первоначального объема и фильтруют. С фильтратом проделывают качественные реакции на составные части нуклеиновых кислот.

Работа 17. Серебряная проба на пуриновые основания

ХОД РАБОТЫ. Нейтрализуют 10 капель гидролизата 1 каплей концентрированного аммиака и добавляют 5 капель 1 % раствора азотнокислого серебра. Через 3–5 мин выпадает небольшой бурый осадок серебряных производных пуриновых оснований.

Работа 18. Качественная реакция Молиша на пентозную группировку

ХОД РАБОТЫ. При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз – оксиметилфурфурол. Они дают с тимолом или α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты продукты конденсации красного цвета. К 10 каплям профильтрованного гидролизата добавляют 2–3 капли 1 % раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно наслаивают 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфурола с тимолом.

Работа 19. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

ХОД РАБОТЫ. К 3–5 каплям гидролизата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят несколько минут. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении образуется желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорно-молибденовокислого аммония.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и выводы.

Контрольные вопросы

1. Что такое нуклеиновая кислота и каково ее строение?
2. Что такое ДНК и РНК? Виды РНК.
3. Каков принцип выделения из ткани ДНК и ее обнаружения?
4. Качественные реакции на составные части нуклеиновых кислот.
5. Что представляют собой мононуклеотиды? Каковы продукты их гидролиза? Написать реакцию гидролиза мононуклеотида (формулами).
6. Как соединяются между собой мононуклеотиды в молекуле нуклеиновых кислот? Напишите формулу динуклеотида.

Лабораторная работа № 5. Аналитическое занятие

Цель лабораторной работы – развитие логического мышления.

Задача – определить вещество в растворе.

Каждый студент индивидуально получает по 2 пробирки с неизвестными растворами и с помощью качественных реакций, описанных в предыдущих работах, определяет вещества, находящиеся в растворах.

Исследуемый материал: в растворах может присутствовать одно из перечисленных ниже веществ:

1. Глюкоза
2. Фруктоза
3. Сахароза
4. Крахмал
5. Гликоген
6. Яичный альбумин
7. Желатин
8. Гликопротеин
9. Фосфопротеин
10. Нуклеопротеин
11. Желчные кислоты

Реактивы: α-нафтол, тимол, концентрированная H_2SO_4 , 30 % раствор NaOH, 5 % раствор $(CH_3COO)_2Pb$, 2 н раствор NaOH; 0,2 н раствор $CuSO_4$; 5 %-ный раствор ТХУ; раствор Люголя; 5 %-ный раствор сахарозы, реактив Селиванова, молибденовый реактив, 1 % раствор $AgNO_3$.

Оборудование: пробирки, капельницы, спиртовки, пипетки.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачу, ход выполнения работы, результаты и вывод.

Лабораторная работа № 6. Количественное определение концентрации аскорбиновой кислоты

Витамины – низкомолекулярные органические вещества, имеющие разнообразную химическую природу. Они условно объединены в одну группу по признаку жизненной необходимости для организма. Поскольку в организме человека и животных витамины не синтезируются, за исключением некоторых из них, образующихся симбиотической микрофлорой пищеварительного тракта, они относятся к незаменимым факторам питания. Поступая в организм в небольших количествах с пищей, витамины обеспечивают нормальное протекание биохимических процессов и, таким образом, участвуют в регуляции многих метаболических функций организма.

Биологическая роль большинства витаминов заключается в том, что многие витамины входят в состав простетических групп ферментов. Недостаточное поступление витаминов с пищей, а также нарушение их всасывания в организме приводит к развитию тяжелых нарушений обмена веществ: авитаминозам и гиповитаминозам.

Заболевание, возникающее в результате отсутствия того или иного витамина, называют авитаминозом. При относительной недостаточности какого-либо витамина наблюдается гиповитаминоз. Поскольку функции витаминов тесно связаны между собой, то обычно наблюдаются полиавитаминозы или полигиповитаминозы. Авитаминозы встречаются достаточно редко, чаще встречаются гиповитаминозы как результат нерационального питания, нарушения обмена веществ или перенесенных заболеваний и лекарственной терапии (антибиотиков и сульфамидов). Избыточный прием ряда витаминов приводит к нарушениям метаболических функций – гипервитаминозу.

Простейшая классификация витаминов основана на их физико-химических свойствах, в частности, на растворимости. По этому признаку витамины делят на 2 группы: а) витамины, растворимые в воде; б) витамины, растворимые в жирах и органических растворителях. К водорастворимым витаминам относятся витамины группы В (В₁, В₂, В₆, В₉, В₁₂), витамин РР, витамин Н, витамин С, витамин Р, пантотеновая кислота и витаминоподобные вещества – холин, инозит, пангамовая, липоевая, парааминобензойная кислоты, витамин U, коэнзим Q. К жирорастворимым витаминам относятся витамины группы А, витамины группы D, витамины группы Е, витамины группы К, непредельные жирные кислоты, имеющие 2 и более двойных связей. Антивитамины – вещества, уменьшающие биологическую активность ферментов, являясь или структурными аналогами витаминов и конкурентно препятствуя образованию активных форм ферментов, или ферментами, разрушающими витамины.

Для открытия и обнаружения витаминов в пищевых продуктах или других биологических объектах обычно пользуются качественными реакциями, основанными на образовании характерной цветной реакции какого-либо витамина с соответствующим химическим реактивом.

Цель лабораторной работы – определить содержание водорастворимых витаминов в пищевых продуктах.

Задачи:

1. Определить содержание аскорбиновой кислоты в картофеле, капусте и других пищевых продуктах.
2. Определить содержание витамина Р в чае.

Работа 20. Количественное определение аскорбиновой кислоты

Биологическая роль аскорбиновой кислоты в организме разнообразна. Она принимает участие в окислительно-восстановительных процессах и связана с системой глутатиона. Аскорбиновая кислота участвует в синтезе стероидных гормонов в коре надпочечников и необходима для процесса

гидроксилирования как фактор для проявления действия ферментов гидроксилаз. Она участвует в образовании тетрагидрофолиевой кислоты из фолиевой кислоты, в гидроксилировании лизина в оксизин, пролина в оксипролин, необходимых для образования коллагеновых волокон; ускоряет всасывание железа, активизирует фермент желудочного сока пепсиноген, что особенно важно при недостатке соляной кислоты в желудочном соке.

Принцип метода. *Количественный метод определения аскорбиновой кислоты основан на способности витамина С восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в кислой среде имеет красную окраску, в щелочной – синюю, а при восстановлении обесцвечивается.*

Для предохранения витамина С от разрушения исследуемый раствор титруют в кислой среде щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания.

Исследуемый материал: хвоя, капуста, морковь, картофель, моча.

Реактивы: 0,001 н раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола, 10 % раствор HCl.

Оборудование: весы аптечные; мерные цилиндры; пипетки на 1, 2, 5 мл; фарфоровые ступки с пестиками; бюретка; колбочки для титрования; ножницы; скальпель; стеклянный песок.

ХОД РАБОТЫ. 1. Определение содержания витамина С в капусте. Отвешивают 1 г капусты, растирают в ступке с 2 мл 10 % раствора HCl и стеклянным песком, приливают 8 мл воды и фильтруют. Отбирают для титрования 2 мл фильтрата, добавляют 10 капель 10 % раствора HCl и титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом до розовой окраски. Вычисляют содержание аскорбиновой кислоты в 100 г капусты.

Для расчета содержания аскорбиновой кислоты используют формулу:

$$x = \frac{0,088 \cdot A \cdot \Gamma \cdot 100}{B \cdot B}$$

где x – содержание аскорбиновой кислоты в миллиграммах на 100 г продукта; 0,088 – содержание аскорбиновой кислоты, мг; А – количество титранта, мл; Б – объем экстракта, взятый для титрования, мл; В – количество продукта, взятое для анализа, г; Г – общее количество экстракта; 100 – пересчет на 100 г продукта.

В 100 г капусты содержится 25–100 мг аскорбиновой кислоты, в 100 г шиповника – 500–1500 мг, в 100 г хвои – 200–400 мг.

Определение содержания витамина С в картофеле. Отвешивают 5 г картофеля, растирают в ступке со стеклянным песком и 20 каплями 10 % раствора HCl (чтобы картофель не темнел). Постепенно приливают 15 мл дистиллированной воды. Полученную массу сливают в стаканчик, ополаскивают ступку 2 мл воды, сливают воду в колбочку и титруют 2,6-дихлорфенолиндофенолом до розовой окраски. Рассчитывают содержание аскорбиновой кислоты. В 100 г картофеля содержится 1-5 мг витамина С.

Определение содержания витамина С в моче. Определение содержания витамина С в моче дает представление о запасах этого витамина в организме, так как наблюдается соответствие между концентрацией витамина С в крови и количеством этого витамина, выделяемым с мочой. Однако при гиповитаминозе С содержание аскорбиновой кислоты в моче не всегда понижено. Часто оно бывает нормальным, несмотря на большой недостаток этого витамина в тканях.

У здоровых людей введение per os 100 мг витамина С быстро приводит к повышению его концентрации в крови и моче. При гиповитаминозе С ткани, испытывающие недостаток в витамине, задерживают принятый витамин и его концентрация в моче не повышается. Моча здорового человека содержит 20–30 мг витамина С или 113,55–170,33 мкмоль/сут. У детей уровень этого витамина понижается при цинге, а также острых и хронических инфекционных заболеваниях.

В стаканчик или колбочку отмеривают 10 мл мочи и 10 мл дистиллированной воды, перемешивают, подкисляют 20 каплями 10 % раствора НСL и титруют 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолом до розовой окраски. Расчет содержания аскорбиновой кислоты в моче производят по формуле

$$x = \frac{0,088 \cdot A \cdot B}{B}$$

где x – содержание аскорбиновой кислоты, мг/сут; 0,088 – коэффициент, мг; А – количество титранта, мл; Б – объем мочи, взятой для титрования, мл; В – среднее суточное количество мочи (для мужчин – 1500 мл, для женщин – 1200 мл).

Работа 21. Количественное определение витамина Р в чае

Известно несколько соединений, оказывающих Р-витаминное действие (рутин и др.). В основе их лежит скелет флавона.

Действие витамина Р и витамина С взаимно связано, они участвуют в окислительно-восстановительных процессах. Терапевтическое действие витамина С более эффективно в присутствии витамина Р. При недостатке в организме витамина Р у человека повышается проницаемость капилляров.

Рутин – кристаллическое вещество желто-оранжевого цвета. Содержится в тех продуктах, что и витамин С: в чае, фруктах, ягодах – бруснике, клюкве и др. Количественное определение витамина Р проводят в вытяжке из чая.

Принцип метода. Рутин способен окисляться перманганатом калия; в качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом калия после того, как окислится весь рутин.

Экспериментально установлено, что 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия окисляет 6,4 мкг рутина.

Исследуемый материал: чай.

Реактивы: перманганат калия 0,05 н раствор, индигокармин.

Оборудование: стаканчики или колбочки, бюретка, пипетки.

ХОД РАБОТЫ. К 100 мг чая приливают 50 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию 5 мин. 10 мл экстракта чая отмеривают в стаканчик или колбочку, добавляют 10 мл дистиллированной воды и 5 капель индигокармина (появляется синее окрашивание). Титруют из бюретки 0,05 н раствором $KMnO_4$ до появления устойчивой желтой окраски.

Определяют процентное содержания рутина в чае. Расчет проводят по следующей формуле:

$$x = \frac{3,2 \cdot A \cdot V_1 \cdot 100}{V_2 \cdot P \cdot 1000}$$

где x – содержание витамина Р в препарате, %, 3,2 – стандартный пересчетный коэффициент, А – количество титранта, мл, V_1 – объем, в котором растворена взятая для анализа навеска, мл, 100 – общее количество вещества для расчета процентного содержания, г, V_2 – объем раствора, взятого для титрования, мл, Р – навеска, мг, 1000 – перевод мкг в мг.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты, расчеты и выводы о содержании витаминов.

Контрольные вопросы

Дайте определение понятию «витамины».

1. Как классифицируются витамины? Приведите примеры витаминов разных классов.
2. Какие функции выполняют в организме водорастворимые витамины? Приведите конкретные примеры таких функций водорастворимых витаминов.
3. Каково химическое строение и биологическая роль витаминов B_1 , B_2 , B_6 , B_{12} , РР, Н, С, Р, пантотеновой кислоты?
4. Коферментом каких ферментов является витамин B_1 ? B_2 ? B_6 ? B_{12} ? РР? Н? С?
5. Каковы функции в организме важнейших жирорастворимых витаминов: А, Д, Е, К?
6. Что понимается под «авитаминозом», «гиповитаминозом», гипервитаминозом?»
7. Почему недостаток водорастворимых витаминов быстрее приводит к развитию гиповитаминозов, чем недостаток жирорастворимых?

Лабораторная работа № 7. Физико-химические свойства ферментов

Ферменты – биологические катализаторы белковой природы. Они присутствуют во всех тканях, клетках, внутриклеточных органеллах и биологических жидкостях. Благодаря ферментам обмен веществ в живых организмах протекает с большой скоростью при температуре тела и без участия сильнодействующих химических реагентов.

Ферменты как катализаторы: 1) не вызывают каких-либо реакций, невозможных по термодинамическим законам; 2) увеличивают скорость как прямой, так и обратной реакции обратимого химического процесса; 3) остаются химически неизменными; 4) в очень малых количествах способны превращать несоизмеримо большие массы субстратов.

Согласно современным представлениям ферменты увеличивают скорость химической реакции, снижая энергетический барьер данной реакции. Ведущую роль в механизме ферментативного катализа играют промежуточные фермент-субстратные комплексы, образование которых определяется тонкой структурой активного центра и уникальной структурой всей молекулы фермента.

Ферменты делят на простые и сложные. У простых ферментов функции контактных и каталитических групп активного центра определяются только радикалами аминокислотных остатков, у сложных ферментов активный центр включает также коферменты и ионы металлов.

Цель лабораторной работы – изучить некоторые физико-химические свойства ферментов.

Задачи:

1. Определить влияние температуры и рН на активность ферментов.
2. Изучить специфичность действия ферментов.
3. Провести открытие некоторых классов ферментов.

Работа 22. Влияние температуры на скорость ферментативной реакции

Скорость ферментативных реакций, как и неферментативных, увеличивается при повышении температуры. Но в связи с белковой природой ферментов, повышение температуры может привести к их денатурации и снижению скорости реакции. Денатурация тем значительнее, чем выше температура и чем больше время инкубации.

Исследуемый материал: слюна.

Реактивы: 1 %-ный раствор крахмала, реактив Люголя, дистиллированная вода.

Оборудование: пипетки, пробирки, термостат, спиртовка, ледяная баня, предметные стекла.

ХОД РАБОТЫ. Наливают в 4 пробирки по 0,5 мл крахмала. Еще в 4 пробирки наливают по 0,5 мл разбавленной (1:5) слюны. Берут первую пару пробирок (одна с ферментом, другая – с крахмалом) и помещают в баню со

льдом. Вторую пару оставляют при комнатной температуре. Третью пару пробирок помещают в термостат (37 °С), а четвертую – в кипящую водяную баню. Через 5 минут содержимое каждой пары пробирок сливают вместе, тщательно перемешивают и оставляют стоять еще 10 мин при тех же условиях. Из третьей пробирки отливают 3 капли жидкости и проделывают реакцию с каплей йода на стекле. Если появляется синее окрашивание, растворы оставляют стоять еще 10 мин и после этого повторяют реакцию с йодом на стекле. После этого добавляют по 2 капли реактива Люголя во все пробирки и наблюдают за развитием окраски.

Оформление работы. Результаты записывают в таблицу. Делают выводы о характере влияния температуры на активность амилазы.

Влияние температуры на активность амилазы слюны

№ пробирки	Температура инкубации, °С	Окрашивание с йодом
1	0	
2	20	
3	37	
4	100	

Работа 22. Влияние температуры на активность холинэстеразы

Холинэстераза – фермент, играющий существенную роль в процессе передачи возбуждения холинэргическими нервами на воспринимающие ткани. Холинэстераза расщепляет ацетилхолин – медиатор нервного возбуждения на холин и уксусную кислоту.



В процессе реакции происходит закисление среды за счет накопления уксусной кислоты, что можно обнаружить с помощью индикатора. В работе используется двухцветный индикатор бромтимоловый синий. Зона смены окраски находится в области рН 7,6-6,0, в кислой среде окраска – желтая, в щелочной – синяя, промежуточная окраска – зеленая. Инкубацию фермента и субстрата проводят в различных температурных условиях. Об интенсивности ферментативного гидролиза ацетилхолина судят по окраске инкубационной смеси.

Исследуемый материал: сыворотка крови (разведение 1:50) – источник холинэстеразы.

Реактивы: (готовят на дистиллированной воде, освобожденной от CO₂) 0,5 %-ный раствор ацетилхолина, 0,02 %-ный раствор бромтимолового синего (2,5 г сухого индикатора растирают в ступке с 4,5 мл 0,1 н раствора

едкого натра, полученный раствор переносят в мерную колбу на 50 мл, добавляют 12,5 мл 0,1 н раствора борной кислоты, приготовленного на 0,1М растворе KCl, раствор доводят водой до метки, перед опытом раствор разводят водой в 2 раза).

Оборудование: пробирки, пипетки, термостат, баня со льдом.

ХОД РАБОТЫ. Берут 3 пробирки. Вносят в каждую по 2,5 мл сыворотки крови и по 0,5 мл бромтимолового синего. Одну из пробирок помещают в термостат ° (37 С), вторую оставляют при комнатной температуре, третью помещают в ледяную баню. Через 5 мин, необходимых для выравнивания температуры, во все 3 пробирки вносят по 0,5 мл раствора ацетилхолина. Содержимое пробирок перемешивают и вновь оставляют в соответствующих температурных условиях. Через 10–15 мин отмечают цвет в каждой пробирке.

Оформление работы. Результаты записывают в таблицу. Делают выводы о зависимости скорости реакции от температуры.

Влияние температуры на активность холинэстеразы

№ пробирки	Температура инкубации, °С	Окрашивание с бромтимоловым синим
1	0	
2	20	
3	37	
4	100	

Работа 23. Влияние рН на скорость ферментативных реакций

Все ферменты проявляют максимальную активность при определенном оптимальном значении рН. Ниже и выше оптимума рН наблюдается снижение активности ферментов. Зависимость активности от рН объясняется влиянием на степень ионизации ионогенных групп фермента, а также субстрата.

Оптимум рН для действия амилазы слюны можно определить при взаимодействии ее с крахмалом при различных значениях рН среды. О степени расщепления крахмала можно судит по реакции крахмала с раствором йода. При оптимальном значении рН расщепление крахмала произойдет полностью (окраска с йодом отсутствует). По мере удаления от оптимума рН в кислую или щелочную зоны расщепление крахмала произойдет только частично до стадии декстринов или крахмал вообще не подвергнется расщеплению.

Исследуемый материал: слюна.

Реактивы: 1 %-ный раствор крахмала, реактив Люголя, 15 мМ растворы фосфатного буфера с разными значениями рН (5,5-8,0).

Оборудование: пробирки, пипетки, термостат.

ХОД РАБОТЫ. Наливают в 4 пробирки по 0,5 мл крахмала, 0,5 мл разбавленной (1:5) слюны. Затем в первую пробирку добавляют 0,5 мл буфера с рН 5,8, во вторую пробирку – 0,5 мл буфера с рН 6,5, в третью – 0,5 мл буфера с рН 7,0, и в четвертую – 0,5 мл буфера с рН 8,0. Помещают все пробирки на 10 мин в термостат (37 °С). После этого добавляют по 2 капли реактива Люголя во все пробирки и наблюдают за развитием окраски.

Оформление работы. Результаты записывают в таблицу. Делают выводы о характере влияния рН на активность амилазы.

Влияние рН на активность амилазы слюны

№ пробирки	рН	Окрашивание с йодом
1	5,5	
2	6,5	
3	7,0	
4	8,0	

Работа 24. Специфичность действия амилазы

Специфичность действия выражается в способности ферментов катализировать реакции одного стереоизомера, одного определенного субстрата или группы сходных по строению субстратов, характеризующихся определенным типом химической связи или наличием определенной химической группировки. Это свойство является наиболее важным среди свойств биологических катализаторов. Оно обусловлено наличием в молекуле фермента активного центра, ответственного за каталитическую активность, формирование которого происходит под влиянием субстрата в момент взаимодействия. Специфичность действия в работе изучается на примере α -амилазы слюны и сахаразы, полученной из дрожжей.

α -амилаза катализирует гидролитическое расщепление крахмала с образованием мальтозы. Промежуточными продуктами в данной реакции являются различные декстрины (амино-, эритро-, ахро-, мальтодекстрины). Степень гидролиза крахмала можно контролировать по цветной реакции с йодом. Крахмал дает с йодом синее окрашивание, декстрины в зависимости от размеров молекул окрашиваются с йодом в разные цвета (сине-фиолетовый, красно-бурый, желто-бурый), а конечные продукты с йодом окраски не дают. Второй контрольной пробой может быть реакция на наличие свободных альдегидных групп.

Исследуемый материал: слюна

Реактивы: 1 %-ный раствор крахмала; 1 %-ный раствор сахарозы; 10 %-ный раствор NaOH; 1 %-ный раствор CuSO₄; реактив Люголя; дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки, пипетки, термостат.

ХОД РАБОТЫ. Готовят 2 инкубационные пробы, как указано в таблице, используя в качестве субстратов для амилазы 2 вещества – крахмал и сахарозу.

№ пробы	Амилаза слюны (мл)	Крахмал (мл)	Сахароза (мл)	Реакция Троммера (+, -)	Реакция с йодом (+,-)
1	1	1			
2	1		1		

Пробы выдерживают в термостате 15 мин при 37 °С. Затем с первой пробой проводят 2 реакции: Троммера и реакцию с йодом. Со второй пробой проводят реакцию Троммера.

Оформление работы. Вносят в таблицу результаты реакций. Делают вывод о специфичности амилазы.

Работа 25. Специфичность действия сахаразы

Сахараза катализирует расщепление сахарозы с образованием глюкозы и фруктозы. Действие сахаразы можно обнаружить по появлению в инкубационной среде свободной глюкозы, дающей положительную реакцию Троммера вследствие наличия в молекуле глюкозы свободного полуацетального альдегида. Сахароза не обладает восстанавливающими свойствами.

Исследуемый материал: препарат сахаразы.

Реактивы: 1 %-ный раствор крахмала; 1 %-ный раствор сахарозы; 10 %-ный раствор NaOH; 1 %-ный раствор CuSO₄; реактив Люголя; дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки, пипетки, термостат.

ХОД РАБОТЫ. Готовят 2 инкубационные пробы, как указано в таблице, используя в качестве субстратов для сахаразы 2 вещества – крахмал и сахарозу.

№ пробы	Сахараза (мл)	Крахмал (мл)	Сахароза (мл)	Реакция Троммера (+, -)	Реакция с йодом (+,-)
1	1	1			
2	1		1		

Пробы выдерживают в термостате 15 мин при 37 °С. Затем со второй пробой проводят 2 реакции: Троммера и реакцию с йодом. С первой пробой проводят реакцию Троммера.

Оформление работы. Вносят в таблицу результаты реакций. Делают вывод о специфичности сахаразы.

Работа 26. Открытие ферментов различных классов

Все ферменты делят на 6 классов в зависимости от типа реакций, ими катализируемых.

1. *Оксидоредуктазы* – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции.
2. *Трансферазы* – ферменты, катализирующие реакции переноса различных групп.
3. *Гидролазы* – ферменты, ускоряющие реакции гидролиза.
4. *Лиазы* – ферменты, отщепляющие от субстрата определенные группы негидролитическим путем с образованием двойной связи или. Наоборот, присоединяющие группы к двойным связям.
5. *Изомеразы* – ферменты, ускоряющие реакции изомеризации.
6. *Лигазы (синтетазы)* – ферменты, катализирующие реакции синтеза.

Работа 26.1. Идентификация оксидоредуктаз в биологическом материале

В реакциях, катализируемых оксидоредуктазами, окисляемый субстрат является донором водорода или электронов, роль акцептора могут выполнять различные соединения – коферменты НАД(Р), ФМН, ФАД, КоQ, O₂, органические соединения, цитохромы, ксенобиотики. Для большинства ферментов этой группы рекомендуемые названия – дегидрогеназы или редуктазы. Когда акцептором служит O₂, используется термин оксидаза, если O₂ внедряется в субстрат, фермент называется оксигеназа. Пероксидаза является ферментом, который утилизирует H₂O₂ как акцептор. Каталаза – фермент, способный катализировать реакцию, в которую вовлекается донор-акцепторная пара, представленная двумя молекулами перекиси водорода.

Работа 26.2. Открытие пероксидазы

Ферменты, окисляющие субстраты при участии перекиси водорода, называются пероксидазами. Пероксидазы встречаются особенно широко в растительных клетках, у животных находятся в крови, мышцах, молоке. Субстратами пероксидаз являются фенолы и ароматические амины (пирогаллол, гваякол, гидрохинон, тирозин, бензидин и др.). Пероксидазы представляют собой протеиды, содержащие в качестве активной группы железопорфириновый комплекс. Вследствие этого они угнетаются HCN, H₂S, гидроксиламином, тиомочевинной. Пероксидазы угнетаются также перекисью водорода, поэтому необходимо следить за тем, чтобы избытка ее при пробах на пероксидазу не было. Пероксидазы по сравнению с другими ферментами довольно стойки к инактивации нагреванием.

Исследуемый материал: экстракт хрена.

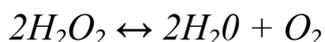
Реактивы: 0,5 %-ный раствор H₂O₂, гваяковая смола.

Оборудование: пробирки, пипетки.

ХОД РАБОТЫ. Добавить к 0,5 мл взвеси измельченного в воде хрена 0,1 мл перекиси водорода и 0,5 мл гваяковой смолы. Появляется интенсивное окрашивание образовавшейся индофеноловой сини.

Работа 26.3. Открытие каталазы

Каталаза – фермент, широко распространенный в клетках как животных, так и растительных организмов. Каталаза ускоряет реакцию разложения перекиси водорода на воду и молекулярный кислород:



Исследуемый материал: кровь, картофельный сок.

Реактивы: 3 %-ный раствор H_2O_2 .

Оборудование: пробирки, пипетки.

ХОД РАБОТЫ. К нескольким каплям крови прилить 1–2 мл 3 %-ного раствора перекиси водорода. Происходит обильное выделение кислорода. Ту же реакцию проделать с картофельным соком.

Работа 26.4. Открытие действия ферментов гидролаз

Ферменты класса гидролаз катализируют реакции распада химических соединений. Причем эти реакции идут с присоединением элементов воды. Действие гидролитических ферментов обратимо. Все ферменты пищеварительного тракта, ускоряющие переваривание белков, жиров и углеводов, относятся к классу гидролаз.

Пепсин – протеолитический фермент, относящийся к классу гидролаз, подклассу пептидгидролаз. Особенностью действия пепсина является то, что оптимум действия фермента находится при рН 1,5-2,5. то есть он максимально активен в сильно кислой среде. Протеолитическую активность фермента можно пронаблюдать, добавив к подкисленному раствору небольшое количество белка фибрина. Фибрин, нерастворимый в воде, под действием пепсина растворяется – происходит ферментативный гидролиз фибрина до растворимых в воде пептидов.

Исследуемый материал: фибрин.

Реактивы: раствор пепсина.

Оборудование: пробирки, пипетки, термостат.

ХОД РАБОТЫ. В пробирку наливают 0,5 мл раствора пепсина и опускают небольшой комочек фибрина. Обе пробирки помещают в термостат (37° С) на 1 час. Наблюдают растворение фибрина.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты, расчеты и выводы о влиянии рН и температуры на активность ферментов. Описать химизм действия ферментов оксидоредуктаз и гидролаз.

Контрольные вопросы

1. Что такое скорость химической реакции: а) для гомогенной реакции? б) для гетерогенной реакции?
2. Какие факторы влияют на скорость химической реакции?
3. Что такое энергия активации?
4. Что такое константа химического равновесия?
5. Какой принцип положен в основу классификации ферментов? Назовите основные классы ферментов.
6. Каковы основные свойства ферментов?
7. Каково строение ферментов? Что называют коферментом, апоферментом? Какова роль этих структурных компонентов фермента в ферментативном катализе?
8. В чем сущность активации и ингибирования ферментов? Какие факторы оказывают активирующее и ингибирующее действие на ферменты?
9. В чем заключается механизм ферментативного катализа?

Лабораторная работа № 8. Определение влияния адреналина на содержание глюкозы в плазме крови

Уровень глюкозы в крови находится под контролем нервной системы и эндокринных желез, поэтому в здоровом организме возможны лишь кратковременные его колебания. Это происходит при стрессовых реакциях, болевых приступах, эмоциональных возбуждениях и связано с выбросом в кровь значительного количества адреналина и АКТГ. Стойкая гипер- и гипогликемия наблюдается при нарушении функции поджелудочной железы и надпочечников.

Инсулин при введении в организм вызывает снижение уровня глюкозы в крови и применяется при лечении сахарного диабета. Особенно чувствительна к снижению уровня глюкозы в крови центральная нервная система, так как глюкоза является для нее основным источником энергии. Поэтому, вводя инсулин с лечебной целью при сахарном диабете, необходимо следить за уровнем глюкозы (гипогликемия может вызвать судороги и привести к летальному исходу). В таких случаях нужно срочно ввести глюкозу или адреналин. Понижение уровня глюкозы в крови под влиянием инсулина обусловлено тем, что он стимулирует синтез гликогена из глюкозы в печени и мышцах и тормозит распад гликогена в печени. Инсулин способствует превращению всосавшихся углеводов в жиры, увеличивает проницаемость клеточных мембран в мышечной и жировой тканях для глюкозы, способствуя переходу глюкозы из крови в ткани и ее окислению. Инсулин устраняет тормозящее действие глюкокортикоидов на гексокиназу (увеличивает ее активность), стимулирует цикл трикарбоновых

кислот, угнетает активность глюкозо-6-фосфатазы и аденилатциклазы, активирует гликогенсинтазу.

Адреналин в высоких концентрациях является сильным ядом. Его физиологическое действие проявляется в ничтожно малых количествах – 0,0001 мг на 1 кг массы. Он быстро разрушается в желудочно-кишечном тракте, поэтому вводят адреналин подкожно и внутримышечно. При подкожном введении адреналина содержание глюкозы в крови увеличивается, наступает гипергликемия и, если уровень ее достигает 8,88 ммоль/л, начинается выделение глюкозы с мочой (глюкозурия). Адреналин оказывает влияние на углеводный обмен, усиливая распад гликогена в печени до глюкозы. Адреналин через аденилатциклазу и 3'-5'-сАМФ вызывает превращение неактивной фосфорилазы «b» в активную фосфорилазу «a», катализирующую распад гликогена в печени. Адреналин в крови инактивируется ферментом моноаминоксидазой. В крови в тканях наряду со свободным адреналином обнаружен комплекс адреналина с белком, который способствует сохранению адреналина в организме. Вводя адреналин в организм кролика и определяя содержание глюкозы до и после введения, можно установить его влияние на углеводный обмен.

Цель лабораторной работы – изучить влияние адреналина на содержание глюкозы в крови.

Задачи:

1. Определить содержание глюкозы до и после введения адреналина.
2. Изучить механизм повышения содержания глюкозы в крови под влиянием адреналина.

Работа 27. Определение влияния инсулина и адреналина на содержание глюкозы в плазме крови

Принцип метода определения глюкозы глюкозооксидантным методом. Метод основан на специфическом окислении глюкозы под влиянием глюкозооксидазы (КФ 1.1.3.4), обладающий высокой субстратной специфичностью по отношению к глюкозе. Этот метод позволяет определить содержание глюкозы в крови в присутствии других восстанавливающих веществ.

Глюкозооксидаза - флавопротеин, простетической группой которого является ФАД. Окисление глюкозы глюкозооксидазой происходит у первого углеродного атома до глюконовой кислоты через промежуточный продукт δ - глюконолактон. Перенос двух атомов водорода на ФАД приводит к его восстановлению, а затем ФАДН₂ передает их на кислород с образованием перекиси водорода в эквимолярных количествах. Образовавшийся пероксид водорода определяется по реакции окислительной конденсации хлорпроизводного фенола с 4-аминофеназоном, катализируемой пероксидазой. Интенсивность возникшей окраски прямо пропорциональна концентрации глюкозы и определяется на ФЭКе (длина волны 500 нм, кювета с длиной светового пути 5 мм).

Исследуемый раствор: кровь интактного кролика; кровь кролика после введения адреналина; кровь кролика после введения инсулина.

Реактивы: эталонный раствор глюкозы (10 ммоль/л); дистиллированная вода; рабочий реактив (содержит глюкозооксидазу, пероксидазу, 4-хлор-3-метилфенол, 4-аминофеназон).

Оборудование: пипетки, химические пробирки, ФЭК, кюветы с длиной оптического пути 5 мм.

ХОД РАБОТЫ. Кровь центрифугируется на центрифуге 10 мин при скорости вращения ротора 3000 об/мин для получения сыворотки. В полученной сыворотке крови определяют содержание глюкозы. Для этого готовят пробы, согласно приведенной таблице.

Раствор	Исследуемая проба (А)	Эталон (Э)	Контроль
Сыворотка крови (мл)	0,02		
Глюкоза (мл)		0,02	
Дистиллированная вода (мл)			0,02
Рабочий реактив	3	3	3

Содержимое каждой пробирки перемешивают, после чего пробирки помещают в термостат на 15 мин при температуре 37 °С. Измеряют оптическую плотность опытных проб (А) и эталона (Э) против контрольного раствора на ФЭКе (длина волны 500 нм).

Расчет производят по формуле:

$$\text{Глюкоза (ммоль/л)} = 10 \cdot A / Э$$

Содержание глюкозы в сыворотке крови у человека в норме колеблется от 3,6 ммоль/л до 6,7 ммоль/л.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и расчеты. Сделать вывод о влиянии адреналина на содержание глюкозы в крови.

Контрольные вопросы

1. Составьте суммарные уравнения реакций расщепления глюкозы до лактат и до конечных продуктов окисления глюкозы.
2. Каковы основные этапы гликолиза?
3. Назовите гормоны, регулирующие содержание глюкозы в плазме крови.
4. Назовите пути устранения лактата из тканей.

Лабораторная работа № 9. Ферментативный гидролиз жиров. Обнаружение кетоновых тел в биологических материалах.

Жиры, или триацилглицерины, практически не всасываются в пищеварительном тракте. В тонкой кишке происходит их гидролиз, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой. Существует несколько типов панкреатических липаз. Одни из них специфичны в отношении эфирных связей в α -положении триацилглицерина, а другие гидролизуют связи в β -положении. Полный гидролиз триацилглицеринов происходит постадийно: сначала гидролизуются α -связи, а затем более медленно гидролизуются β -моноацилглицерины. Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, моно- и диацилглицерины) всасываются в стенках кишечника.

В процессе переваривания и всасывания липидов важную роль играют желчные кислоты. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов переваривания.

Липаза один из ферментов подкласса 1 класса гидролаз. Ферменты, входящие в состав этого подкласса, действуют в присутствии воды на сложно-эфирные связи. Липаза катализирует гидролиз нейтрального жира.

Цель лабораторной работы – изучить условия работы липазы

Задачи:

1. Провести гидролиз жира молока в разных условиях.
2. Построить график активности фермента.

Работа 28. Ферментативный гидролиз жира молока

Липазу можно открыть, добавив ее раствор к молоку, содержащему эмульгированный жир. Полученную смесь подщелачивают раствором карбоната натрия до бледно-розовой окраски на фенолфталеин. В присутствии липазы происходит гидролитическое расщепление жира на глицерин и жирные кислоты, реакция среды при этом сдвигается в кислую сторону, розовая окраска исчезает.

Исследуемый материал: молоко, разведенное в соотношении 1:10.

Реактивы: спиртовой раствор фенолфталеина; 0,01 % раствор NaOH; панкреатин, содержащий липазу.

Оборудование: колбы на 25 мл, мерные цилиндры на 10 мл, пипетки, термостат, кипящая водяная баня, бюретка.

ХОД РАБОТЫ. Готовят 3 колбы для опытных и контрольной проб. Для контрольной пробы липазу (содержащуюся в панкреатине) предварительно кипятят в течение 10 мин на кипящей бане. В каждую колбу наливают молоко и препарат липазы и желчь, как указано в таблице.

Компоненты инкубационной смеси	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Контроль, мл
Молоко (разведенное в соотношении 1:10)	10	10	10
Препарат липазы	1	1	1 (прокипяченная)
Препарат желчи	-	1	-

Приготовленные инкубационные смеси тщательно перемешивают. Затем из каждой колбы отбирают по 2 мл смеси в заранее приготовленные стаканчики для титрования. В каждый стаканчик добавляют по 2 капли раствора фенолфталеина и титруют раствором NaOH до слабо-розового окрашивания. При первом титровании нейтрализуются органические кислоты – молочная и другие, которые присутствуют в молоке до начала действия липазы.

Оставшуюся в колбах смесь помещают в термостат (температура 38-40°C) и через определенные интервалы (10, 20, 30, 40 мин) из каждой пробы отбирают (не вынимая из термостата) по 2 мл смеси и титруют 0,01 моль/л раствором NaOH. Время титрования и объем гидроксида натрия фиксируют в таблице.

Время инкубации, мин	Объем NaOH, пошедшего на титрование, мл		
	Опыт 1	Опыт 2	Контроль
0			
10			
20			
30			

Результаты первого титрования, полученного до начала действия липазы, вычитают из результатов последующих титрований.

На основании полученных данных строят график, где по оси абсцисс откладывают время (в минутах), а по оси ординат – активность липазы, выраженную объемом раствора NaOH (в мл), пошедшего на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени.

Делают выводы об условиях работы липазы.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и расчеты. Сделать вывод о влиянии условий на активность липазы.

Работа 29. Качественные реакции на ацетон и ацетоуксусную кислоту

К кетоновым телам относятся ацетон, β -оксимасляная кислота и ацетоуксусная кислота. Биосинтез кетоновых тел происходит в печени. У здорового человека в печени ацетоацетил-СоА конденсируется с ацетил-СоА с образованием β -окси- β -метилглутарил-СоА. В крови в норме они содержатся в очень небольшом количестве 13,4–185 мкмоль/л (0,14–1,9 мг %), в моче также содержатся ацетоновые тела в небольшом количестве и не выявляются обычными реакциями.

Повышенное выделение кетоновых тел из организма – ацетонурия наблюдается при нарушении жирового или углеводного обмена. Образование кетоновых тел происходит в печени, откуда они доставляются другим тканям в качестве энергетического материала.

Цель лабораторной работы – провести реакцию открытия кетоновых тел в растворе

Задача – провести качественную реакцию на кетоновые тела.

Исследуемый материал: моча, содержащая ацетон и ацетоуксусную кислоту.

Реактивы: нитропруссид натрия, ледяная уксусная кислота, 10 %-ная NaOH.

Оборудование: пробирки, пипетки.

ХОД РАБОТЫ. *Проба Легалья на ацетон.* Ацетон и ацетоуксусная кислота в щелочной среде образуют с нитропруссидом натрия оранжево-красное окрашивание. После подкисления ледяной уксусной кислотой образуется соединение вишневого цвета.

В пробирку наливают 0,5 мл мочи, 0,5 мл NaOH, 0,5 мл нитропруссид натрия. Появляется оранжево-красное окрашивание. Добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты – появляется вишнево-красное окрашивание.

Клинико-диагностическое значение. Гиперкетонемия и кетонурия наблюдаются при сахарном диабете, приеме кетогенной пищи (дефицит углеводов), голодании, гиперпродукции гормонов-антагонистов инсулина, кортикостероидов. При сахарном диабете. Когда печень бедна гликогеном, происходит усиленный распад жиров как источника энергии. В раннем детском возрасте продолжительные желудочно-кишечные заболевания (дизентерия, токсикозы) могут вызвать кетонемиию в результате голода и истощения.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, получившуюся окраску.

Лабораторная работа № 10. Исследование биохимических свойств мочи

Биохимическое исследование мочи имеет существенное значение в спортивной практике. Оно позволяет судить о протекании процессов обмена веществ в организме спортсмена и о реакции его на те или иные физические нагрузки. Наконец, исследование мочи – важный диагностический прием в случае заболеваний.

Моча содержит воду, образованную в организме при окислении органических веществ и введенную извне. В ней растворены конечные или промежуточные продукты обмена веществ. Цвет мочи зависит от содержания в ней пигментов – урохрома, уробилина и других, образующихся в организме из желчных пигментов. Порции мочи, полученные в разное время, имеют неодинаковый состав, так как выделение почками различных веществ происходит неравномерно. Поэтому для анализа мочу обычно берут за сутки.

При анализе мочи сначала определяют ее физические показатели (цвет, запах, прозрачность, удельный вес), затем химические (реакцию и содержание тех или иных нормальных и патологических составных частей).

Изменение цвета мочи может зависеть от ее концентрации (когда мочи выделяется мало, она окрашена более интенсивно), так и от наличия в ней желчных пигментов (зеленовато-коричневый или желто-коричневый), кровяных пигментов (красноватые оттенки) и т.п. Изменение запаха мочи может быть вызвано выделением с мочой лекарственных препаратов или побочных продуктов обмена веществ (например, при наличии ацетона моча приобретает запах глинистых яблок, сильный запах аммиака говорит о щелочном брожении мочи). Помутнение мочи может быть вызвано выпадением в осадок солей. Удельный вес мочи колеблется от 1,010 до 1,025. Это зависит от величины мочеотделения. Повышение удельного веса может свидетельствовать также от появления сахара, белка и др.

Реакция мочи в норме слабокислая. При обильном мясном питании она становится еще более кислой, при растительной – слабощелочной. Обильное выделение кислых продуктов (лактат) после интенсивных физических нагрузок приводит к еще большим сдвигам реакции в кислую сторону. При обильном выделении щелочных веществ (например, в горных условиях), а также при ряде заболеваний реакция мочи может стать более щелочной.

Нормальными составными частями мочи является мочевины, креатинин, соли мочевой и щавелевой кислот, ионы хлора, натрия, аммония, фосфата. **Необычными составными частями** – белок, появляющийся в моче после тяжелых физических нагрузок (спортивная альбуминурия) и при заболеваниях почек или мочевыводящих путей; сахар, как следствие значительного увеличения его содержания в крови (алиментарная гипергликемия; гипергликемия, связанная со значительным эмоциональным возбуждением, или с диабетом); кетоновые тела,

появляющиеся в моче при затруднении окисления ее в тканях (в условиях гор, при недостатке углеводов в питании, при сахарном диабете); желчные пигменты и желчные кислоты (при заболевании печени и желчевыводящих путей); индикан (при усилении в кишечнике процессов гниения); уробилин (при недостаточности печени или усиленном разрушении эритроцитов) и др.

Цель лабораторной работы – провести реакцию на определение нормальных составных частей мочи

Задачи:

1. Определить рН мочи.
2. Провести открытие в моче солей аммония, мочевины, хлоридов, фосфатов и ионов кальция.

Работа 30. Определение некоторых нормальных составных частей мочи

Исследуемый материал: моча.

Реактивы: взвесь $\text{Ca}(\text{OH})_2$ в воде; 10 %-ный раствор NaOH ; 5 %-ный раствор HNO_3 ; AgCl ; насыщенный $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$; 3 %-ный $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$.

Оборудование: пробирки, пипетки, лакмусовая и индикаторная бумага,

ХОД РАБОТЫ

Реакция. О реакции мочи судят по цвету опущенной в нее лакмусовой бумаги: покраснение говорит о кислой, а посинение – о щелочной реакции мочи. Для более точного определения пользуются индикаторной бумагой. Она имеет ряд поперечных полосок. Бумагу погружают в мочу, а затем сравнивают со шкалой и определяют рН мочи.

Открытие солей аммония в моче. В пробирку наливают 2 мл мочи, добавляют 4 капли известкового молока (взвесь $\text{Ca}(\text{OH})_2$ в воде) и слегка прогревают, укрепив у верхнего края пробирки смоченную водой красную лакмусовую бумагу. Через некоторое время она синееет

Результат опыта и уравнение реакции между хлористым аммонием и $\text{Ca}(\text{OH})_2$ записывают.

Открытие мочевины в моче. В пробирку наливают 2 мл мочи, добавляют 6 капель 10 % раствора NaOH и осторожно кипятят. У верхнего края пробирки укрепляют смоченную водой лакмусовую бумагу. Вследствие выделения аммиака, образующегося при гидролизе мочевины, лакмусовая бумага синееет.

Результат опыта и уравнение реакции записывают.

Открытие хлоридов в моче. В пробирку наливают 2 мл мочи, добавляют 1–2 капли 5 %-ного раствора HNO_3 и 1–2 капли AgCl . Выпадает белый осадок.

Результат опыта и уравнение реакции записывают.

Открытие фосфатов в моче. В пробирку помещают 1 мл мочи, подкисляют ее азотной кислотой, добавляют 2 мл 3 %-ного раствора молибденовокислого аммония $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ и нагревают на спиртовке. Постепенно образуется осадок фосфорномолибденового аммония.

Открытие ионов кальция в моче. В пробирку наливают 2 мл мочи и добавляют 4 капли насыщенного раствора щавелевокислого аммония $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$. Сразу же выпадает осадок щавелевокислого кальция.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы. Сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Для чего определять биохимические свойства мочи у спортсменов?
2. Назовите нормальные составные части мочи.
3. Назовите необычные составные части мочи.
4. Конечным продуктом обмена каких веществ является мочевины? Креатинин?

Лабораторная работа 11. Количественное определение креатинина в моче

Креатинин является одним из конечных продуктов азотистого обмена и нормальной составной частью мочи. За сутки с мочой выделяется креатинина у мужчин 8,8–17,7 ммоль (1–2 г/сутки), а у женщин – 1,7–15,9 ммоль (0,8–1,8 г/сутки). Креатинин является ангидридом креатина. Креатин содержится в мышцах (около 80 %), особенно в сердечной, где из него при участии АТФ образуется макроэргическое соединение креатинфосфат, при распаде которого образуется креатинин и фосфат. Креатин в моче взрослого здорового человека отсутствует, появление его в моче называют креатинурией. Однако у детей и подростков моча всегда содержит креатин.

Цель лабораторной работы – определить содержание креатинина в моче.

Задачи:

1. Определить содержание креатинина в моче.
2. Оценить диагностическое значение креатинина

Работа 31. Определение креатинина в моче

Принцип метода. Креатинин при взаимодействии с пикриновой кислотой в щелочной среде образует окрашенные соединения, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации креатинина в моче и сыворотке крови.

Исследуемый материал: моча.

Реактивы: стандартный раствор креатинина (177 мкмоль/л); 2 %-ный раствор пикриновой кислоты; 10 %-ный раствор NaOH; 5 %-ный раствор ТХУ; дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки, пипетки, ФЭК, кюветы.

ХОД РАБОТЫ. Перед определением содержания креатинина мочу разводят в 100 раз. Это разведение учитывают при расчетах. В опытной пробе смешивают 0,5 мл мочи; 0,25 мл дистиллированной воды; 0,25 мл ТХУ; 0,5 мл пикриновой кислоты; 0,5 мл NaOH. Через 20 мин колориметрируют на зеленом светофильтре (длина волны 540 нм) в кювете толщиной 0,5 см против контроля, приготовленного в предыдущей работе. Рассчитывают концентрацию креатинина в моче по формуле с учетом ее разведения:

$$C \text{ (мкмоль/л)} = 50 \cdot 177 \cdot A_{on} / A_{ct}$$

Содержание креатинина суточной моче рассчитываю по формуле:
 $C \cdot 1,5 / 1000 = \text{ммоль/сутки}$, где C – концентрация креатинина в моче в мкмоль/л; 1,5 – суточный диурез в литрах, 1000 – коэффициент перевода мкмоль в ммоль.

Норма креатинина в сыворотке крови – 53–106 мкмоль/л, в суточной моче – 4,4–17,6 ммоль/сутки.

Клинико-диагностическое значение. Определение креатинина проводят для исследования функции почек. Содержание его в сыворотке крови увеличивается при значительном ухудшении функции почек. Креатинемия наблюдается также при закупорке мочевых путей, кишечной непроходимости, тяжелом диабете, механической желтухе, гипофункции надпочечников, голодании. Увеличение креатинина в моче наблюдается при усиленной мышечной работе, лихорадочных состояниях, пневмонии, выраженной недостаточной функции печени. Понижение креатинина в моче – при мышечной дистрофии, голодании, дегенерации почек, лейкемии.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы. Сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается диагностическое значение определения креатинина?
2. В чем заключается принцип метода определения креатинина?
3. При каких заболеваниях происходит повышение креатинина в крови?

Лабораторная работа № 12. Определение содержания лактата и pH в слюне после физической нагрузки

Всякая мышечная деятельность, в том числе связанная со спортивной деятельностью, приводит к резкому усилению расходования АТФ в мышцах и увеличению потребности организма в кислороде. Это объясняется

повышением интенсивности окислительных процессов, обеспечивающих ресинтез непрерывно расходующейся АТФ.

Наиболее быстрым путем ресинтеза является реакция перефосфорилирования между АТФ и креатинфосфатом, но возможности этого пути невелики из-за ограниченного содержания креатинфосфата в мышцах. Если бы на ресинтез АТФ расходовался только креатинфосфат, всего содержания его в мышцах хватило бы на 2–3 сек работы максимальной интенсивности. Наиболее эффективный путь ресинтеза АТФ – окислительное фосфорилирование, т. е. генерирование АТФ в ходе аэробного окисления различных субстратов. Однако чтобы оно протекало без затруднений, необходимо соответствие между запросом организма в кислороде и фактическим его потреблением.

При выполнении большинства спортивных нагрузок фактическое потребление кислорода много ниже кислородного запроса. Так, при беге 100 м кислородный запрос составляет 7 л, а фактически потребляется не более 0,5 л. При беге на 400 м кислородный запрос равен 11–13 л, а фактически потребляется менее 3 л. При беге на 10000 м имеется соответственно следующие величины: 150 л и 125 л.

В этих условиях существенная роль в энергетическом обеспечении работы принадлежит гликолизу, анаэробному расщеплению углеводов, заканчивающуюся образованием лактата, который уже после работы подвергается дальнейшему окислению и частично используется для ресинтеза гликогена.

Чем выше интенсивность работы, тем больше интенсивность гликолиза. Поэтому при выполнении кратковременных физических упражнений максимальной и субмаксимальной мощности организм использует в качестве субстрата окисления преимущественно углеводы, а при длительных, но менее интенсивных нагрузках – липиды и продукты их метаболизма (жирные кислоты, кетоновые тела). В период отдыха эта группа веществ также является основным субстратом окислительных реакций, поставляющих энергию (в форме АТФ), необходимую для ресинтеза креатинфосфата, гликогена, белков и др.

Источником используемых работающими мышцами углеводов служит прежде всего содержащийся в них гликоген. При кратковременных физических нагрузках (и в начале всякой работы) он преимущественно и потребляется. Но чем длительнее работа, тем большее значение приобретают гликогенные запасы печени, в которой усиливается процесс гликогенолиза, а образующийся сахар поступает в кровь и потребляется мышцами.

Уровень сахара в крови зависит от соотношения поступления его в кровь из печени и потребления мышцами. Если мобилизация гликогена в печени запаздывает, угнетается или ослабевает вследствие резкого снижения его содержания, то концентрация сахара в крови уменьшается. При кратковременных спортивных нагрузках обычно наблюдается повышение уровня сахара в крови (вплоть до высокой степени гипергликемии), при

очень длительных – его понижение. Однако у малотренированных спортсменов снижение содержания сахара в крови могут вызывать и кратковременные нагрузки максимальной интенсивности.

Использование при мышечной нагрузке в качестве источника энергии углеводов и липидов находится в реципрокных отношениях, т.е. увеличение потребления углеводов сопровождается уменьшением использования липидов, и, наоборот. При высоком уровне сахара в крови содержание в ней свободных жирных кислот невелико, при низком уровне сахара оно возрастает. Интенсивная мобилизация сахара угнетает липолиз и образование жирных кислот в жировых депо, а повышенный липолиз резко ослабляет процесс гликогенолиза в печени.

Таковы же отношения между содержанием в крови лактата и кетоновых тел: при высоком уровне лактата содержание кетоновых тел не выше, чем в состоянии покоя, но при понижении уровня лактата (в время выполнения длительных нагрузок или в период отдыха) содержание кетоновых тел возрастает, что свидетельствует об усилении окисления жирных кислот и переходе организма с углеводных на липидные источники энергии.

Нагрузка высокой интенсивности, сопровождающаяся активным гликолизом, а, следовательно, резким повышением уровня лактата в крови, приводит к уменьшению щелочного резерва крови. Однако в связи с тем, что буферность крови достаточно велика, существенных изменений рН крови обычно не происходит. Иное наблюдается в биологических жидкостях (моча, слюна), обладающих меньшей буферностью, чем кровь, – величина рН в них несколько снижается. Таким образом, изменений кислотности мочи и слюны может также характеризовать реакцию организма на физические нагрузки, отражая до известной степени процессы, происходящие в работающих мышцах.

Цель работы – определить влияние физической нагрузки биохимические параметры слюны.

Задачи:

1. Определить рН слюны.
2. Оценить содержание лактата в слюне.

Работа 32. Влияние физических нагрузок различного характера на активную реакцию слюны и содержание в ней лактата

Исследуемый материал: слюна.

Реактивы: дистиллированная вода.

Оборудование: стаканчики, пробирки, индикаторная бумага, рН-метр, анализатор молочной кислоты и глюкозы.

ХОД РАБОТЫ. Четирем испытуемым предлагают тщательно прополоскать рот. Затем каждому из них дают по 20 мл дистиллированной воды с тем, чтобы он держал ее во рту, размешивая языком в течение 2–3 мин. Полученные пробы слюны выливают в стаканчики, отмеченными

инициалами испытуемых и цифрой 1 (первая проба – уровень покоя). После этого половине испытуемых предлагают бежать на месте в максимально высоком темпе, с подниманием колена до горизонтального положения бедра и энергичными движениями руками в течение 30 сек. Второй половине испытуемых – в умеренном темпе («рысцой») в течение 3 мин. По окончании бега у всех испытуемых снова собирают пробы слюны (как описано выше) – в новые стаканчики (поставив их инициалами и цифрой 2).

В чистые пробирки выливают по 1 мл слюны из 1-го и 2-го стаканчиков и определяют ее рН с помощью универсального индикатора (или рН-метра). В пробах слюны определяют также содержание молочной кислоты с помощью анализатора молочной кислоты и глюкозы.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы. Сделать выводы.

Контрольные вопросы

1. Когда уровень молочной кислоты повышается в большей степени – при выполнении темповых упражнений со штангой или при медленно выполняемых жимах?
2. Можно ли ожидать повышения уровня кетоновых тел в крови после лыжных гонок на 30 км? Дайте обоснованный ответ.
3. Что может явиться причиной уменьшения содержания сахара в крови при выполнении кратковременных спортивных нагрузок максимальной и субмаксимальной интенсивности? Дайте обоснованный ответ.

СЕМИНАРСКИЕ ЗАНЯТИЯ

Тема 1. Гликолиз, цикл трикарбоновых кислот

Вопросы для подготовки к семинару

1. Как осуществляются анаэробные превращения гликогена и глюкозы (гликолиз)? Как осуществляется ресинтез АТФ в ходе гликолиза? Какова энергетическая эффективность гликолиза?
2. Какие превращения происходят в аэробной фазе углеводного обмена?
3. Как превращения цикла трикарбоновых кислот (главного этапа аэробной фазы углеводного обмена) связаны с системой переноса протонов и электронов на кислород и ресинтеза АТФ?
4. Какие химические превращения происходят в процессе устранения образующейся в ходе гликолиза молочной кислоты?

Литература

[3], [4], [5], [8]

Тема 2. Субстратное и окислительное фосфорилирование. Хемиосмотическая теория митчелла

Вопросы для подготовки к семинару

1. Чем отличаются процессы биологического окисления от окисления, происходящего вне организма?
2. Какие промежуточные переносчики обеспечивают транспортировку протонов и электронов от окисляемого вещества на кислород?
3. Каковы особенности молекулярного строения пиридиновых и флавиновых дегидрогеназ, цитохромов? Какие факторы питания необходимы для синтез этих ферментов?
4. Каков энергетический эффект биологического окисления?
5. Каковы особенности молекулярного строения АТФ и какова ее роль в живых организма?
6. Что такое окислительное и субстратное фосфорилирование?
7. Механизм окислительного фосфорилирования согласно хемиосмотической теории Митчелла.

Литература

[3], [4], [5], [8]

Тема 3. Интеграция углеводного, липидного и белкового обмена

Вопросы для подготовки к семинару

1. В чем проявляется взаимосвязь превращений углеводов, липидов и белков?
2. Какие общие промежуточные продукты образуются при распаде углеводов, липидов, белков?
3. В чем состоит центральная роль ацетил-КоА в превращениях углеводов, липидов, белков?
4. Какие важнейшие системы обеспечивают регуляцию обмена веществ в организме человека?
5. Написать интегральную схему метаболизма углеводов, липидов, белков.

Литература

[3], [4], [5]

Тема 4. Биохимические механизмы мышечного сокращения

Вопросы для подготовки к семинару

1. Каково содержание воды, белков, липидов, углеводов и минеральных солей в мышечной ткани?
2. Какие макроэргические соединения содержатся в мышечной ткани, какова их концентрация и локализация?
3. Каково молекулярное строение сократительных элементов мышечного волокна – миофибрилл?
4. Каковы химические реакции обеспечивают мышечное сокращение?
5. Каковы химические превращения происходят при расслаблении мышц?
6. Теория скользящих нитей.

Литература

[3], [5]

Тема 5. Соотношение анаэробных и аэробных механизмов ресинтеза АТФ в условиях физической нагрузки

Вопросы для подготовки к семинару

1. Какова скорость расходования АТФ при напряженной мышечной работе?
2. Что понимается под емкостью, мощностью, скоростью развертывания и эффективностью процессов ресинтеза АТФ?

3. Каковы мощность, емкость и скорость развертывания креатинфосфокиназной реакции и какие биохимические факторы их определяют?
4. Какова роль креатинфосфокиназной реакции в энергетическом обеспечении мышечной работы?
5. Каковы мощность, емкость и скорость развертывания гликолиза и какие биохимические факторы их определяют?
6. Какова роль гликолиза в энергообеспечении мышечной работы?
7. В чем заключается сущность миокиназной реакции и какова ее роль в энергетическом обеспечении мышечной работы?
8. Каковы максимальная мощность, емкость, скорость развертывания и эффективность аэробного ресинтеза АТФ и какие биохимические факторы их определяют?
9. Какова роль аэробного пути ресинтеза АТФ в энергетическом обеспечении мышечной работы?

Литература

[3], [4], [5]

Тема 6. Биохимический контроль в спорте. Способы повышения физической работоспособности

Вопросы для подготовки к семинару

1. Какие задачи могут решаться средствами биохимического контроля в процессе занятий физической культурой и спортом?
2. Что может быть объектом биохимических исследований занимающихся физической культурой и спортом?
3. Охарактеризуйте методы биохимического контроля, используемые для оценки срочного тренировочного эффекта.
4. Охарактеризуйте методы биохимического контроля, используемые для контроля за состоянием тренированности.
5. Охарактеризуйте методы биохимического контроля, используемые для контроля за ходом восстановления после утомления.
6. Чем отличаются ответные реакции по биохимическим показателям тренированного и нетренированного организма на стандартные и предельные нагрузки?

Литература

[3], [5]

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Альбертс, Б. Молекулярная биология клетки : в 3 т. / Б. Альбертс, Д. Брей, Дж. Льюис, М. Рафф, К. Робертс, Дж. Уотсон. – 2-е изд. – М. : Мир, 1994.
2. Березов, Т. Т. Биологическая химия / Т. Т. Березов, Б. Ф. Коровкин. – М. : Медицина, 1998.
3. Биохимия : учебник для институтов физической культуры / под ред. Н. И. Волкова и В. В. Меньшикова. – М. : Физкультура и спорт, 1986.
4. Биохимия : краткий курс с упражнениями и задачами / под ред. Е.С. Северина, Н. Я. Николаева. – М. : ГЭОТАР-МЕД, 2001.
5. Волков, Н. И. Биохимия мышечной деятельности / Н. И. Волков, Э. Несен Н., А. А. Осипенко, С. Н. Корсун. – Киев : Олимпийская литература, 2000.
6. Интерактивные технические средства обучения: практическое руководство / сост. : А. Г. Суковатый, А. В. Казанцев, К. Н. Захарьин, А. В. Сарафанов. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 81 с.
7. Мусил, Я. Современная биохимия в схемах / Я. Мусил, О. Новакова, К. Кунц. – М. : Мир, 1984.
8. Николаев, А. Я. Биологическая химия / А. Я. Николаев. – М. : Высшая школа, 1989.
9. СТО 4.2-07-2008. Система менеджмента качества. Общие требования к построению, изложению и оформлению документов учебной и научной деятельности [текст] / разработ. Т. В. Сильченко, Л. В. Белошапко, В. К. Младенцева, М. И. Губанова. – Введ. впервые 09.12.2008. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 47 с.
10. Пустовалова, Л. М. Практикум по биохимии / Л. М. Пустовалова. – Ростов н/Д : Феникс, 1999.
11. СТО 4.2-07-2008. Система менеджмента качества. Общие требования к построению, изложению и оформлению документов учебной и научной деятельности [текст] / разработ. Т. В. Сильченко, Л. В. Белошапко, В. К. Младенцева, М. И. Губанова. – Введ. впервые 09.12.2008. – Красноярск : ИПК СФУ, 2008. – 47 с.
12. Филлипович, Ю. Б. Основы биохимии / Ю. Б. Филлипович. – М. : Агар, 1999.
13. Яковлев, Н. Н. Руководство к практическим занятиям по общей биохимии и биохимии спорта / Н. Н. Яковлев, Н. И. Орещенко, Н. Р. Чаговец. – М. : Физкультура и спорт, 1973.