

072275
447

210

Министерство образования Республики Беларусь

Учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины»

Л. А. БЕЛЯЕВА

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Практическое пособие

для студентов биологического факультета
специальности 1 – 31 01 01 02
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»

Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины
2017

УК 9072

Установа адукацыі
"Гомельскі дзяржаўны ўніверсітэт
імя Францыска Скарыны"
БІБЛІЯТЭКА

Гомель
ГГУ им. Ф. Скорины
2014

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

УДК 577:637.047:636.085.16(075.8)

ББК 28.072:45.451.2я73

Б 447

Рецензенты:

кандидат химических наук В. А. Филиппова;

кандидат сельскохозяйственных наук Л. А. Евтухова

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом
учреждения образования «Гомельский государственный
университет имени Франциска Скорины»

Беляева, Л. А.

Б 447 Биологически активные вещества : практ. пособие /
Л. А. Беляева ; М-во образования РБ, Гом. гос. ун-т им.
Ф. Скорины. – Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины, 2014. – 48 с.
ISBN 978-985-439-861-7

Практическое пособие по спецкурсу «Биологически активные вещества» содержит лабораторные работы, выбор тем которых обусловлен необходимостью более подробного изучения студентами химического состава растительных и животных организмов и протекающих в них процессов. Особое внимание уделяется методике проведения эксперимента, краткому пояснению результатов опыта и математической обработки.

Адресовано студентам IV курса специализации «Биохимия» специальности 1 - 31 01 01 02 «Биология (научно-педагогическая деятельность)».

УДК 577:637.047:636.085.16(075.8)

ББК 28.072:45.451.2я73

ISBN 978-985-439-861-7

© Беляева Л. А., 2014

© УО «Гомельский государственный
университет им. Ф. Скорины», 2014

Содержание

Введение	4
Тема 1. Катехины	5
Тема 2. Витамин С (аскорбиновая кислота, антицинготный)	10
Тема 3. Витамин Р (рутин, биофлавоноид)	18
Тема 4. Ферменты	22
Тема 5. Углеводы	28
Тема 6. Липиды	38
Литература	45

Введение

Изучение биохимических процессов на молекулярном уровне с широким привлечением физико-химических методов исследования способствует познанию основ жизнедеятельности. В настоящее время особое внимание уделяется решению проблем, связанных с выяснением сущности таких процессов, как дыхание, зрение, мышление и т. д. Важнейшая роль в этих процессах принадлежит биологически активным веществам.

Таким образом, спецкурс «Биологически активные соединения», изучающий химический состав растительных и животных организмов и протекающие в них биологические процессы, необходим и имеет большое значение для подготовки специалистов ряда отраслей промышленности.

Практическое пособие по спецкурсу «Биологически активные соединения» является важным составляющим компонентом научно-методического обеспечения учебного процесса в высших учебных заведениях по специальности 1-31 01 01 «Биология (научно-педагогическая деятельность)».

Каждое занятие состоит из теоретической и практической частей. В теоретической части отражены современные представления по теме занятия; в конце приводится список вопросов для самоконтроля, целью которых является более полное усвоение изначального материала и делает процесс обучения более самостоятельным и прочным.

Выбор тем обоснован необходимостью более подробного изучения специфических вопросов биохимии биологически активных веществ. В лабораторных работах большое внимание уделяется методике проведения эксперимента, краткому пояснению оформления результатов опыта и математической обработки. Лабораторные работы подбираются таким образом, что опыты подтверждают выкладки, приведённые в теоретической части.

Использование практического пособия по спецкурсу «Биологически активные соединения» будет способствовать развитию у студентов навыков грамотного применения фундаментальных основ курса для решения теоретических, практических и экспериментальных проблем химико-биологического характера.

Данное практическое пособие предназначено для студентов IV курса специализации 1-31 01 01 – 02 05 «Биохимия».

Тема 1. Катехины

Основные понятия по теме

1.1 Общая характеристика катехинов

Катехины – органические вещества из группы флавоноидов. Они представляют собой полифенольные соединения и являются сильными антиоксидантами. Катехины – наиболее восстановленная группа флавоноидных соединений. Встречаются в четырех изомерных формах благодаря наличию двух ассиметричных атомов углерода.

Характерные представители – катехин и эпикатехин, являющиеся стереоизомерами. Они обладают способностью при помощи ферментов гидролаз присоединять у третьего углеродного атома остаток галловой кислоты – галлоил. В результате образуются сложные эфиры (так называемые галлосоединения), которые именуются соответственно катехингаллатами и эпикатехингаллатами.

Катехины обнаружены во многих съедобных плодах (яблоках, грушах, персиках, абрикосах, айве, сливах, вишнях, цитрусовых) и ягодах (землянике, смородине, малине, крыжовнике, бруснике). Особенно много этих соединений содержится в молодых побегах чайного растения (до 20–25 % от сухой массы) и акации катеху (отсюда название), в винограде (главным образом в косточках и кожице), бобах какао, обыкновенной и черноплодной рябине, незрелой хурме. Больше всего катехинов содержится в белом чае. Немного меньше в зелёном чае. Из-за процессов окисления при ферментации чая в чёрном чае уменьшено содержание катехинов. Из листьев чая катехины получают в промышленном масштабе. Катехины также содержатся в черном шоколаде.

Окислительные превращения катехинов играют важную роль в производстве какао, виноделии и особенно в чайной промышленности. Это связано с тем, что продукты окисления катехинов обладают приятным, слабвяжущим вкусом и окраской.

При полимеризации катехинов образуются дубильные вещества. Дубильные вещества (танины) широко распространены в природе. Они встречаются у высших растений, особенно у двудольных, в коре и древесине деревьев и кустарников, а также в подземных частях зеленых многолетних растений.

1.2 Физические свойства катехинов

Катехины – бесцветные кристаллические вещества, часто обладают горьковато-вяжущим вкусом, хорошо растворимы в воде и спирте. Катехин, эпикатехин и эпикатехингаллат были найдены в виде мономеров. Производными катехинов и эпикатехинов являются димеры и тримеры.

Молекулярная масса трёх мономеров: катехина, эпикатехина и эпикатехингаллата составляет 293, 294 и 445 соответственно.

Растворимость. Некоторые фенольные вещества растворимы в воде, некоторые – в жирах. В целом, катехины являются жирорастворимыми, а пропианидины (антоцианы) – водорастворимыми соединениями. Их растворимость в воде и жирах оказывает значительное влияние на антиоксидантные свойства.

Точка плавления катехинов, эпикатехинов и эпикатехингаллатов – 174°, 236° и 236° С соответственно.

Светопоглощение максимально при длине волны 264–280 нм.

Оптическая активность в этаноле для катехинов, эпикатехинов и эпикатехингаллатов составляет соответственно 0°, 58,3° и 188°.

1.3 Химические свойства катехинов

Донация водорода. Фенольные вещества содержат большое количество гидроксильных групп. Это позволяет им проявлять антиоксидантные свойства и поглощать атомарный кислород. Поэтому их относят к восстанавливающим агентам. Они также обладают свойством образовывать комплексы металлов; могут поглощать и нейтрализовывать свободные радикалы и останавливать целные реакции. Их антиоксидантные свойства в 5 раз превосходят антиоксидантный потенциал витаминов С и Е.

Стабильность. Полифенолы из виноградных семян чрезвычайно чувствительны к кислороду, кислотам и щелочам и менее чувствительны к действию высоких температур. Бесцветные фенольные соединения, такие как катехины и эпикатехины, легко подвержены окислению во фруктах и овощах, ввиду присутствия полифенолоксидаз, при участии которых происходит порча фруктов и окисление соков.

1.4 Биологическая роль катехинов

Катехины обладают высокой биологической активностью. В чистом виде катехины применяются редко. Функции катехинов следующие:

- регулируют проницаемость капилляров;
- увеличивают упругость их стенок;
- способствуют более эффективному использованию организмом аскорбиновой кислоты;
- обладают Р-витаминной активностью;
- лекарственные препараты и БАД, содержащие катехины и другие биофлавоноиды, широко используют при лечении заболеваний, связанных с нарушениями функций капилляров, отёках сосудистого происхождения и т. п.;
- обладают антимикробными свойствами и применяются при лечении дизентерии (например, катехины чая);
- подавляют перекисидацию липидов, ведущую к затвердению артерий;
- усиливают иммунитет организма;
- улучшают метаболизм углеводов. Этим они помогают развиваться в пищеварительном тракте полезным бактериям, и, возможно, способствуют потерям жира;
- играют важную роль в технологии пищевых производств, таких как ферментация чая, виноделие;
- катехины полезны для укрепления иммунной системы и для лечения опухолей;
- антиоксидантные свойства многих растительных продуктов в значительной мере обусловлены именно содержанием катехинов. Полезные защитные свойства катехинов могут быть проиллюстрированы на примере чая.

Однако, для того чтобы эти самые катехины начали свое «антиокисление», недостаточно их просто проглотить. Катехины, попадающие в организм естественным путем, усваиваются организмом лишь частично – около 80 % этих полезных веществ из организма выводится. Одновременное употребление чая с некоторыми продуктами питания значительно повышает степень усвоения катехинов. Специалисты провели исследование, целью которого было выявление влияния употребляемых совместно с зеленым чаем продуктов на усвоение организмом четырех основных катехинов: эпикатехина, эпигаллокатехина, эпигаллокатехингаллата и эпикатехингаллата. В качестве «спутников» чая испытывались аскорбиновая кислота, различные виды молока (коровье, соевое и рисовое) и соки цитрусовых (апельсиновый,

грейпфрутовый, лимонный и лаймовый). В ходе исследований выяснилось, что все «спутники» улучшают усвоение катехинов. В небольшой степени – молоко, в заметной – аскорбиновая кислота и кардинально (до 98 % для некоторых катехинов) – соки цитрусовых. Можно предположить, что по «катехиновой результативности» черный чай с лимоном сравним с зеленым чаем без лимона.

Антиоксидантный эффект присущ и катехинам из брокколи, шпината, моркови, клубники. Катехины напрямую нейтрализуют радикалы, поступающие из окружающей среды, и способствуют регенерации других антиоксидантов, таких как витамин E.

Рекомендованная доза катехинов – 100–500 мг в день.

Лабораторная работа

Капельный метод определения катехинов в яблоках и грушах (по Л. И. Вигорову)

Цель работы: определить наличие катехинов в яблоках и грушах.

Принцип метода. Катехины, реагируя с солянокислым раствором ванилина, образуют соединения, окрашенные в розовый или красный цвет. Используя указанную реакцию, можно быстро определить содержание катехинов в яблоках или грушах.

Реактивы, оборудование и исследуемый материал: солянокислый раствор ванилина; сернистокислый натрий (1 %-ный раствор); хроматографическая бумага; пинцет; скальпель; пипетки; терка; ступка; чашка Петри; марля; вентилятор; плоды яблок и груш.

Порядок выполнения работы

Хроматографическую бумагу размером 10 x 10 см пропитывают 1 %-ным раствором сернокислого натрия и высушивают. Через всю толщину мякоти исследуемых плодов вырезают полулунные ломтики, доходящие до семенных камер. Из ломтиков отжимают сок. Каплю сока пипеткой наносят на хроматографическую бумагу и место нанесения нумеруют графитовым карандашом (на один кусок бумаги наносят 8–10 образцов сока). Бумагу высушивают на воздухе комнатным вентилятором. Высушенную бумагу опрыскивают солянокислым раствором ванилина. В зависимости от содержания

катехинов в плодах, места нанесения образцов сока на бумагу окрашиваются в розовый, светло-красный или красный цвета.

Сделать вывод.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Дать общую характеристику катехинов.
2. Охарактеризовать физические и химические свойства катехинов.
3. Указать биологическую роль катехинов.

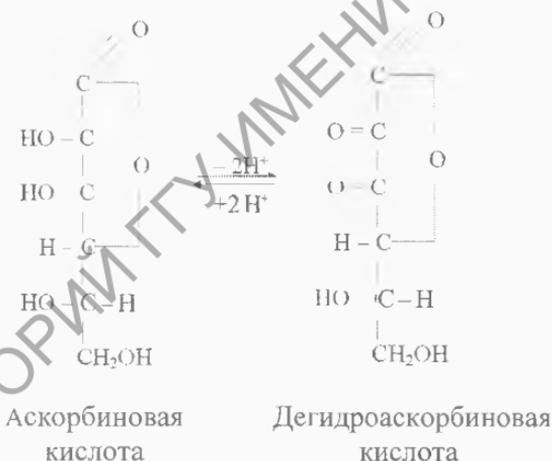
РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Тема 2. Витамин С (аскорбиновая кислота, антицинготный)

Основные понятия по теме

2.1 Химическое строение и свойства витамина С

Витамин С был выделен в 1928 г., но связь между заболеваемостью цингой и недостатком витамина была доказана только в 1932 г. Витамин С является γ -лактоном, близким по структуре к глюкозе. Его молекула имеет два ассиметрических атома углерода (^4C и ^5C) и четыре оптических изомера. Биологически активна только L-аскорбиновая кислота. При окислении аскорбиновой кислоты (АК) образуется дегидроаскорбиновая кислота (ДАК):



Обратный процесс восстановления ДАК и АК катализируется дегидроаскорбинредуктазой в присутствии глутатиона и НАДФН.

Обратимое окисление АК в ДАК вносит существенный вклад в формирование окислительно-восстановительного потенциала клеток.

Водные растворы аскорбиновой кислоты быстро окисляются в присутствии кислорода даже при комнатной температуре. Скорость деградации возрастает с повышением температуры, при увеличении рН раствора, под действием УФ-лучей, в присутствии солей тяжелых металлов. Аскорбиновая кислота разрушается в процессе приготовления пищи и хранения продуктов.

2.2 Метаболизм

Аскорбиновая кислота всасывается путем простой диффузии на всем протяжении желудочно-кишечного тракта, но преимущественно это происходит в тонком кишечнике. После всасывания в кровь она циркулирует в плазме, где связывается с различными высокомолекулярными соединениями белковой и небелковой природы. Витамин С легко проникает в лейкоциты, тромбоциты, а затем -- во все ткани. Содержание аскорбиновой кислоты в лейкоцитах и тромбоцитах выше, чем в плазме крови. Депонируется витамин С в задней доле гипофиза, коре надпочечников, глазном эпителии, промежуточных клетках семенных желез, яичниках, печени, мозге, селезенке, поджелудочной железе, лёгких, почках, стенке кишечника, сердце, мышцах, щитовидной железе. Метаболизируется преимущественно в печени в дезоксиаскорбиновую и далее в щавелевую, треоновую, ксилоную и ликсоновую кислоты. Аскорбат и продукты его распада экскретируются с мочой, калом, потом, грудным молоком.

2.3 Биохимические функции витамина С

Витамин С выполняет разнообразные биохимические функции:

- занимает доминирующее положение во внеклеточной антиоксидантной защите. Он является также важнейшим внутриклеточным антиоксидантом. Антиоксидантная функция аскорбиновой кислоты объясняется ее способностью легко отдавать два атома водорода, используемых в реакциях обезвреживания свободных радикалов. В высоких концентрациях этот витамин «гасит» свободные радикалы кислорода. Важной функцией аскорбата является обезвреживание свободного радикала токоферола (витамина Е), благодаря чему предупреждается окислительная деструкция этого главного антиоксиданта клеточных мембран. Как антиоксидант аскорбиновая кислота необходима для образования активных форм фолиевой кислоты, защиты железа гемоглобина и оксигемоглобина от окисления, поддержания железа цитохромов P₄₅₀ в восстановленном состоянии;
- участвует во всасывании железа из кишечника и высвобождении железа из связи его с транспортным белком крови – трансферрином, облегчая поступление этого металла в ткани;
- он может включаться в работу дыхательной цепи митохондрий, являясь донором электронов для цитохрома С;
- аскорбат принимает участие в реакциях гидроксирования:

а) гидроксилирование «незрелого» коллагена, осуществляемое пролингидроксилазой с участием витамина С, ионов железа, α -кетоглутарата и кислорода. Витамин С нужен также для образования оксилизина в коллагене. Остатки оксилизина в коллагене служат для образования участков связывания с полисахаридами. Коллаген – основной структурный материал организма, в том числе сосудов, десен, зубов, соединительной и костной тканей, он необходим для нормального функционирования всей костно-мышечной системы;

б) гидроксилирование триптофана в 5-гидроксириптофан (в реакции синтеза серотонина);

в) реакции гидроксилирования при биосинтезе гормонов корковой и мозговой части надпочечников и щитовидной железы. Гормоны этих желез ответственны за устойчивость и адаптацию организма к изменяющимся условиям среды, а также за его способность сопротивляться различным заболеваниям;

г) гидроксилирование β -бутиробетанина при биосинтезе карнитина;
– активно участвует в обезвреживании токсинов, антибиотиков и других чужеродных для организма соединений, осуществляемых оксигеназной системой цитохромов P₄₅₀. В составе оксигеназной системы витамин С играет роль прооксиданта, т. е. обеспечивает образование свободных радикалов кислорода (так называемое Fe²⁺-аскорбат-стимулируемое ПОЛ, т. е. перекисное окисление липидов). Взаимодействие аскорбата с ионами железа или меди в присутствии пероксида водорода вызывает мощный прооксидантный эффект, поскольку при этом образуется гидроксильный радикал (ОН[•]), инициирующий реакции ПОЛ. Усиление прооксидантного действия витамина С приводит к нежелательным последствиям, особенно в условиях «перегрузки» организма железом.

Основным антиоксидантом, препятствующим прооксидантному действию витамина С, является витамин Е. Необходимо подчеркнуть, что выраженный антиоксидантный эффект аскорбата проявляется только при совместном его введении с токоферолом, поскольку именно витамин Е способен эффективно устранять свободные радикалы жирных кислот и их перекиси, образующиеся в реакциях Fe²⁺-аскорбатстимулируемого ПОЛ.

Таким образом, аскорбиновая кислота стабилизирует витамин Е, который легко разрушается, а витамин Е усиливает антиоксидантное действие витамина С. Помимо токоферола синергистом действия аскорбата является витамин А;

– является антиканцерогеном не только в силу его антиоксидантных свойств, но и в силу способности непосредственно предотвращать нитрозаминовый канцерогенез (эти сильные канцерогены образуются в кислой среде желудка из нитритов и аминокислотных соединений пищи).

Однако аскорбат не защищает от влияния уже образовавшихся нитрозаминов, поэтому консервированные мясные продукты необходимо употреблять с овощами и зеленью, богатыми витамином С;

- улучшает функционирование иммунной системы. Известно, что иммунные клетки накапливают витамин С в количестве, в 100 раз превышающем его содержание в крови;

- обладает бактерицидными свойствами по отношению к стафилококку и стрептококку;

- имеет большое значение для нормальной функции клеток головного мозга. Так, у 60 % больных болезнью Паркинсона выявлена недостаточность витамина С;

- улучшает метаболизм липидов, способствуя нормализации обмена холестерина, защищает холестерин и липопротеиды от окисления, которое ведёт к ускоренному развитию атеросклероза, предотвращает повышение артериального давления.

2.4 Гиповитаминоз

Уже незначительный дефицит витамина С проявляется ощущением усталости, снижением аппетита, подверженностью простудным заболеваниям. Характерно появление легких синяков (кровоизлияний) на коже. Кровоточивость десен – уже достаточно позднее проявление гиповитаминоза С. Глубокий дефицит витамина С приводит к заболеванию цингой (скорбутом). Главным симптомом цинги является нарушение проницаемости капилляров, обусловленное недостаточностью гидроксилирования пролина и лизина в коллагене. Отсюда и такие клинические проявления гиповитаминоза, как кровоточивость десен, расшатывание зубов, отеки и боли в суставах, поражение костей, бледность кожных покровов, нарушение заживления ран. Смерть наступает обычно от кровоизлияния в полость перикарда.

Мышечная слабость цинготного больного является следствием быстро развивающейся недостаточности карнитина, обеспечивающего энергетику миоцитов. При гиповитаминозе С развивается железодефицитная анемия из-за нарушения всасывания железа и использования его запасов при синтезе гемоглобина. Гиповитаминоз С всегда сопровождается ослаблением иммунозащитных сил организма, а также усилением реакций свободнорадикального окисления, лежащих в основе патогенеза множества заболеваний – лучевой болезни, рака, атеросклероза, диабета и др.

2.5 Суточная потребность

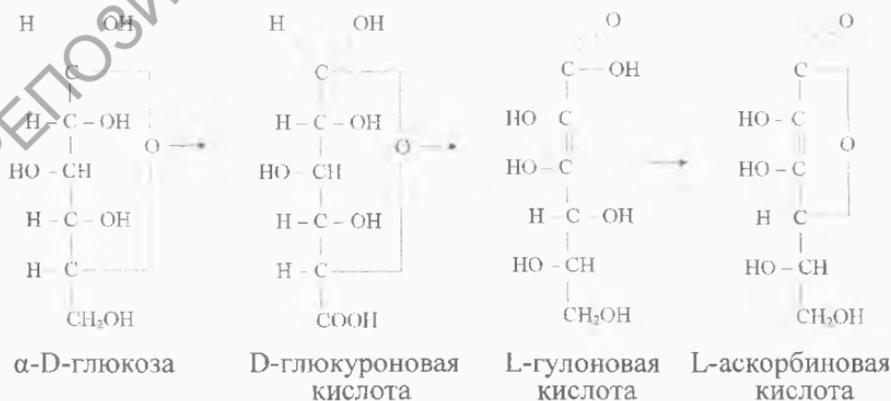
В организме человека, обезьян, морских свинок, индийской плотоядной летучей мыши и некоторых птиц витамин С не синтезируется. В пищевом рационе человека аскорбиновая кислота должна присутствовать постоянно, так как она быстро расходуется, а ее избыток уже через 4 часа полностью выводится из организма.

Источником витамина С служит растительная пища. Особенно богаты им перец и черная смородина, далее идут укроп, петрушка, капуста, щавель, цитрусовые, земляника, но чемпионом среди всех растений является шиповник: 1,2 г (!) на 100 г сухих ягод. Для профилактики цинги следует ежедневно получать 50 мг аскорбиновой кислоты, однако наиболее оптимальной для здорового человека вне стрессовой ситуации является доза 100–200 мг в сутки; при заболеваниях она может быть увеличена до 2 г в сутки. Рекомендуемые Л. Полингом мегадозы витамина (до 10 г в сутки) не находят признания у клиницистов. Вместе с тем мнение о том, что такие дозы могут привести к образованию оксалатных камней в почках, оказалось, по данным клинических испытаний, беспочвенным.

Выраженный антиоксидантный эффект витамина С проявляется в составе антиоксидантного комплекса.

2.6 Синтез

Аскорбиновую кислоту синтезируют растительные и большинство животных клеток, причем в животном организме местом синтеза являются печень и почки. Биологический синтез связан с образованием аскорбиновой кислоты из D-глюкозы без разрыва углеродного скелета по следующей схеме:



Местом синтеза витамина С являются микросомы печени, причем у человека, морской свинки и других животных витамин С не образуется из-за отсутствия L-гулонооксидазы – фермента, катализирующего превращение гулоновой кислоты в аскорбиновую.

2.7 Практическое применение

В медицинской практике витамин С применяется для лечения гиповитаминоза С, при кровотечениях, инфекционных заболеваниях, болезнях печени и почек. Аскорбиновая кислота обладает детоксицирующим действием при отравлениях анилином или оксидом углерода. Витамин С применяется индивидуально или в составе различных поливитаминных препаратов.

Лабораторная работа

Определение аскорбиновой кислоты йодометрическим методом в растениях

Цель работы: определить процентное содержание витамина С в растительном материале.

Принцип метода: Аскорбиновая кислота ($C_6H_8O_6$) обладает сильными восстановительными свойствами. В растительном организме легко осуществляется переход аскорбиновой кислоты в дегидроаскорбиновую и обратная реакция.

Количественное определение аскорбиновой кислоты основано на реакции окисления её йодом. При этом образуется её окисленная форма (дегидроаскорбиновая кислота): $C_6H_8O_6 + J_2 = C_6H_6O_6 + 2HI$ (кислотный характер аскорбиновой кислоты обусловлен енольными гидроксогруппами).

Реактивы, оборудование и исследуемый материал: серная кислота (1 %-ный раствор); метафосфорная кислота (2 %-ный раствор); J_2 (0,1 %-ный раствор); вазелин; кварцевый песок; раствор крахмала; фарфоровая ступка; скальпель; цилиндр; колба на 100 мл; пестик; воронка; стеклянная палочка; бумажный фильтр; стакан или коническая колбочка на 100 мл; пипетка; малые фарфоровые чашечки; микробюретка; растительный материал.

Порядок выполнения работы

Навеску измельчённого материала (1–3 г для зелёных листьев и 5–10 г для корнеплодов) помещают в фарфоровую ступку. На кончике скальпеля добавляют кварцевый песок и приливают из цилиндра в ступку 20 мл 1 %-ной серной кислоты. Содержимое ступки растирают пестиком до гомогенной массы, растирание длится не более 10 мин. Носик ступки с наружной стороны смазывают вазелином. Гомогенат из ступки количественно переносят в мерную колбу на 100 мл, пользуясь воронкой без фильтра и стеклянной палочкой. Ступку, пестик и палочку многократно споласкивают 2 %-ным раствором метафосфорной кислоты, сливая это в ту же колбу, перемешивают содержимое колбы и метафосфорной кислотой доводят до метки. Содержимое колбы оставляют стоять 10–15 минут для лучшей экстракции аскорбиновой кислоты и осаждения белков. Гомогенат фильтруют через бумажный фильтр в сухую коническую колбочку или стакан на 100 мл. Из фильтрата берут пипеткой две параллельные пробы по 10–20 мл и переносят в малые фарфоровые чашечки. Их содержимое титруют из микробюретки. Бюретку заполняют титрованным раствором I_2 0,1 н.

В колбу для титрования вносят 10 мл анализируемого раствора, затем приливают 2 мл раствора крахмала. Содержимое колбы титруют 0,1 н раствором йода до появления слабо-синего окрашивания.

Титрование повторяют 3 раза и по среднему значению объёма V йода, израсходованного на титрование, рассчитывают нормальность анализируемого раствора аскорбиновой кислоты и массу аскорбиновой кислоты в указанном объёме раствора.

Приготовление стандартного (титрованного) раствора йода и установка его титра

Приготовление стандартного раствора йода. Для приготовления стандартных растворов применяют свежеприготовленный йод. Растворимость йода в воде очень мала: насыщенный раствор содержит около 0,03 % йода. Поэтому обычно готовят растворы йода в водном растворе йодида калия.

Для приготовления 1 литра приблизительно 0,1 н раствора йода в стакан ёмкостью 250 мл помещают 40 г йодида калия и 25 мл воды, прибавляют 12,7 возогнанного йода (навеску йода берут в бюксе и взвешивают на технических весах), перемешивают до полного растворения йода, раствор переливают в склянку и только тогда разбавляют водой до 1 литра. Концентрация раствора йода может изменяться

вследствие летучести йода. Поэтому растворы необходимо хранить в сосудах с плотно притрифованными стеклянными пробками. При концентрации йодида калия не менее 4 % раствор йода устойчив.

Установка титра стандартного раствора йодида по тиосульфату Реакция окисления-восстановления между йодом и тиосульфатом при соблюдении определённых условий протекает строго количественного.

Окислительный потенциал системы $I_2 + 2e \leftrightarrow 2I^-$ равен $E^0 = +0,5345\text{В}$, а окислительный потенциал системы $2S_2O_3^{2-} - 2e = S_4O_6^{2-}$ равен $E^0 = +0,15\text{В}$.

При титровании 0,1N раствором йода рН должен быть больше 7,6: при рН = 8 йодометрический метод не приемлем, так как протекает реакция диспропорционирования йода.

Нагревание недопустимо, так как йод очень летуч.

В коническую колбу переносят пипеткой 20–25 мл стандартного раствора тиосульфата натрия, добавляют 1–2 мл раствора крахмала и титруют йодом до появления синей окраски.

Иногда тиосульфат натрия помещают в бюретку, а в коническую колбу пипеткой отбирают раствор йода. В этом случае прибавляют крахмал. Когда раствор приобретает бледно-жёлтую окраску, и титруют до исчезновения синей окраски, появляющейся в результате прибавления крахмала.

Определение провести в трехкратной повторности.

Провести математическую обработку.

Сделать вывод.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Дайте общую характеристику витамина С.
2. Охарактеризуйте метаболизм витамина С.
3. Перечислите биохимические функции витамина С.

Тема 3. Витамин Р (рутин, биофлавоноид)

Основные понятия по теме

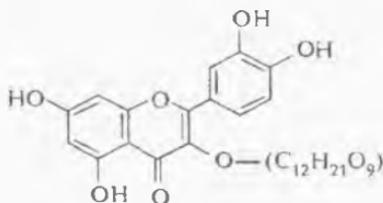
Витамин Р относится к водорастворимым витаминам. Водорастворимые витамины хорошо растворяются в воде и легко выводятся из организма с мочой, почти не накапливаясь в организме. Но если принять их в большом количестве, некоторые из них при передозировке могут вызывать неприятные последствия. Это относится к никотиновой кислоте (может вредить печени) и витамину В₆ (возможны нарушения деятельности нервной системы). Что касается витаминов С, В₁ и других, то они безвредны в дозах, многократно превышающих физиологическую потребность. Водорастворимые витамины в тканях не накапливаются (за исключением витамина В₁₂), и поэтому должны поступать в организм ежедневно. В организме большинство из них активируется путем фосфорилирования. Активные формы в качестве коферментов участвуют в реакциях метаболизма.

Водорастворимые витамины не так стабильны, как жирорастворимые. Поэтому при приготовлении пищи важно не переваривать овощи, фрукты, чтобы сохранить в них как можно больше витаминов. Лучше готовить их на пару, с небольшим количеством воды в микроволновке.

3.1 Химическое строение и свойства

В 1936 г. А. Сент-Дьёрдьи из кожуры лимона выделил действующее начало, уменьшающее ломкость, проницаемость капилляров у больных с геморрагическим диатезом и у цинготных морских свинок. Оно получило название витамин Р (от *permeability* – проницаемость). Относится к биофлавоноидам.

Биофлавоноиды – разнообразная группа полифенольных соединений, в основе структуры которых лежит дифенилпропановый углеродный скелет.



Рутин

Биофлавоноиды содержатся только в растительных клетках. Содержание их в тех или иных растениях различно.

3.2 Метаболизм

Биофлавоноиды быстро всасываются из желудочно-кишечного тракта. В тканях организма они превращаются в фенольные кислоты, которые выделяются с мочой. Частично флавоноиды могут выделяться в неизменном виде или в конъюгатах с глюкуроновой и серной кислотами.

3.3 Биохимические функции

Биофлавоноиды могут использоваться для построения биологически важных соединений в клетке, в частности убихинона.

Рутин и кверцетин – полифенолы, обладающие Р-витаминной активностью, являются эффективными антиоксидантами. Флавоноиды (катехины) зеленого чая способны оказывать выраженное цитопротекторное действие, в основе которого лежит их свойство перехватывать свободные радикалы кислорода. В отличие от витамина Е, биофлавоноиды кроме прямого антирадикального действия могут также связывать ионы металлов с переменной валентностью, ингибируя тем самым процесс ПОЛ (перекисного окисления липидов) биомембран. Наиболее эффективными ловушками супероксидного радикала кислорода (с которого начинается процесс ПОЛ) являются железокомплексы флавоноидов: например, комплекс рутина с Fe^{2+} почти в 5 раз активнее самого рутина.

Достаточно изученным является капилляроукрепляющее действие витамина Р, обусловленное его способностью регулировать образование коллагена (синергизм с витамином С) и препятствовать деполимеризации основного вещества соединительной ткани гиалуронидазой.

3.4 Гиповитаминоз

Симптоматика недостаточности биофлавоноидов сводится к явлениям повышенной проницаемости и ломкости капилляров, петехиям (точечным кровоизлияниям), кровоточивости десен.

3.5 Оценка обеспеченности организма витамином Р

С этой целью определяют прочность капиллярной стенки на основании ее способности противостоять приложенному к ней отрицательному

(вакуумная присоска) или положительному (наложение манжета) давлению. Некоторые представители биофлавоноидов – рутин, кверцетин и др. – определяются химическими методами.

3.6 Суточная потребность. Пищевые источники

Р-витаминные вещества содержатся в тех же растительных продуктах, что и витамин С. Наиболее богаты ими черноплодная рябина, черная смородина, яблоки, виноград, лимоны, чайный лист и плоды шиповника. Биофлавоноид цитрон придает коже лимона желтый цвет. Потребление флавоноидов в составе натуральных продуктов (фруктов, соков и виноградных вин), где они могут находиться в виде комплексов с металлами, может быть более эффективным, чем использование очищенных витаминных препаратов. Суточная потребность – 25–50 мг.

3.7 Биосинтез

Шикимовая кислота является исходным продуктом синтеза биофлавоноидов в растительных клетках.

3.8 Практическое применение

Индивидуальные биофлавоноиды, такие, как рутин, кверцетин, гесперидин, а также комплексные препараты, например сумма флавоноидов из рябины черноплодной, применяют в медицинской практике при гиповитаминозе Р, геморрагических диатезах, кровоизлияниях в сетчатку глаз, ревматизме, некоторых инфекционных заболеваниях.

Лабораторная работа

Количественное определение витамина Р в чае, кофе

Цель работы: определить процентное содержание витамина Р в чае и кофе.

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.

Реактивы, оборудование и исследуемый материал: перманганат калия (0,05 н раствор), индикатор индигокармин, микробюретка; стакан химический объемом 100 мл, пипетка градуированная вместимостью 10 мл; шпатель; колба коническая объемом 100 мл; палочка стеклянная; колба для титрования объемом 50 мл; стакан химический объемом 50 мл; цилиндр объемом 100 мл; колба коническая объемом 500 мл; электроплитка; груша резиновая; чай, кофе.

Порядок выполнения работы

К 100 мг чая приливают 50 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию в течение 5 мин. 10 мл экстракта чая отмеряют в стаканчик или колбочку, добавляют 10 мл дистиллированной воды и 5 капель индигокармина (появляется сине-зеленое окрашивание). Титруют из микробюретки 0,05 н раствором KMnO_4 до появления устойчивой бурой окраски. Определяют процентное содержание витамина Р в чае и кофе по формуле:

$$X = \frac{3,2 \times A \times V_1 \times 100}{V_2 \times P \times 1000},$$

где X – содержание витамина Р в препарате, %;

3,2 – стандартный пересчетный коэффициент;

A – результат титрования 0,05 н раствором перманганата калия, мл;

V_1 – объем, в котором растворена взятая для анализа навеска, мл;

100 – общее количество вещества для расчета процентного содержания;

V_2 – объем раствора, взятого для титрования, мл;

P – навеска, мг;

1000 – перевод микрограммов в миллиграммы.

Определение провести в трехкратной повторности.

Провести математическую обработку.

Сделать вывод.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Дать общую характеристику витамина Р.
2. Описать метаболизм витамина Р.
3. Перечислить биохимические функции витамина Р.

Тема 4. Ферменты

Основные понятия по теме

Ферменты локализованы во всех компартментах клеток. Ядерные ферменты катализируют синтез информационных макромолекул, а также процессы их созревания, функционирования и распада. В митохондриях действуют ферменты энергетического обмена, в аппарате Гольджи – ферменты, катализирующие созревание белков, в лизосомах – гидролитические ферменты. Значительное число ферментов ассоциировано с внешней и внутренними мембранами. Так, ферменты, защищающие клетку от действия чужеродных химических веществ, локализованы в эндоплазматическом ретикулуме. Распределение ферментов в клетках определяют методом дифференциального центрифугирования гомогената тканей. Локализация некоторых ферментов идентифицирована гистохимическими методами. Для этого при помощи микротомы получают срезы ткани и обрабатывают их раствором субстрата. Идентификация продуктов ферментативной реакции облегчена, если последние окрашены.

4.1 Определение активности ферментов

Термин *активность* достаточно условен и характеризует способность ферментов изменять скорости соответствующих реакций. Определяется активность по количеству продуктов реакции или модификации субстрата под действием фермента. За единицу активности фермента принимают такое его количество, которое катализирует превращение в 1 мин при 25 °С одного микромоля субстрата. Активность ферментов, связанную с превращением одного моля субстрата в 1 с при 25 °С, выражают также в каталах (кат). *Удельной активностью* называется скорость реакции, рассчитанная на 1 мг белка фермента.

Для корректного определения ферментативной активности условия опыта должны быть максимально стандартизованы и проводиться в условиях оптимума температуры и pH. Количество субстрата должно быть равным или большим, чем необходимо для поддержания максимальной скорости реакции. Разнообразие методов оценки ферментативной активности связано с большим количеством вариантов ферментативных реакций. Если продукты реакции или модифицированные

субстраты окрашены, то с большим успехом используют спектрофотометрические методы, в случае газообразных продуктов реакции весьма эффективен полярографический метод и т. д. Определение каталитической активности весьма важно для оценки действия фермента. Кроме того, знание удельной активности того или иного фермента дает возможность определить истинное содержание его в клетках.

4.2 Оксидоредуктазы

К этому классу относятся ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Они представляют самый большой класс ферментов. Название их составляют по форме: «донор : акцептор – оксидоредуктаза». Они играют основополагающую роль в процессах биологического окисления. Коферменты НАД и НАДФ являются акцепторами водорода. Ферменты, катализирующие перенос водорода, называются дегидрогеназами; переносящие кислород к субстрату – оксигеназами. Пероксидазами называют ферменты, использующие в качестве акцептора водорода H_2O_2 . Оксидоредуктазы подразделяются на подклассы по критерию окисления тех или иных группировок, в частности от природы доноров водорода. Например:

Подкласс 1.1 – в него входят ферменты, действующие на СН–ОН-группу доноров (малатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа и др.).

Подкласс 1.2 – в него входят ферменты, окисляющие альдегидные или кетонные группировки.

Подкласс 1.6 – ферменты этого подкласса отличаются тем, что донором водорода для них являются восстановленные НАД и НАДФ.

Всего класс оксидоредуктаз содержит 17 подклассов.

К числу важнейших оксидоредуктаз принадлежат:

– аэробные дегидрогеназы – переносчики водорода от окисляемого субстрата на кислород:



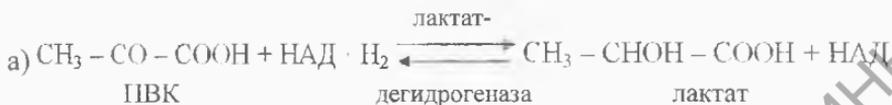
Так как эти ферменты катализируют реакции окисления кислородом воздуха, их называют также оксидазами. К ним относятся альдегидоксидаза, глюкозооксидаза *Penicillium*, оксидаза аминокислот и некоторые другие флавиновые ферменты;

– анаэробные дегидрогеназы – переносчики водорода от окисляемого субстрата на другой субстрат, но не на кислород:

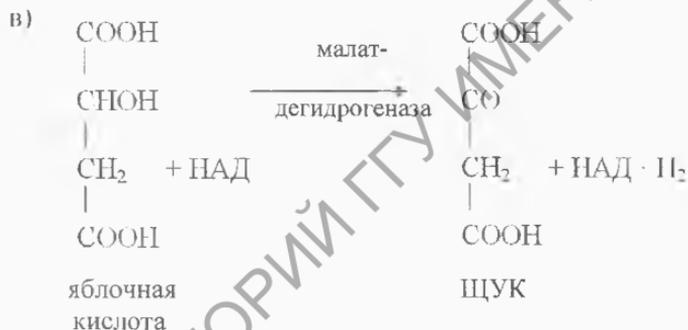
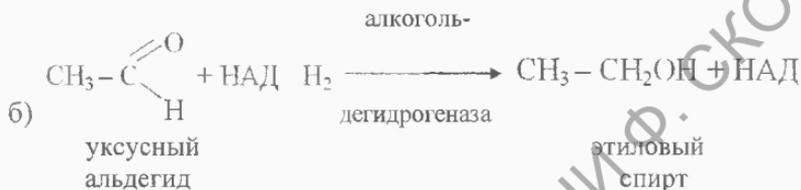


К ним относятся лактатдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа, малатдегидрогеназа.

Пример действия данных ферментов:



Этот фермент катализирует и прямую и обратную реакцию.



– цитохромы – к классу оксидоредуктаз относятся и ферменты, выполняющие роль переносчиков электронов, например, цитохромоксидаза. Механизм ее действия сводится к переброске электронов, отщепляемых от окисляемого субстрата, на молекулярный кислород:



Это создает предпосылки для взаимодействия иона кислорода с отщепившимися от субстрата (одновременно с электронами) протонами:



– каталаза. В ряде случаев при аэробном дегидрировании различных веществ образуется H_2O_2 , которая является сильным клеточным ядом. Но это вещество никогда не накапливается в тканях аэробно живущих организмов, так как в тканях животных присутствуют ферменты, разрушающие H_2O_2 по мере ее образования. Одним из них является фермент каталаза – разрушает H_2O_2 с образованием воды и молекулярного кислорода:



Каталазу можно обнаружить в большем или меньшем количестве во всех клетках и тканях аэробных организмов. Особенно много каталазы находится в крови (эритроцитах), печени, сперме. Присутствие каталазы во всех тканях исключает возможность накопления в них перекиси водорода, поэтому ей приписывают роль «защитного» фермента.

Каталаза, как и большинство ферментов, является сложным белком и принадлежит к группе гемопротеидов: простетическая группа ее идентична окисленному гему. Каталаза действует специфически только на H_2O_2 и является одним из весьма активно действующих ферментов.

Лабораторная работа

Определение активности каталазы

Цель работы: определить активность каталазы.

Принцип метода. Активность каталазы определяют по количеству перекиси водорода, разложившейся под действием фермента. В реакционную смесь вносят избыток перекиси водорода. В контрольном образце каталазу инактивируют серной кислотой, в опытном образце часть внесенной перекиси водорода разлагается под действием фермента, а количество неразложившейся перекиси водорода определяют титрованием перманганатом калия в кислой среде. При этом происходит следующая реакция:



Количество разложившейся под действием фермента перекиси водорода в соответствии с приведенной реакцией находят по разности между опытным и контрольным титрованием.

Реактивы, оборудование и исследуемый материал: сухой углекислый кальций; кварцевый песок; серная кислота (10 %-ный раствор); перекись водорода (0,1 н-ный); перманганат калия (0,1 н-ный раствор); ступка; пестик; цилиндр на 50 и 100 мл; конические колбы на 200 мл; центрифужная пробирка; центрифуга; растительный материал.

Порядок выполнения работы

2–3 г свежего растительного материала растирают в ступке с кварцевым песком. Если реакция растительного материала кислая, то в ступку добавляют на кончике шпателя небольшое количество углекислого кальция. В процессе растирания в ступку небольшими порциями добавляют точно 50 мл воды. Растертую массу количественно переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 10–15 минут при 3–5 тысяч оборотов в минуту.

Для определения активности фермента из центрифужной пробирки берут две пробы по 20 мл ферментной вытяжки и переносят их в конические колбы на 200 мл. В одну из колб, которая служит контролем, приливают 5 мл 10 %-ной серной кислоты для инактивации фермента. Затем в обе колбы добавляют по 20 мл 0,1 н раствора перекиси водорода. Реакцию разложения перекиси водорода проводят при 20 °С в течение 30 минут. После прибавления каждого реактива содержимое колб тщательно перемешивают. Через 30 минут фермент в опытной колбе инактивируют прибавлением в колбу 5 мл 10 %-ной серной кислоты.

Затем избыток перекиси водорода в каждой колбе оттитровывают 0,1н раствором перманганата калия до образования устойчивого розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 минуты.

Вычисление результатов

Активность каталазы выражают в микромолях перекиси водорода, разложившейся под действием фермента за 1 минуту в расчете на 1 г свежего растительного материала. Вычисление ведут по формуле:

$$x = \frac{(aT - bT)50 \cdot 50}{n \cdot 20 \cdot 30},$$

где X – активность каталазы;
 a – количество 0,1н KMnO_4 , израсходованного на титрование контрольного образца, мл;
 b – количество 0,1н KMnO_4 , израсходованного на титрование опытного образца, мл;
 T – поправка к титру 0,1н KMnO_4 ;
50 – коэффициент пересчета на микромоли H_2O_2 ;
50 – общий объем экстракта, мл;
20 – объем ферментного раствора, взятого для анализа, мл;
30 – время ферментативной реакции, мин;
 n – навеска материала, взятого для анализа, г.

Определение провести в трехкратной повторности.

Провести математическую обработку.

Сделать вывод.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Привести общую характеристику ферментов.
2. Дать определение активности ферментов.
3. Охарактеризовать класс оксидоредуктаз.

Тема 5. Углеводы

Основные понятия по теме

Углеводами называют большое число соединений, которые обладают различной химической структурой и биологическими функциями. Общая формула $C_n(H_2O)_m$.

Углеводы – полигидроксикарбонильные соединения и их производные, которые обладают различной химической структурой и биологическими функциями. Содержание углеводов в растениях достигает 80–90 % на сухое вещество, а в организме человека и животных – до 2 %.

5.1 Биологические функции

Углеводы играют важную роль в жизнедеятельности организма:

- являются основным источником энергии. При полном окислении 1 г углеводов образуется 6,9 кДж энергии (4,4 ккал);
- служат запасным питательным материалом, который откладывается у растений в виде крахмала, у человека и животных – в виде гликогена в печени и мышцах;
- в виде полисахаридов выполняют защитную и опорную функцию организма, являясь важнейшими компонентами жестких стенок растительных и бактериальных клеток и более мягких оболочек животных клеток;
- используются как исходные вещества для синтеза многих важнейших для организма веществ: нуклеиновых и жирных кислот, а из них аминокислот и белков, липидов и т. д.;
- участвуют в регуляции некоторых процессов в организме. Например, клетчатка, вызывая механическое раздражение кишечника, способствует его перистальтике, т. е. сокращению;
- выполняют многие специфические функции: входят в состав слизистых веществ, являются субстанцией группоспецифических веществ крови, исполняют роль антикоагулянтов (гепарин препятствует свертываемости крови).

Классификация углеводов основана на их способности гидролизоваться (рисунок 1).



Рисунок 1 – Классификация углеводов

Моносахариды – простые углеводы, которые не расщепляются гидролитическим путем.

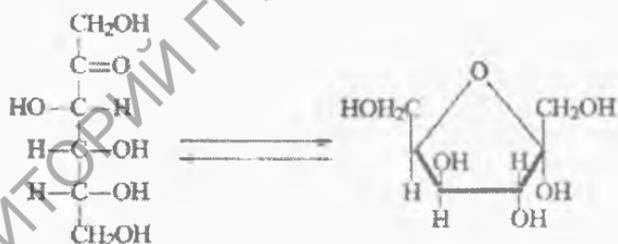
По числу углеродных атомов в молекуле моносахариды подразделяются на:

- тетрозы (эритроза);
- пентозы (рибоза и дезоксирибоза);
- гексозы (фруктоза, глюкоза, галактоза, манноза);
- гептозы (седогептулоза).

По характеру функциональных групп моносахариды разделяются на альдозы (альдегидспирты) и кетозы (кетоспирты).

Гексозам принадлежит главная роль в обмене веществ. Общая формула гексоз $C_6H_{12}O_6$.

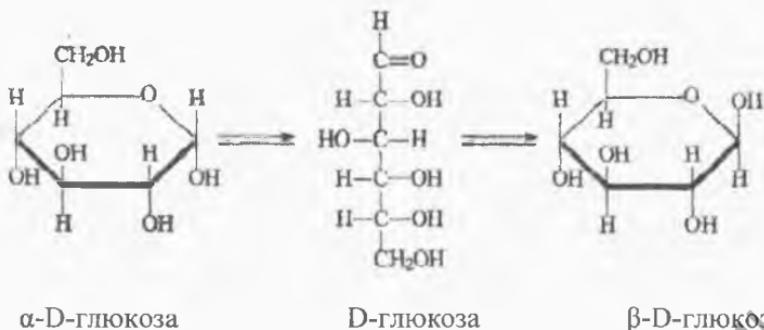
D-фруктоза (плодовый сахар) – это кетоза (кетоспирт). В свободном состоянии находится в плодах, меде, нектаре. В связанном виде входит в состав дисахарида сахарозы.



D-фруктоза

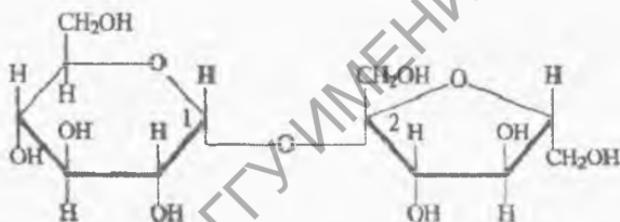
Циклическая форма фруктозы

D-глюкоза (виноградный сахар) относится к альдозам (альдегидспирт). В свободном виде находится в зеленых частях растений, фруктах, ягодах, крови человека (0,08–0,12 %). В связанной форме является основой таких важнейших природных соединений, как тростниковый и свекловичный сахар, крахмал, клетчатка, гликоген и др.



Олигосахариды при гидролизе образуют от 2 до 10 моносахаридов. Наиболее распространенными в природе олигосахаридами являются дисахариды. Общая их формула $C_{12}H_{22}O_{11}$.

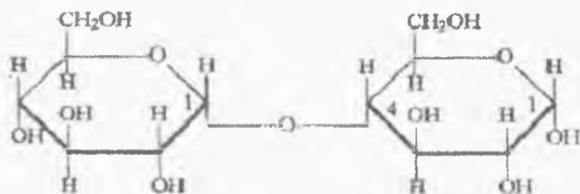
Сахароза образована из двух моносахаридов: α -D-глюкозы и β -D-фруктозы. Не обладает восстановительными свойствами. Встречается в листьях, стеблях, корнях, ягодах и фруктах.



Сахароза

Мальтоза образована двумя остатками α -D-глюкозы. Содержится в большом количестве в солоде. Легко усваивается организмом. Является промежуточным продуктом распада крахмала и гликогена.

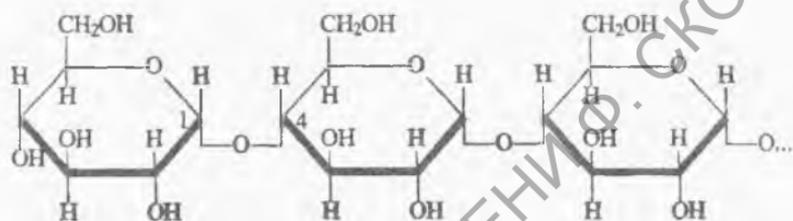
В мальтозе есть свободный полуацетальный гидроксил, вследствие чего она обладает, в отличие от сахарозы, восстановительными, редуцирующими свойствами – дает реакцию Феллинга и реакцию «серебряного зеркала».



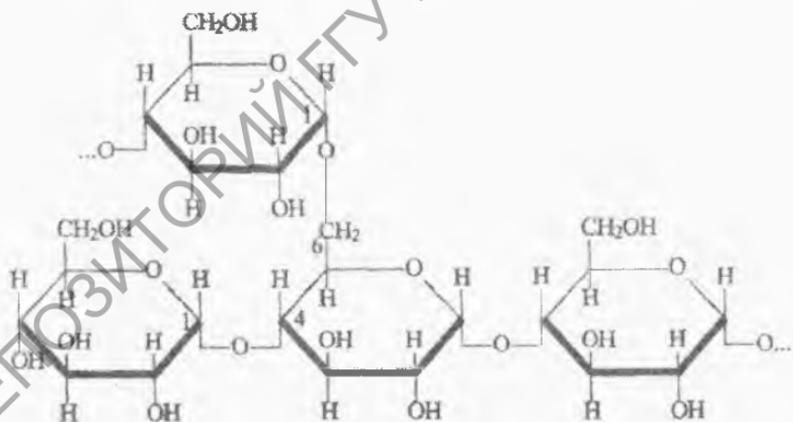
Мальтоза

Полисахариды – это высокомолекулярные полимеры моносахаридов и их производных. Число моносахаридных единиц в них колеблется от десяти до нескольких тысяч. К гомополисахаридам относятся крахмал, гликоген, клетчатка. Общая их формула $(C_6H_{10}O_5)_n$. Крахмал и гликоген выполняют резервную функцию, клетчатка – опорную.

Крахмал – один из самых распространенных запасных углеводов растений. Он накапливается в результате фотосинтеза. Крахмал представляет собой смесь двух гомогенных однородных полисахаридов: амилозы – линейного, и амилопектина – разветвленного. Оба эти гомополисахарида построены из остатков α -D-глюкозы. Амилоза составляет 10–30 % крахмала, хорошо растворима в воде. Амилопектин составляет 70–90 % и дает коллоидные растворы.



Амилоза



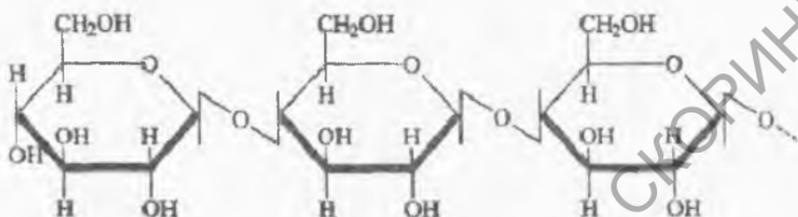
Амилопектин

Обе фракции крахмала дают окрашивание с I_2 синего цвета. Молекулярная масса их колеблется от 100 тысяч до 20 миллионов единиц.

При гидролизе крахмала образуются в первую очередь промежуточные продукты – декстрины, а затем дисахарид мальтоза и даже глюкоза.

Гликоген – животный крахмал, имеет более разветвленное строение, чем амилопектин крахмала. Молекулярная масса в среднем составляет от 10 млн до 1 млрд. единиц. В наибольшем количестве находится в печени (до 10–20 %) и мышцах (до 4 %).

Целлюлоза (клетчатка) – наиболее распространена в растительном мире. Имеет линейное строение, близкое к амилозе крахмала, но в качестве мономеров здесь выступают остатки р-D-глюкозы. Молекулярная масса точно не установлена.

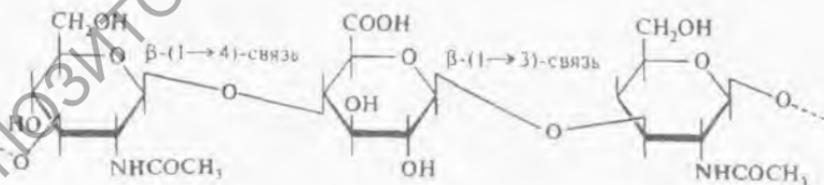


Целлюлоза

Клетчатка не переваривается в желудочно-кишечном тракте человека.

К структурным гетерополисахаридам относятся гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты, кератосулфаты. Поскольку водные растворы этих соединений желеобразны, их называют мукополисахаридами (от лат. *mucos* – слизь).

Гиалуроновая кислота состоит из эквимольных количеств D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, которые чередуются друг с другом в молекуле полисахарида.



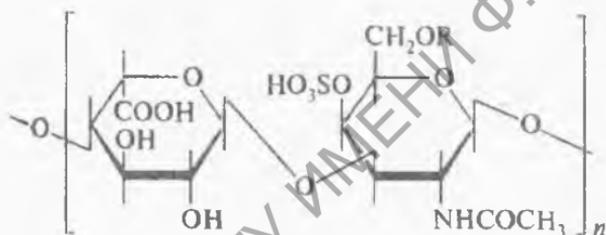
Гиалуроновая кислота

Этот полисахарид присутствует в соединительных тканях животных, а также в стекловидном теле глаза и в синовиальной жидкости. Обычно гиалуроновая кислота бывает связана с белками. Комплексы гиалуроновой кислоты с белком выделены из природных источников.

Предполагают, что функция гиалуроновой кислоты заключается в том, чтобы связывать воду в интерстициальных пространствах и удерживать клетки вместе в желеподобном матриксе. Кроме того, она придает синовиальной жидкости смазочные свойства и способность смягчать удары.

Молекулярная масса гиалуроновых кислот, выделенных из разных источников, сильно колеблется – от нескольких сотен до нескольких тысяч kDa.

Хондроитинсульфаты. К ним относится, в частности, хондроитин – полисахарид, сходный с гиалуровой кислотой, в котором D-глюкозамин замещен O-галактозамином. Является исходным соединением для трех полисахаридов, широко распространенных в качестве компонентов соединительной ткани, а именно для хондроитинсульфатов А, В и С.



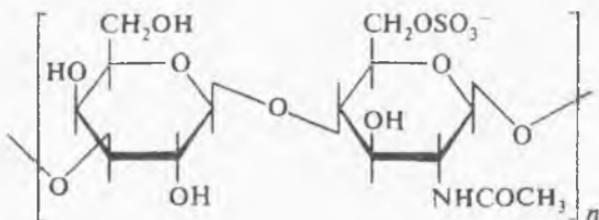
Хондроитинсульфат В

Хондроитинсульфаты А и С состоят из эквимольных количеств D-глюкуроновой кислоты, N-ацетил-D-галактозамина и сульфата.

Хондроитинсульфаты – неперенная составная часть хряща, костной ткани, сухожилий, сердечных клапанов и др. подобных тканей.

Соединяясь в организме с гиалуронидазой, хондроитинсульфаты препятствуют расщеплению гиалуроновой кислоты и этим способствуют защите организма от инфекции.

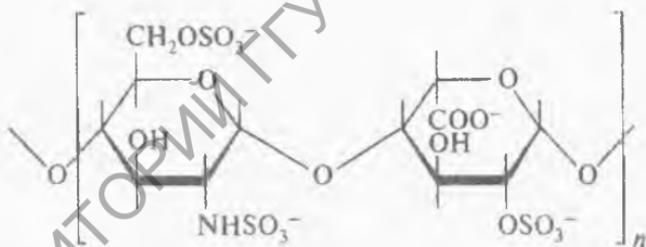
Кератосульфаты. Они сходны с хондроитинсульфатами как в структурном отношении, так и по своему распространению. Кератосульфат является одним из главных полисахаридов соединительной ткани; кроме того, он встречается и в некоторых других тканях. Кератосульфат состоит из чередующихся остатков D-галактозы и N-ацетил-D-глюкозамин-сульфата, соединенных между собой чередующимися связями β -(1 \rightarrow 4)- и β -(1 \rightarrow 3)-типа.



Кератосульфат

Гепарин, открытый в 50-х гг. XX в., занимает среди гетерополисахаридов особое место. Он обладает важными биологическими свойствами, в частности является антикоагулянтом. Принимает участие в обмене липидов, влияет на холестериновый обмен, является регулятором по отношению к ряду ферментов. Используется в качестве стабилизатора крови при ее переливании, для лечения тромбозов, ожоговой болезни, сердечно-сосудистых заболеваний. Гепарин встречается главным образом в крови и лимфе млекопитающих, а также в органах, в которых содержатся тучные клетки, являющиеся местом синтеза и хранения гепарина. Обычно гепарин прочно связан с белком.

Основной повторяющейся единицей в молекулах гепарина служит, вероятно, изображенный ниже дисахарид (хотя помимо показанных присутствуют и другие связи).



Сульфатированный
глюкозамин

Сульфатированная
идуроновая кислота

Полисахариды входят в состав группоспецифических веществ крови, являются веществами, определяющими антигенную специфичность бактериальных клеток, и обладают важным специфическим свойством – образовывать гликоконъюгаты – ковалентно связанные молекулы углеводов с белками, липидами и другими веществами. К гликоконъюгатам относятся гликопротеины, протеогликаны, гликолипиды, липогликаны, гликолипопротеины, тейхоевые кислоты.

Лабораторная работа

Определение растворимых сахаров методом Хагердона-Иенсена

Цель работы: определить растворимые сахара в растительном материале.

Принцип метода. Принцип метода Хагердон-Иенсена заключается в том, что красная, кровяная соль $K_3Fe(CN)_6$ в щелочном растворе может быть восстановлена в желтую кровяную соль $K_4Fe(CN)_6$. Так как реакция обратима, то желтая кровяная соль выводится из раствора вносимым в смесь сернистым цинком; неиспользованное же количество красной кровяной соли определяется йодометрически. Последняя реакция должна протекать в уксуснокислой среде. Процесс идет следующим образом:



Реактивы, оборудование и исследуемый материал: смешанный раствор гексоцианоферрата калия в карбонате натрия; тиосульфат натрия (0,05 н раствор); крахмал (1 %-ный раствор); смешанный раствор иодида калия, сульфата цинка, хлорида натрия; сульфат цинка (4,5 %-ный раствор); гидроксид натрия (3 %-ный раствор); уксусная кислота (3 %-ный раствор); ступка и пестик; электроплитка; баня; бумажный фильтр; колба мерная объемом 50 мл; пипетка градуированная объемом 5 мл; колба коническая объемом 50 мл; микробюретка, стеклянная палочка; колба коническая с пробкой объемом 250 мл; стакан химический объемом 100 мл; стакан химический объемом 50 мл; цилиндр мерный объемом 100 мл; цилиндр мерный объемом 10 мл; труша резиновая; термометр; ножницы; колба коническая объемом 500 мл; сухой растительный материал.

Порядок выполнения работы

Берут небольшую навеску сухих листьев (примерно около 0,02 г). Навеску измельчают и растирают с небольшим количеством воды в ступке до совершенно однородной массы. Эту массу количественно переносят в небольшую колбочку. Для целей полного извлечения растворимых углеводов раствор нагревают при 70 °С на водяной бане около получаса. Для осаждения белков прибавляют к вытяжке 5 мл 4,5 % $ZnSO_4$ и 3 мл 2 % $NaOH$ и нагревают 3 мин на кипящей водяной бане.

Полученная смесь фильтруется горячей в мерную колбочку на 50 мл. Осадок на фильтре тщательно промывается горячей водой. После охлаждения фильтрат доводят до метки. Из колбочки берут пипеткой две пробы по 5 мл в каждой (в зависимости от содержания в пробе сахара величина ее может быть и больше и меньше 5 мл). Пробы сливают в две колбы объемом 50 мл и прибавляют в каждую из них по 2 мл раствора $K_3Fe(CN)_6$ в Na_2CO_3 , доливают 8 мл воды. Одновременно заряжают еще по две холостые пробы, каждая из которых будет состоять из 13 мл воды и 2 мл раствора $K_3Fe(CN)_6$ в Na_2CO_3 . Приготовленные таким образом смеси нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения прибавляют в каждую колбу по 3 мл смешанного раствора $KI + ZnSO_4 + NaCl$ и по 2 мл 3 %-ного раствора CH_3COOH и по 2 капли крахмального индикатора. Затем титруют 0,05 н раствором тисульфата натрия из микробюретки до обесцвечивания раствора. Титрование холостых, т. е. содержащих воду и раствор $K_3Fe(CN)_6$ в Na_2CO_3 проб, необходимо, так как последний при кипячении может отчасти восстанавливаться сам по себе, т. е. при отсутствии сахара.

Произвести расчёт согласно таблице 1.

Таблица 1 – Содержание сахара при определении по Хагедорну-Иенсену

Гипосульфит, мл	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

**Определение провести в трехкратной повторности.
Провести математическую обработку.
Сделать вывод.**

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Дать общую характеристику углеводов.
2. Какова биологическая роль углеводов?
3. Охарактеризуйте классы углеводов:
 - моносахариды;
 - олигосахариды;
 - полисахариды.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ

Тема 6. Липиды

Основные понятия по теме

Липиды (жиры) – это большая группа веществ различного химического строения, широко распространенная в природе. Общим свойством для всех липидов является их нерастворимость в воде. Они растворяются в органических растворителях (бензоле, хлороформе, ацетоне, эфире), что и используется для их разделения и извлечения из тканей.

В чистом виде жиры легче воды, не обладают летучестью, в воде образуют нестойкие эмульсии. В организме животных и человека роль эмульгаторов, превращающих жиры в тонкие эмульсии (а только в таком виде усваиваются жиры), выполняют желчные кислоты.

При хранении жиры под действием света, кислорода воздуха и влаги приобретают неприятный вкус и запах – процесс носит название «прогоркание». Он обусловлен гидролизом жиров и окислением их продуктов, что приводит к образованию альдегидов и кетонов с неприятным запахом и вкусом.

6.1 Биологические функции липидов

Липиды являются богатым источником энергии. Так, при окислении 1 г жира выделяется приблизительно 39 кДж энергии (9,3 ккал).

Пластическая функция липидов – участвуют в образовании клеточных мембран, влияя, таким образом, на проницаемость клеточных мембран; участвуют в передаче нервного импульса и в создании межклеточных контактов.

Специфические функции липидов:

- а) защитная (в виде жировой прокладки выполняют чисто механическую защитную функцию);
- б) многие липиды являются растворителями для некоторых биологически активных веществ (жирорастворимых витаминов А, Д, Е и др.);
- в) участвуют в процессе терморегуляции, предохраняя организм от переохлаждения;
- г) липиды являются внутренним источником воды для организма, так как при окислении 100 г жира образуется около 107 г H_2O ;
- д) являясь липидами, все стероидные гормоны (половые гормоны, гормоны надпочечников) выполняют различные регуляторные функции;

е) жиры, выделяемые кожными железами, служат смазкой для кожи, обеспечивают несмачиваемость покровов у водоплавающих птиц и животных.

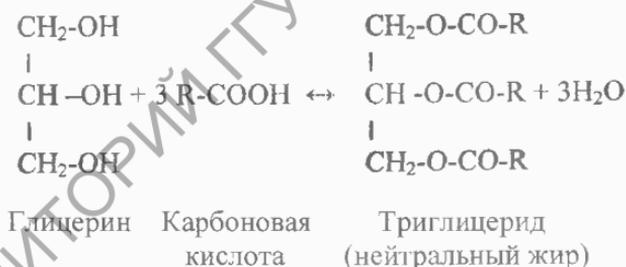
По своему назначению липиды делятся на протоплазматические и резервные. Протоплазматический жир входит в состав компонентов протоплазмы клеток, являясь важным структурным элементом. Содержание такого жира в тканях и органах постоянно, не увеличивается при патогенном ожирении и не уменьшается даже при гибели животного от полного голодания. Резервный жир откладывается в подкожной клетчатке, сальнике и других скоплениях жировой ткани. Этот жир каждые 4–5 дней частично обновляется.

По химическому строению липиды подразделяются на:

- нейтральные жиры, или собственно жиры;
- липоиды, или жироподобные вещества.

6.2 Нейтральные жиры

Это сложные эфиры, образованные трехатомным спиртом – глицерином и высокомолекулярными жирными карбоновыми кислотами. Пример образования нейтрального жира:



Природный жир представляет собой смесь различных триглицеридов. Если триглицерид содержит три остатка одной и той же кислоты, то его называют простым, если остатки разных кислот – смешанным триглицеридом. Кроме различных триглицеридов, природный жир содержит различные примеси – витамины, пигменты (окрашенные вещества), а также свободные жирные кислоты.

В составе природных жиров несколько десятков различных жирных кислот. Они отличаются друг от друга длиной углеродной цепи (чаще кислоты содержат от 4 до 24 атомов углерода), ее строением, числом и положением двойных связей, наличием различных группировок.

К числу важнейших жирных кислот относятся:

а) предельные:

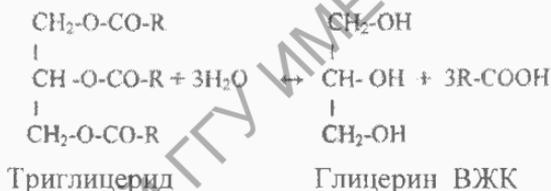
- C_3H_7COOH – масляная;
 $C_5H_{11}COOH$ – капроновая;
 $C_7H_{15}COOH$ – каприловая;
 $C_9H_{19}COOH$ – каприновая;
 $C_{15}H_{31}COOH$ – пальмитиновая;
 $C_{17}H_{35}COOH$ – стеариновая.

б) непредельные

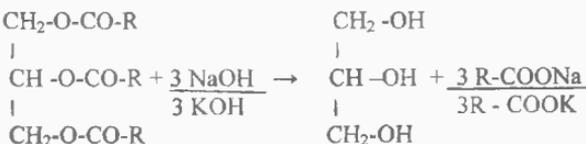
- $C_{17}H_{33}COOH$ – олеиновая (=);
 $C_{17}H_{31}COOH$ – линолевая (2=);
 $C_{17}H_{29}COOH$ – линоленовая (3=);
 $C_{19}H_{31}COOH$ – арахидоновая (4=);

Присутствие в жирах большого количества ненасыщенных жирных кислот придает им жидкую консистенцию – это растительные масла; содержание преимущественно насыщенных жирных кислот – твердую консистенцию – животные жиры. Непредельные жирные кислоты имеют большое физиологическое значение для организма, т. к. являются витаминами группы F. Некоторые из них не способны синтезироваться организмом. Это так называемые незаменимые кислоты – линолевая, линоленовая, арахидоновая. Они должны обязательно поступать с пищей, поэтому растительные масла, содержащие эти жирные кислоты, обладают высокой биологической ценностью и должны быть в пищевом рационе круглый год.

При гидролизе жиров в организме образуются жирные кислоты и глицерин. В живых организмах этот процесс катализируется ферментом липазой:



Гидролиз жиров под действием щелочей (или соды), называемый реакцией омыления, приводит к образованию глицерина и солей жирных кислот, которые являются мылами. Если взять гидроксид Na, получают так называемое твердое мыло; если гидроксид K – жидкое мыло.



6.3 Липоиды – жироподобные вещества

Это большая группа веществ, по свойствам близкая к жирам, но отличающаяся строением молекул и ролью в организме. Липоиды обычно сопутствуют жирам, но особенно много их в мозгу и нервной ткани (до 50 %).

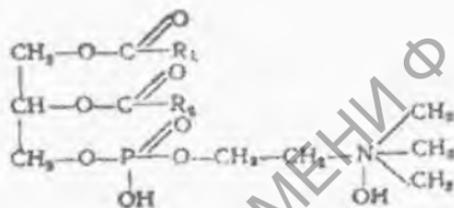
По химическому строению липоиды делятся на:

- фосфатиды;
- стерины;
- цереброзиды;
- воски.

Фосфатиды – это наиболее распространенная группа липоидов. Строение фосфатидов установлено при изучении продуктов их гидролиза. Таковыми являются:

- глицерин;
- жирные кислоты;
- фосфорная кислота;
- различные аминспирты (холин, коламин, сфингозин).

Фосфатиды, содержащие аминспирт холин, называются лецитинами.



α-лецитин

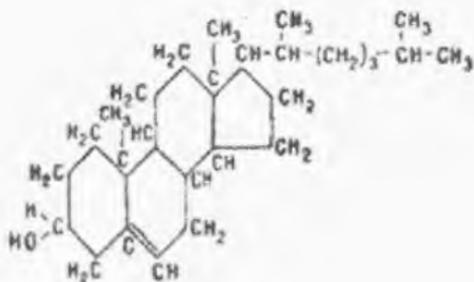
Они в большом количестве содержатся в желтках яиц, в мозговой ткани, семенах подсолнечника, сперме, молоке. Сам холин – аминспирт, может встречаться в организме в свободном состоянии, где, соединяясь с уксусной кислотой, образует вещество ацетилхолин, которое участвует в передаче нервного возбуждения. При недостатке холина наблюдается нарушение обмена веществ, в частности жировое перерождение печени.

Стерины – это высокомолекулярные циклические спирты, содержащие кольцо пиклопентанпергидрофенантрена.

Различные стерины отличаются друг от друга строением боковой углеводородной цепи и наличием двойных связей в феноантреном кольце. Наиболее важным из этой группы веществ является холестерин.

Холестерин играет важную роль в биологических процессах: из него образуются женские и мужские половые гормоны, гормоны коры надпочечников; он является материалом для построения витаминов группы D, желчных кислот. При нарушении обмена холестерина развивается заболевание атеросклероз.

В значительных количествах холестерин содержится в липидах нервной ткани, яиц и клеток спермы, печени, надпочечниках, стенках эритроцитов.



Холестерин

Цереброзиды - содержат в своем составе аминокспирт сфингозин, гексозу и жирную кислоту. В больших количествах содержатся в мембранах нервных клеток, где они необходимы для нормальной передачи нервных импульсов.

Воски - сложные эфиры высших монокарбоновых кислот и высших спиртов жирного (реже ароматического) ряда. Природные воски содержат также душистые и красящие вещества. К ним относят:

- пчелиный воск вырабатывается специальными железами рабочих пчел, служит для построения пчелиных сот. По химическому составу это пальмитиново-мирициловый эфир:



- спермацет - воск животного происхождения, содержится в черепных полостях кашалота. Его биологическая роль не установлена. Состоит из пальмитиново-цетилового эфира:



- карнаубский воск - воск растительного происхождения, который вырабатывается одним из видов пальм и является церотиново-мирициловым эфиром:



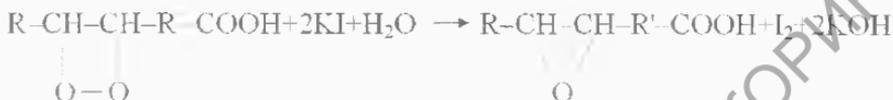
Воски выполняют в основном защитную функцию в организме. Они образуют защитную смазку на коже, шерсти, перьях, покрывают листья, стебли, плоды, а также кутикулу внешнего скелета насекомых. Восковой налет предохраняет от смачивания, высыхания, проникновения микробов.

Лабораторная работа

Определение перекисного числа

Цель работы: определить перекисное число в растительном масле.

Принцип метода. Количественное определение перекисей в растительном масле основано на реакции выделения йода перекисями из йодистого калия в кислой среде:



Йод оттитровывают раствором тиосульфата.

Реактивы, оборудование и исследуемый материал: уксусная кислота концентрированная; хлороформ химический чистый; калий йодистый – насыщенный раствор; тиосульфат натрия (0,05 н раствор); крахмал (0,5 %-ный раствор); конические колбы с притертой пробкой объемом 250 мл; пипетка градуированная объемом 1 мл; цилиндр мерный объемом 50 мл; стакан химический объемом 50 мл; микропипетки; бумажные фильтры; микробюретка; груша резиновая; растительное масло (лучше прогорклое).

Порядок выполнения работы

В конической колбе или склянке с притертой пробкой емкостью 200 мл отвешивают на аналитических весах около 2 г масла. Навеску растворяют в 20 мл смеси ледяной уксусной кислоты и хлороформа (2:1 по объему), прибавляют 5 мл насыщенного раствора йодистого калия, сосуд упоризуют пробкой и ставят в темное место на 10 мин после чего доливают 50 мл дистиллированной воды и оттитровывают выделившийся йод 0,05 н раствором тиосульфата в присутствии индикатора крахмала. Одновременно ставят также контрольное определение (без масла).

Перекисное число (п.ч.) – количество граммов йода, выделенное перекисями (содержащимися в 100 г масла), рассчитывают по формуле:

$$\text{п.ч.} = \frac{(\text{с}-\text{O}) \cdot 0,0002538 \cdot 100}{\text{н}}$$

где s – количество 0,05 н раствора тиосульфата (мл), израсходованное при контрольном определении;

O – количество 0,05 н раствора тиосульфата (мл), израсходованное при титровании опытного образца;

k – поправочный коэффициент раствора тиосульфата;

0,0002538 – титр 0,05 н раствора тиосульфата по йоду (1 мл раствора соответствует 0,0002538 г йода);

n – навеска масла (г).

Определение провести в трехкратной повторности.

Провести математическую обработку.

Сделать вывод.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Дайте общую характеристику липидов.
2. Укажите биологическую роль липидов.
3. Приведите классификацию липидов.

Производственно-практическое издание

Беляева Людмила Александровна

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Практическое пособие

для студентов биологического факультета
специальности 1 – 31 01 01 02
«Биология (научно-педагогическая деятельность)»

Редактор *В. П. Шкредова*
Корректор *В. В. Калугина*

Подписано в печать 7.03.2014. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Ризография. Усл. печ. л. 2,8.
Уч.-изд. л. 3,1. Тираж 25 экз. Заказ 146.

6632-00

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования
«Гомельский государственный университет
имени Франциска Скорины».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/87 от 18.11.2013.
Специальное разрешение (лицензия) № 02330 / 450 от 18.12.2013.
Ул. Советская, 104, 246019, Гомель.