

ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ

ОРГАНИЧЕСКАЯ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ  
И ФИЗКОЛЛОИДНАЯ

# ХИМИЯ

ПРАКТИКУМ

А. Л. Новокшанова

2-е издание



УМО СПО рекомендует

**Юрайт**  
издательство  
biblio-online.ru

**А. Л. Новокшанова**

# **ОРГАНИЧЕСКАЯ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ И ФИЗКОЛЛОИДНАЯ ХИМИЯ. ПРАКТИКУМ**

**УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ СПО**

**2-е издание, исправленное и дополненное**

*Рекомендовано Учебно-методическим отделом среднего  
профессионального образования в качестве учебного  
пособия для студентов образовательных учреждений среднего  
профессионального образования*

**Книга доступна в электронной библиотечной системе  
[biblio-online.ru](http://biblio-online.ru)**

**Москва ■ Юрайт ■ 2019**

УДК 54(075.32)

ББК 24.1я723

Н74

**Автор:**

**Новокшанова Алла Львовна** — доцент, кандидат технических наук, доцент кафедры технологии молока и молочных продуктов технологического факультета Вологодской государственной молочнохозяйственной академии имени Н. В. Верещагина.

**Рецензенты:**

*Воропай Л. М.* — кандидат химических наук, доцент кафедры химии Вологодского государственного университета;

*Гнездилова А. И.* — доктор технических наук, профессор кафедры технологического оборудования Вологодской государственной молочнохозяйственной академии имени Н. В. Верещагина.

**Новокшанова, А. Л.**

Н74

Органическая, биологическая и физколлоидная химия. Практикум : учеб. пособие для СПО / А. Л. Новокшанова. — 2-е изд., испр. и доп. — М. : Издательство Юрайт, 2019. — 222 с. — Серия : Профессиональное образование.

ISBN 978-5-534-03708-1

Учебное пособие посвящено сущности биохимических процессов, происходящих в животных организмах. При освоении практикума студенты получают знания о химическом составе организма, обмене веществ и энергии, научатся устанавливать связь между структурой химических соединений и процессами их превращений в животном организме, от пути их поступления до выведения из организма в виде продуктов распада.

Соответствует актуальным требованиям Федерального государственного образовательного стандарта среднего профессионального образования и профессиональным требованиям.

*Для студентов образовательных учреждений среднего профессионального образования.*

УДК 54(075.32)

ББК 24.1я723



*Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав. Правовую поддержку издательства обеспечивает юридическая компания «Дельфи».*

© Новокшанова А. Л., 2009

© Новокшанова А. Л., 2017, с изменениями

© ООО «Издательство Юрайт», 2019

ISBN 978-5-534-03708-1

## Оглавление

<b>Предисловие .....</b>	<b>7</b>
<b>Тема 1. Углеводороды.....</b>	<b>9</b>
1.1. Классификация органических соединений.....	9
1.2. Международная номенклатура (ИЮПАК) углеводородов .....	11
<b>Тема 2. Методы разделения и очистки органических соединений .....</b>	<b>22</b>
2.1. Перегонка при атмосферном давлении .....	22
2.2. Фильтрация при пониженном давлении .....	26
2.3. Экстрагирование растворов.....	29
<b>Тема 3. Оксисоединения .....</b>	<b>32</b>
3.1. Образование металлических производных одноатомных спиртов.....	32
3.2. Образование металлических производных многоатомных спиртов.....	34
3.3. Образование простого эфира .....	36
3.4. Окисление спиртов .....	38
<b>Тема 4. Оксосоединения .....</b>	<b>42</b>
4.1. Реакция серебряного зеркала.....	42
4.2. Окисление альдегидов соединениями двухвалентной меди.....	44
4.3. Получение ацетона пиролизом соли карбоновой кислоты .....	45
4.4. Йодоформная реакция (проба Либена) .....	47
4.5. Альдольная и кротоновая конденсация уксусного альдегида.....	48
<b>Тема 5. Карбоновые кислоты.....</b>	<b>51</b>
5.1. Окисление муравьиной кислоты .....	51
5.2. Образование кислой и средней солей винной кислоты.....	53
5.3. Разложение дикарбоновых кислот при нагревании.....	55
5.4. Разложение лимонной кислоты концентрированной серной кислотой .....	57
5.5. Образование комплекса средней соли винной кислоты с медью ....	60
<b>Тема 6. Липиды .....</b>	<b>62</b>
6.1. Растворимость жиров .....	62
6.2. Омыление жиров щелочью .....	64
6.3. Выделение жирных кислот из мыла.....	65

<b>Тема 7. Углеводы.....</b>	<b>69</b>
7.1. Окисление альдоз аммиачным раствором оксида серебра .....	69
7.2. Окисление альдоз гидроксидом двухвалентной меди .....	72
7.3. Реакция Селиванова на кетозы .....	73
7.4. Кислотный гидролиз сахарозы .....	75
7.5. Кислотный гидролиз крахмала .....	76
<b>Тема 8. Аминокислоты .....</b>	<b>81</b>
8.1. Хроматографическое разделение смеси аминокислот на бумаге ....	81
8.2. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского).....	85
8.3. Нингидриновая реакция .....	87
8.4. Ксантопротеиновая реакция .....	90
8.5. Азотно-ртутная реакция (реакция Миллона) .....	91
8.6. Реакция на серосодержащие аминокислоты (реакция Фоля) .....	92
<b>Тема 9. Белки .....</b>	<b>95</b>
9.1. Осаждение белков при комнатной температуре нейтральными солями .....	95
9.2. Осаждение белков ионами тяжелых металлов .....	98
9.3. Осаждение белков спиртом и ацетоном .....	99
9.4. Очистка белков методом диализа.....	100
9.5. Амфотерные и буферные свойства растворов белков .....	102
9.6. Определение изоэлектрической точки белков.....	103
<b>Тема 10. Ферменты.....</b>	<b>106</b>
10.1. Сравнение действия ферментов и небиологических катализаторов .....	106
10.2. Специфичность ферментов .....	108
10.3. Термостабильность ферментов.....	110
10.4. Влияние рН среды на активность ферментов.....	112
10.5. Влияние посторонних веществ на активность ферментов .....	115
10.6. Изучение скорости ферментативной реакции в зависимости от количества фермента .....	117
<b>Тема 11. Витамины .....</b>	<b>120</b>
11.1. Определение массовой доли витамина С в кормах и молоке .....	120
<b>Тема 12. Обмен углеводов .....</b>	<b>126</b>
12.1. Исследование переваримости крахмала и клетчатки ферментами слюны.....	126
12.2. Использование неорганического фосфата при окислении углеводов.....	129
12.3. Открытие продуктов брожения глюкозы .....	132
12.4. Определение массовой доли крахмала в зерне и картофеле поляриметрическим методом .....	135

<b>Тема 13. Обмен липидов.....</b>	<b>141</b>
13.1. Определение температуры плавления жиров животного происхождения .....	141
13.2. Определение числа омыления жира.....	144
13.3. Определение йодного числа жира.....	146
13.4. Определение кислотного числа жира .....	149
13.5. Качественное открытие гидролиза жиров ферментами.....	150
13.6. Качественное открытие действия фосфолипаз поджелудочной железы .....	152
13.7. Эмульгирование жиров.....	153
13.8. Исследование динамики гидролиза липидов под действием ферментного препарата «Панкреатин» .....	154
<b>Тема 14. Обмен белков.....</b>	<b>158</b>
14.1. Качественное открытие гидролиза белков ферментами .....	158
14.2. Исследование динамики гидролиза белков под действием ферментного препарата «Панкреатин» .....	160
14.3. Определение содержания азота в кормах методом Кьельдаля.....	163
14.4. Определение общего белка в кормах.....	166
<b>Тема 15. Биохимия крови .....</b>	<b>170</b>
15.1. Определение массовой доли белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом .....	170
15.2. Определение массовой доли глюкозы в крови фотоколориметрическим методом.....	175
15.3. Определение массовой доли кальция в сыворотке крови трилометрическим методом .....	178
15.4. Определение резервной щелочности крови по Раевскому .....	181
<b>Тема 16. Биохимия мочи .....</b>	<b>186</b>
16.1. Определение плотности мочи.....	186
16.2. Качественное определение белка в моче (проба Геллера).....	187
16.3. Качественное определение сахара в моче.....	189
16.4. Качественное определение кетоновых тел в моче .....	190
16.5. Количественное определение пировиноградной кислоты в моче .....	191
<b>Тема 17. Патологическое молоко .....</b>	<b>195</b>
17.1. Определение примеси аномального молока в сборном по пробе с мастоприимом .....	195
17.2. Проба на редуктазу с метиленовым голубым.....	198
17.3. Определение активности каталазы в молоке методом перманганатометрии.....	200
17.4. Определение массовой доли углеводов в молоке йодометрическим методом .....	203

17.5. Определение массовой доли хлоридов в молоке .....	206
17.6. Расчет хлор-сахарного числа .....	208
<b>Приложения.....</b>	<b>210</b>
Приложение 1. Общепринятые тривиальные названия некоторых соединений .....	210
Приложение 2. Кисотно-основные индикаторы.....	214
Приложение 3. Меры предосторожности при работе в лаборатории .....	217
Приложение 4. Мытье и сушка химической посуды .....	219
<b>Использованная литература.....</b>	<b>220</b>
<b>Рекомендуемая литература.....</b>	<b>222</b>

## ПРЕДИСЛОВИЕ

В освоении любых химических дисциплин наряду с общепринятой химической символикой и уравнениями реакций традиционно используются лабораторные опыты. Именно реальные практические испытания позволяют визуализировать протекающие химические процессы и зачастую оставляют самый яркий отпечаток от изучения химии. Прежде всего, это касается студентов, для которых химия не является профильной дисциплиной.

Особенность данного практикума заключается в том, что, во-первых, он применим в освоении органической, биологической, физколлоидной химии и нескольких разделов аналитической химии. Во-вторых, большинство работ имеют прикладной характер, поэтому их можно использовать не только в изучении химии, но и в научно-исследовательской работе студентов при выполнении курсовых и выпускных квалификационных работ. И третья, не менее важная особенность, почти все работы практикума осуществимы в условиях самой экономно оснащенной лаборатории.

Структура практикума в целом представлена отдельными тематическими блоками. Темы 1 и 2 включают общие сведения по органической, биологической и физколлоидной химии. Темы 3—8 предназначены для изучения классов органических соединений и их химических и физико-химических свойств. В темах 9—14 рассматриваются вопросы динамической биохимии, а в темах 15—17 — вопросы функциональной биохимии. Работы 2-й и 9-й тем имеют прямое отношение к физколлоидной химии.

Первое издание практикума было предназначено для студентов, обучающихся по специальности «Зоотехния». Опыт показал, что преимущественное большинство тем и работ также актуально и для студентов среднего профессионального образования, в чьих учебных планах есть дисциплины органическая, биологическая, физколлоидная химия или одноименные разделы в дисциплине химия.

В частности практикум можно рекомендовать для студентов, обучающихся по специальности «Химические технологии» для профилей «Лаборант-эколог», «Аналитический контроль качества химиче-



ских соединений», «Химическая технология органических веществ» и по специальности «Промышленная экология и биотехнологии» для профилей «Биохимическое производство», «Технология хранения и переработки зерна», «Технология хлеба, кондитерских и макаронных изделий», «Технология сахаристых продуктов», «Технология бродильных производств и виноделие», «Технология консервов и пищевых концентратов», «Технология молока и молочных продуктов», «Технология мяса и мясных продуктов», «Технология жиров и жирозаменителей», «Технология продукции общественного питания».

В результате изучения курса студент должен освоить:

***трудовые действия***

- владение практическими навыками использования лабораторного оборудования и приборов при выполнении экспериментальных исследований, значимых для будущей профессиональной деятельности;

***необходимые знания***

- основные понятия органической, биологической, физколлоидной химии;
- свойства важнейших классов органических и биоорганических соединений, биополимеров и дисперсных систем;

***необходимые умения***

- проводить лабораторные эксперименты по заданной методике, составлять их описание и анализировать полученные практические результаты.

## ТЕМА 1. УГЛЕВОДОРОДЫ

### Цель занятия:

- усвоить теоретический материал по теме «Углеводороды»;
- знать классификацию органических соединений и освоить основные положения номенклатуры ИЮПАК.

### Задачи занятия:

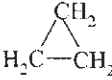



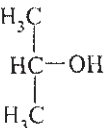
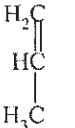
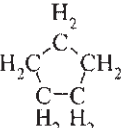
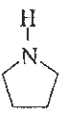
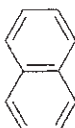
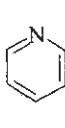
- выучить правила систематической номенклатуры ИЮПАК;
- знать наизусть счет углеродных атомов, названия распространенных радикалов, функциональные группы с названиями приставок и суффиксов;
- научиться давать названия органических соединений, зная их структурные формулы, и, наоборот, по названию соединения уметь отобразить его строение.

### 1.1. Классификация органических соединений

Органических соединений на Земле великое множество. Их гораздо больше, чем неорганических. За последние 120 лет список органических веществ увеличился в 1500 раз [32]. Чтобы каждому соединению дать единственное название, разработана система классификации всех известных органических соединений.

Первые попытки классифицировать органические соединения были сделаны в начале XIX в. Но только введение в 1861 г. А. М. Бутлеровым представления о *химическом строении* как о порядке связей атомов в молекуле дало начало современной классификации органических веществ.

Основой этой классификации служит *структура углеродного скелета*. Соединение относится к определенному классу в зависимости от того, какой у него углеродный скелет: разветвленный или линейный, содержит атомы иных элементов или состоит исключительно из атомов углерода и водорода, замкнут в цикл или вытянут в цепочку [32]. Такой вариант классификации можно отразить в виде схемы (рис. 1).

Органические соединения					
Ациклические соединения (с незамкнутой углеродной цепью)		Циклические соединения (с замкнутой углеродной цепью)			
Соединения с предельной углеродной цепью	Соединения с непредель- ной углерод- ной цепью	Алициклические соединения		Ароматические соединения	
		карбоцик- лические соединения	соединения, включающие гетероатом	ароматические карбоцикли- ческие соединения	ароматические гетероцикли- ческие соединения
$\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_3$  этан	$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}_2$  этен	 циклопропан	 тетрагидро- фуран	 бензол	 фуран
 2- пропанол	 1- пропен	 циклопентан	 пирролидин	 нафталин	 пиридин

**Рис. 1.** Классификация органических веществ

Другой принцип классификации органических веществ опирается на понятия: *гомологический ряд* и *функциональная группа*. Гомологи имеют сходные строение и свойства, но отличаются между собой по составу молекул на одну или несколько групп  $\text{CH}_2$  — так называемую гомологическую разность. Гомологи составляют гомологические ряды. Члены большинства гомологических рядов содержат характерные функциональные группы — атом или группу атомов, которые определяют общие химические свойства гомологов. Наиболее важные классы органических соединений можно представить на следующей схеме (рис. 2).

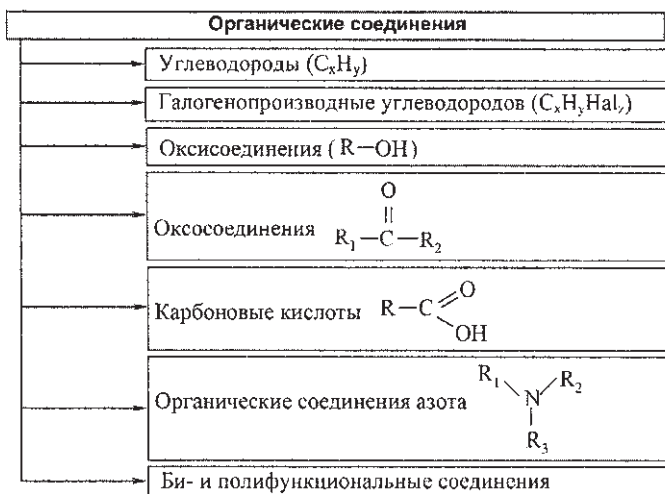


Рис. 2. Классы органических соединений

Такого деления придерживается и курс органической, биологической и физколлоидной химии. Перечисленные классы рассматриваются в отдельности, а также как составные компоненты более сложных биоорганических соединений.

В силу ограниченности часов на данную дисциплину классы углеводородов и их галогенопроизводных, изучаемые в курсе средней школы, оставлены студентам для самостоятельного повторения.

## 1.2. Международная номенклатура (ИЮПАК) углеводов

**Краткая теория к работе.** Химическая номенклатура — это свод правил, по которым строится название соединения. Важнейший принцип номенклатуры — однозначность, то есть данной структуре должно соответствовать единственное название, и наоборот [32].

Существует несколько разновидностей номенклатуры органических соединений.

*Тривиальная* (фр. *trivial* — избитый, обыденный) номенклатура возникла раньше всех. В основе тривиальных названий органических соединений лежат растительные или животные источники, из которых выделено вещество, имя исследователя или другие случайные при-

знаки. Примерами могут служить муравьиная, яблочная, винная кислоты, молочный сахар, винный и древесный спирты и др.

Тривиальные названия используют также для соединений, структура которых настолько сложна, что их систематические названия чересчур громоздки. Наконец, многие простые по строению соединения (ацетон, ацетилен) имеют тривиальные названия, которые настолько укоренились, что их систематические названия применяют редко.

Другой вид номенклатуры — *рациональная* (радикально-функциональная). В ней любое вещество рассматривается как производное простейшего прототипа, полученное путем замены атомов водорода на некоторые радикалы. Поэтому за основу названия соединения берется название исходного простейшего вещества. Перед ним в качестве приставок указываются усложняющие радикалы. Например, тетраметилметан, метилэтилкетон, фенилуксусная кислота. Подобные названия очень часто употребляются химиками и в наши дни, как в лабораторной практике, так и на страницах химических журналов.

Химики еще в XIX веке остро ощущали необходимость в международном согласовании номенклатуры. В XX веке в связи со стремительным развитием химии возникла потребность систематического проведения работы по согласованию и стандартизации терминологии и номенклатуры. В 1919 г. был образован ИЮПАК — Международный союз теоретической и прикладной химии (англ. International Union of Pure and Applied Chemistry — IUPAC) [32]. Эта неправительственная организация разработала правила, позволяющие называть любое органическое соединение.

Современная номенклатура ИЮПАК считается *заместительной*, так как название органического соединения определяется названием углеводородной основы, а также названием заместителей и функциональных групп.

В названии органического соединения корень слова всегда обозначает углеводородную основу. Название углеводородной основы определяется числом углеродных атомов в самой длинной цепи (табл. 1).









Таблица 1

Число атомов углерода	Название
1 атом углерода	мет
2 атома углерода	эт

3 атома углерода	проп
4 атома углерода	бут
5 атомов углерода	пент
6 атомов углерода	гекс
7 атомов углерода	гепт
8 атомов углерода	окт
9 атомов углерода	нон
10 атомов углерода	дек

В качестве *заместителя* рассматривается любой атом или группа атомов, замещающих водород. Углеводородные заместители иначе называются радикалами. В основу их названия также положено число углеродных атомов. Заканчивается название радикала суффиксом — *ил*. Наиболее распространенные радикалы представлены в табл. 2.

Таблица 2

Формула	Название
$\text{CH}_3 -$	 метил
$\text{C}_2\text{H}_5 -$	 этил
$\text{C}_3\text{H}_7 -$	 пропи́л
$\text{C}_4\text{H}_9 -$	 бути́л
$\text{C}_5\text{H}_{11} -$	 пенти́л
$\text{C}_6\text{H}_{13} -$	 гексиль
$\text{C}_6\text{H}_5 - \left( \text{benzene ring} \right)$	 фени́л
$\text{C}_6\text{H}_5 \text{CH}_2 - \left( \text{benzene ring} - \text{CH}_2 \right)$	 бензи́л

*Функциональной группой* считается атом или группа атомов неуглеводородного характера, которые определяют принадлежность соеди-

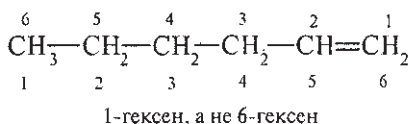
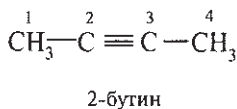
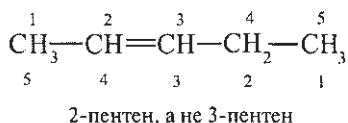
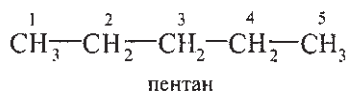
нения к тому или иному классу. Наиболее важные функциональные группы с названиями приставок и суффиксов перечислены в порядке уменьшения старшинства в табл. 3.

Таблица 3

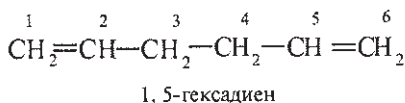
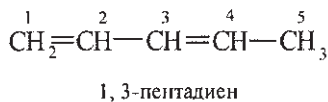
Группа	Приставка	Суффикс
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{OH} \end{array}$	карбокси-	-овая кислота
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{O}-\text{R} \end{array}$	алкоксикарбонил-	-оат
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$	карбамоил-	-амид
$-\text{CN}$	циан-	-нитрил
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{H} \end{array}$	оксо-	-аль
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}- \end{array}$	оксо-	-он
$-\text{OH}$	окси-	-ол
$-\text{SH}$	меркапто-	-тиол
$-\text{NH}_2$	амино-	-амин

**Составление названий по формуле.** Чтобы дать название соединению, надо внимательно рассмотреть формулу и выделить в ней углеводородную основу. Это может быть прямая или разветвленная углеводородная цепь, цикл или ароматическое соединение.

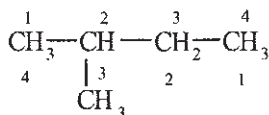
Название углеводородов с прямой цепью строится из названия числа *углеродных атомов* с добавлением суффикса *-ан*, если все связи между атомами углерода одинарные, *-ен* — при наличии двойных связей или *-ин* — для тройных связей. Положение двойной или тройной связей указывают *цифрами*. Причем цифры должны быть минимальными:



Если кратных связей в молекуле несколько, то их количество указывают соответствующими приставками (ди-, три-, тетра- и т. д.), которые ставят перед суффиксом. Положение кратных связей указывают *цифрами*:

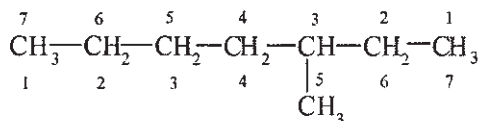


Углеводороды с заместителями имеют разветвленные цепи. Чтобы дать им название, необходимо выбрать самую длинную цепь и пронумеровать так, чтобы цифры у заместителей были минимальными:



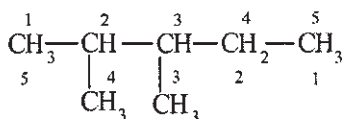
2-метилбутан, а не 3-метилбутан



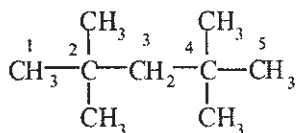


3-метилгептан, а не 5-метилгептан

Когда в молекуле есть несколько одинаковых заместителей, то перед названием радикалов указывается их количество соответствующими приставками (*ди-*, *три-*, *тетра-* и т. д.):

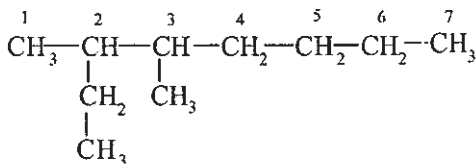


2,3-диметилпентан, а не 3, 4-диметилпентан

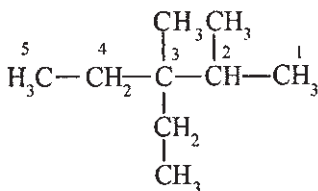


2, 2, 4, 4-тетраметилпентан

Если в молекуле есть несколько разных заместителей, то они перечисляются в порядке увеличения массы:

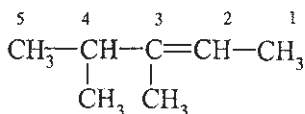


3-метил-2-этилгептан

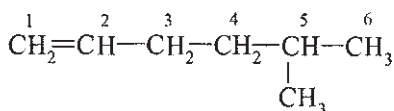


2, 3-диметил-3-этилпентан

В молекулах с заместителями и кратными связями основу нумеруют так, чтобы углеродные атомы, участвующие в образовании кратной связи, получили номера, наименьшие из возможных:

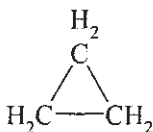


3, 4-диметил-2-пентен

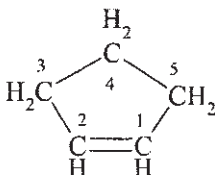


5-метил-1-гексен

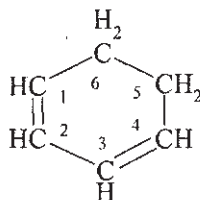
Циклические углеводороды называют, добавляя приставку *цикло-* к названию углеводорода с прямой цепью:



циклопропан

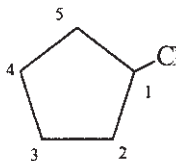


циклопентен

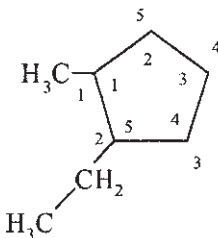


1,3-циклогексадиен

Если в циклических углеводородах есть заместители, то нумерацию начинают от атома углерода, при котором есть заместитель. Когда заместителей несколько, то цикл нумеруют так, чтобы у заместителей были наименьшие номера:



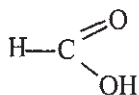
1-метилциклопентан



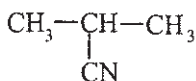
1-метил-2-этилциклопентан,  
а не 1-метил-5-этилциклопентан

Любая из таких углеводородных основ может иметь одну или несколько функциональных групп. Здесь возможны два основных варианта.

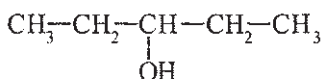
В молекуле есть *одна или несколько одинаковых функциональных групп*. В таких случаях соответствующий суффикс ставится после названия углеводорода. Местоположение функциональных групп указывается *цифрами*:



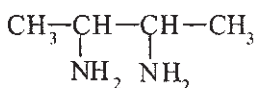
метановая кислота



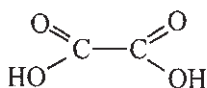
2-пропаннитрил



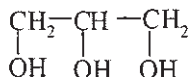
3-пентанол



2, 3-бутандиамин

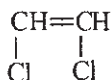


1, 2-этандиовая кислота

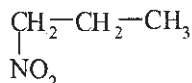


1, 2, 3-пропантриол

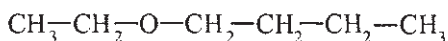
Исключение составляют галогено-, нитропроизводные и простые эфиры, которые называют, добавляя соответствующую *приставку* к названию родительского углеводорода:



1, 2-дихлорэтен

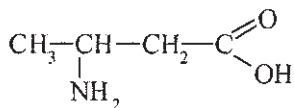


1-нитропропан

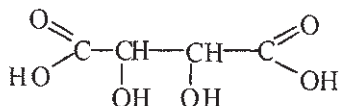


этоксипутан

В молекуле есть *две или больше разных функциональных групп*. В таких случаях наиболее старшая группа обозначается суффиксом, а все остальные — соответствующими приставками:



3-амино-1-бутановая кислота



2, 3-диокси-1, 4-бутандиовая кислота

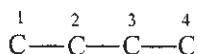
**Построение формулы по названию соединения.** Построение формулы по названию соединения напоминает разбор слова по составу.

Прежде всего, в названии необходимо выделить основу (корень слова). Основа обозначает число углеродных атомов, соединенных одинарными, двойными или тройными связями; показывает число и положение кратных связей. Приставка *цикло-* перед названием основы показывает, что цепь замкнута в цикл. Корень *бенз-* означает, что в основе лежит ароматическое кольцо.

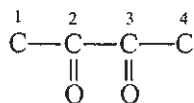
Далее выделяют приставки или суффиксы, если они есть. Приставки *ди-*, *три-*, *тетра-* (и т. д.) обозначают число одинаковых фрагментов.

Группы, обозначаемые приставками или суффиксами, достраивают к основе.

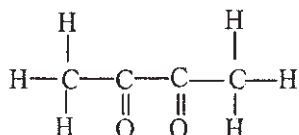
Например, в названии *2, 3-бутандион* основа *бутан* означает, что четыре атома углерода соединены одинарными связями. Схематично показывают это и нумеруют углеродные атомы:



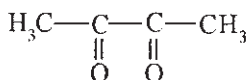
Суффикс *-он* обозначает карбонильную группу. Поскольку перед суффиксом есть приставка *ди-*, значит карбонильных групп две. Они расположены у 2-го и 3-го углеродных атомов:



Недостающие связи углеродных атомов соединяют с атомами водорода. Окончательно формула выглядит так:



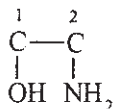
Или сокращенно:



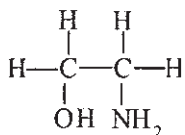
Другой пример: *2-амино-1-этанол*. Основа *этан* означает, что два атома углерода соединены одинарной связью. Схематично показывают это и нумеруют углеродные атомы:



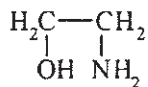
Приставка *амино-* обозначает  $\text{NH}_2$ -группу, а цифра 2 — ее местоположение. Суффикс *-ол* обозначает  $\text{OH}$ -группу, которая находится у 1-го углеродного атома, на что указывает цифра 1:



Недостающие связи углеродных атомов соединяют с атомами водорода. Окончательно формула выглядит так:



Или сокращенно:



### Вопросы для самоконтроля

1. Какие существуют варианты классификации органических соединений?
2. Какие углеводороды называются предельными? Какие типы реакций для них характерны?
3. Какие углеводороды относят к классу алкенов? Какие химические свойства для них характерны?
4. Какие углеводороды относят к классу алкинов? Какие типы реакций для них характерны?
5. Какие углеводороды относят к классу ароматических? Какие типы реакций для них характерны?
6. Какие виды номенклатуры используются для названия органических соединений?
7. Что положено в основу современной номенклатуры органических соединений?
8. Что такое функциональная группа? Примеры наиболее важных функциональных групп.

## ТЕМА 2. МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

### Цель занятия:

- усвоить правила работы и требования техники безопасности в лабораториях органической и биологической химии;
- ознакомиться с основным оборудованием и посудой, которая используется в этих лабораториях.

### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию по методам разделения и очистки органических соединений;
- знать сущность различных способов разделения и очистки органических соединений и ход проведения опытов;
- провести опыты по разделению суспензий, простой перегонке, разделению несмешивающихся жидкостей;
- выполнить расчеты, сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 2.1. Перегонка при атмосферном давлении

**Краткая теория к работе.** Перегонка — это очистка жидкости испарением и конденсацией. Метод основан на том, что разные жидкости имеют неодинаковые температуры кипения. В результате, образующийся при перегонке пар имеет другой состав по сравнению с жидкостью. Нелетучие примеси остаются в перегонной колбе.

Некоторые жидкости образуют смеси, перегоняющиеся вместе; их называют *нераздельнокипящими* или *азеотропными*. Например, этанол и вода перегоняются в виде смеси, содержащей 95% этанола и 5% воды.

Способы перегонки разделяются на две группы: *простая перегонка* и *ректификация*.

Простую перегонку применяют, когда температуры кипения веществ, входящих в состав перегоняемой смеси, значительно отличаются друг от друга. Удовлетворительное разделение достигается при разнице в температурах кипения перегоняемых жидкостей не менее 80 °С [11].

Для перегонки наиболее подходящим является интервал температур от 40 до 150 °С. При перегонке веществ, кипящих ниже 40 °С, нужна специальная аппаратура. При температуре выше 150 °С многие органические вещества начинают заметно разлагаться.

Перегонка применяется: для удаления растворителей, для разделения нескольких продуктов реакции, для очистки от примесей.

В процессе перегонки постоянно следят за термометром, так как у каждого вещества своя температура кипения. Участок шкалы термометра, включающий ожидаемую температуру кипения жидкости, не должен быть закрыт пробкой. Нельзя допускать, чтобы термометр касался стенок сосуда.

В перегонной колбе из-за местного перегрева могут наблюдаться толчки жидкости, неравномерное кипение или даже перебрасывание жидкости из сосуда. Для предотвращения этого до нагревания в колбу для отгонки помещают *кипятильные камешки*. Это могут быть кусочки пемзы, кирпича, осколки глиняной посуды и других пористых материалов размером с пшеничное зерно или запаянные с одного конца стеклянные капилляры. И использованные кипятильные камешки выбрасывают.

При *перегонке* пары кипящей жидкости непосредственно из перегонной колбы поступают в холодильник, где превращаются в конденсат. Таким образом, разделение смеси жидкостей происходит на стадии испарения.

При перегонке смеси сначала отделяется наиболее летучее, то есть имеющее самую низкую температуру кипения, вещество. Потом колбу нагревают сильнее, достигая температуры кипения другого вещества, и так до тех пор, пока не перегонятся все компоненты. Для каждого вещества необходима своя приемная колба. В результате из смеси жидкостей получают несколько чистых, индивидуальных веществ.

По условиям проведения различают три вида перегонки: при атмосферном давлении, в вакууме, с водяным паром. Вакуумная перегонка спасает малолетучие органические вещества от разложения. Перегонку с водяным паром применяют для удаления растворителей и для отделения основного вещества от примесей.



*Ректификацию* применяют для разделения или очистки жидкостей с близкими температурами кипения. При этом используют специальные ректификационные колонки, в которых поднимающиеся пары взаимодействуют со стекающей навстречу им жидкостью (флегмой), образующейся в результате частичной конденсации паров. В результате многократно повторяющихся частичных испарений и конденсаций пары обогащаются легкокипящим компонентом, а высококипящий компонент стекает вместе с флегмой в перегонную колбу.

Эффективные колонки, используемые в промышленности или научных исследованиях, позволяют разделить жидкости, отличающиеся по температуре кипения менее чем на  $1^{\circ}\text{C}$ . На лабораторных колонках разделяют жидкости с разницей температур кипения не менее  $10^{\circ}\text{C}$ .

**Сущность метода.** Для простой перегонки при атмосферном давлении используют специальную посуду и оборудование. Сосудом для отгонки служит специальная колба с отводной трубкой — колба Вюрца. Холодильник, из которого конденсат не попадает обратно в перегонную колбу, а направляется в приемник, называется прямым или нисходящим, холодильником. Если температура перегоняемой жидкости ниже  $120...130^{\circ}\text{C}$ , в качестве прямого холодильника используется холодильник с водяной рубашкой — холодильник Либиха. Приемником служит плоскодонная колба, которая герметически соединяется с холодильником через алонж. Перегонную колбу нагревают на водяной, масляной, металлической или солевой бане. Выбор вида бани зависит от температуры кипения перегоняемой жидкости, ее горючести и взрывоопасности.

Для безопасности любую перегонку лучше всего проводить в вытяжном шкафу.

#### **Оборудование и реактивы:**

- штативы и лапки для них, водяная баня, электрическая плитка, колба Вюрца вместимостью  $100\text{ см}^3$ , пробка с термометром, холодильник Либиха, коническая колба вместимостью  $100\text{ см}^3$ , алонж, мерный цилиндр вместимостью  $25\text{ см}^3$ ;
- жидкость для перегонки.

**Ход работы.** Для простой перегонки при атмосферном давлении собирают следующую установку (рис. 3).

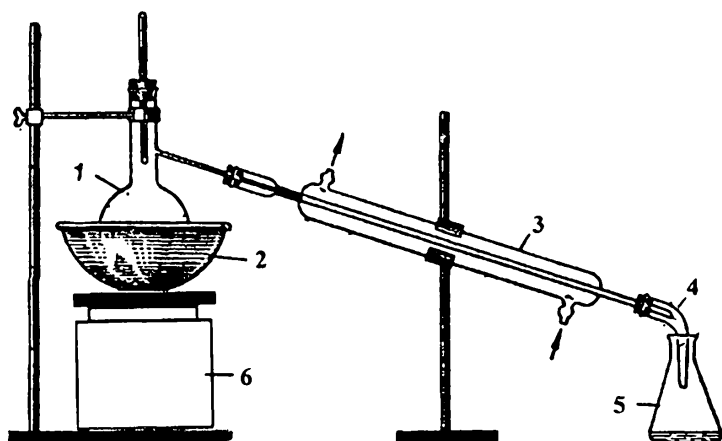


Рис. 3. Установка для простой перегонки при атмосферном давлении

Колбу Вюрца (1) закрепляют в лапке штатива за горловину так, чтобы рабочая часть колбы погрузилась в водяную баню (2).

Холодильник Либиха (3) закрепляют в штативе за среднюю часть. При этом обращают внимание, чтобы стеклянный патрубок для подвода воды был направлен вертикально вниз, а для отвода воды — вертикально вверх. При таком расположении холодильника вся его рубашка заполняется водой. Во время перегонки следует строго следить за тем, чтобы вода непрерывно поступала в холодильник, иначе может возникнуть пожар или взрыв.

Выходной конец холодильника соединяют с аллонжем (4), который направляют в приемную колбу (5).

После того как установка собрана и все ее части плотно соединены друг с другом, в колбу Вюрца через воронку вносят смесь для разделения и несколько кипяtilьных камешков. После заполнения перегонную колбу закрывают пробкой с термометром. При этом обращают внимание на то, чтобы ртутный шарик термометра находился примерно на 0,5 см ниже отверстия отводной трубки и чтобы он хорошо омывался парами перегоняемой жидкости.

Установка собрана правильно, если отросток колбы Вюрца, холодильник и горловина аллонжа представляют прямую линию, а при-

емная колба устойчиво расположена на рабочем столе. Проверив это, включают электроплитку (6).

Начало перегонки отмечают по первой капле конденсата, поступившей в приемную колбу. Перегонку ведут с такой скоростью, чтобы в течение секунды в приемник попадало не более 1...2 капель дистиллята.

По окончании перегонки отключают водяную баню и водопроводную воду, поступающую в холодильник. Дожидаются охлаждения перегонной колбы, разбирают установку.

С помощью мерного цилиндра измеряют объем полученного дистиллята. Далее проводят расчеты для оценки эффективности метода разделения.

Долю чистого вещества в смеси рассчитывают по формуле:

$$W_B = \frac{V_2}{V_1} \cdot 100$$

где  $W_B$  — массовая доля чистого вещества в смеси, %;  $V_1$  — объем смеси до перегонки, см<sup>3</sup>;  $V_2$  — объем смеси после перегонки, см<sup>3</sup>.

Долю примесей в смеси рассчитывают по формуле:

$$W_{\Pi} = \frac{V_1 - V_2}{V_1} \cdot 100$$

где  $W_{\Pi}$  — массовая доля примесей в смеси, %;  $V_1$  — объем смеси до перегонки, см<sup>3</sup>;  $V_2$  — объем смеси после перегонки, см<sup>3</sup>.

## 2.2. Фильтрация при пониженном давлении

**Краткая теория к работе.** Фильтрация — эффективный метод разделения неоднородных систем.

*Фильтрованием* называют отделение твердой фазы от жидкой при пропускании жидкости через фильтр. Фильтр — это пористый материал, пропускающий жидкость и задерживающий твердое вещество. В лабораторных условиях пользуются чаще всего бумажными фильтрами. В промышленности в качестве фильтров применяют специальные плотные ткани, песок, различные пористые материалы.

Обычно фильтрация протекает под действием гидростатического давления фильтруемой жидкости. Для ускорения процесса фильтрации и более полного отделения органических соединений от

маточных растворов этот процесс проводят, создавая перепад давления между областями над фильтром и под фильтром.

Фильтрация горячих растворов в лаборатории проводят в воронках с обогревом, чтобы избежать кристаллизации растворенных веществ. Для фильтрации нестойких при комнатной температуре веществ или растворов с летучими растворителями используют системы охлаждения.

**Сущность метода.** Фильтрация — простейший способ отделения твердого вещества от жидкости. Эффективность фильтрации возрастает при повышении давления над фильтром или при понижении давления под фильтром.

В лабораторных условиях перепада давления проще достигнуть, создавая разрежение под фильтром. Иначе этот процесс называют *отсасывание*. Для него используют специальную посуду и оборудование.

В установку для фильтрации под вакуумом (рис. 4) входит нутч-фильтр, который состоит из толстостенной конической колбы для работы под вакуумом — колба Бунзена (1) и из цилиндрической воронки с сетчатым дном — воронка Бюхнера (2).

При фильтрации удобно пользоваться вакуумным насосом системы Комовского. Это небольшой прибор с ручным приводом, дающий хорошее разрежение.

На сетчатое дно воронки кладут лист фильтровальной бумаги, по размерам точно совпадающий с площадью дна воронки, а колбу подключают к вакуумному насосу.

На нутч-фильтре можно фильтровать только холодные суспензии. Размеры воронки Бюхнера и колбы Бунзена должны соответствовать количеству осадка и объему filtrата.

При фильтрации очень мелких осадков на дно воронки Бюхнера кладут два-три слоя фильтровальной бумаги. В больших воронках Бюхнера для предохранения фильтровальной бумаги от разрыва ее покрывают фильтром из ткани, который, кроме того, облегчает удаление осадка с фильтра.

В целях безопасности при фильтрации под вакуумом колбу Бунзена объемом более одного литра необходимо обернуть полотенцем.

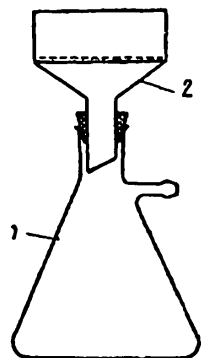


Рис. 4. Установка для фильтрации под вакуумом

### Оборудование и реактивы:

- воронка Бюхнера, колба Бунзена, вакуумный насос системы Кововского, весы лабораторные технические, фарфоровая чашка, стеклянная палочка, фильтровальная бумага, ножницы;
- суспензия аспирина в воде.

**Ход работы.** Из фильтровальной бумаги вырезают фильтр, по размерам точно совпадающий с площадью дна воронки Бюхнера. Воронку укрепляют на колбе Бунзена, колбу соединяют с вакуумным насосом.

Перед началом работы фильтр укладывают на сетчатое дно воронки, смачивают его дистиллированной водой и делают несколько поворотов маховика вакуум-насоса. При этом бумага присасывается к дну воронки. Если этого не происходит, значит, система не изолирована. Поэтому необходимо проверить герметичность всех соединений.

Как только фильтр присосется к дну воронки, колбу Бунзена отключают от вакуум-насоса, и лишь после этого в воронку Бюхнера приливают первую порцию фильтруемой массы. Затем колбу Бунзена вновь присоединяют к вакуумному насосу и начинают фильтрацию. В процессе фильтрования по мере опорожнения воронки Бюхнера ее равномерно заполняют и периодически вращают маховик.

Отсасывание продолжают до тех пор, пока жидкость не перестанет капать с конца воронки. Затем осадок промывают дистиллированной водой. Промывку проводят небольшими порциями. При этом сначала колбу Бунзена соединяют с атмосферой и пропитывают осадок на фильтре дистиллированной водой. Затем, вращая маховик насоса, в колбе создают вакуум, и промывную жидкость тщательно отсасывают.

После этого фильтр с осадком при помощи стеклянной палочки осторожно извлекают из воронки Бюхнера и переносят в фарфоровую чашку. Фильтр отделяют от еще влажного осадка. Затем осадок сушат и взвешивают.

Эффективность работы оценивают расчетом потерь аспирина при фильтровании. Потери аспирина при фильтровании рассчитывают по формуле:

$$W_{\text{п}} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100$$

где  $W_{\text{п}}$  — массовая доля потерь аспирина при фильтровании, %;  $m_1$  — масса аспирина до фильтрования, г;  $m_2$  — масса аспирина после фильтрования, г.

### 2.3. Экстрагирование растворов

**Краткая теория к работе.** Смесь двух и более веществ можно разделить путем извлечения одного из них с помощью подходящего растворителя. Также можно очистить вещество от примесей, используя растворитель, в котором эти примеси или вещество растворимы. Такой способ называют *извлечение* или *экстрагирование* (от лат. *extractus* — вытянутый). Он основан на различной растворимости веществ в данном растворителе.

Растворитель, применяемый для экстракции, должен лучше растворять экстрагируемое вещество, чем тот растворитель, из которого это вещество извлекается. Кроме этого, выбирая экстрагент, необходимо учитывать ряд факторов: устойчивость вещества в растворе, достаточное различие плотности обеих фаз (на  $0,1 \dots 0,2 \text{ г/см}^3$ ), легкость удаления растворителя из экстракта, простота в обращении и др.

Наиболее распространенные экстрагирующие растворители, которые легче воды, — это диэтиловый и петролейный эфиры, а также бензол. Растворители, которые тяжелее воды, — хлористый метилен, хлороформ, четыреххлористый углерод.

Однократная экстракция не позволяет полностью выделить извлекаемое вещество, поэтому вещества экстрагируют двумя-четырьмя небольшими порциями растворителя.

Чтобы определить, закончилось экстрагирование или нет, несколько капель последней порции экстракта высушивают на часовом стекле. Если проба испаряется без остатка, экстрагирование завершают. Окончание извлечения окрашенных веществ определяют по прекращению окрашивания экстрагирующего растворителя.

**Сущность метода.** *Экстрагированием* называют процесс разделения смеси веществ с помощью растворителя, в котором компоненты смеси неодинаково растворимы.

В лабораторной практике экстрагированию чаще всего подвергают водные растворы. Для этого используют делительную воронку (рис. 5).

Делительную воронку заполняют жидкостью, подлежащей экстракции, и экстрагирующим растворителем не более чем на  $2/3$  объема. При этом объем экстрагирующей жидкости составляет от  $1/5$  до  $1/3$  объема экстрагируемого раствора.

Сущность метода заключается в том, что несмешивающиеся друг с другом жидкости имеют разные плотности. Следствием этого

будет разделение жидких фаз на более легкую и более тяжелую фракции.

**Оборудование и реактивы:**

- штатив и лапки для него, делительная воронка вместимостью 100 см<sup>3</sup>, коническая колба вместимостью 100 см<sup>3</sup>, центрифужная пробирка (градуированная) вместимостью 10 см<sup>3</sup>;
- жидкости для разделения.

**Ход работы.** Делительную воронку закрепляют в штативе за верхнюю часть в вертикальном положении. Убедившись, что кран воронки закрыт, заполняют ее раствором через верхнее отверстие. Закрывают воронку пробкой и оставляют в покое для полного разделения слоев.

Когда разделение слоев достигнуто, нижний слой сливают через кран в приемную колбу. При этом пробка делительной воронки должна быть открыта для выравнивания давления внутри делительной воронки с внешним атмосферным давлением. Верхний слой выливают через верхнее отверстие.

Для измерения объема жидкости после фильтрования используют центрифужную пробирку.

Долю чистого вещества в смеси рассчитывают по формуле:

$$W_{\Pi} = \frac{V_2}{V_1} \cdot 100,$$

где  $W_{\Pi}$  — массовая доля чистого вещества в смеси, %;  $V_1$  — объем смеси до разделения, см<sup>3</sup>;  $V_2$  — объем смеси после разделения, см<sup>3</sup>.

Долю примесей в смеси рассчитывают по формуле:

$$W_{\Pi} = \frac{V_1 - V_2}{V_1} \cdot 100,$$

где  $W_{\Pi}$  — массовая доля примесей в смеси, %;  $V_1$  — объем смеси до разделения, см<sup>3</sup>;  $V_2$  — объем смеси после разделения, см<sup>3</sup>.



Рис. 5. Делительная воронка

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Что такое перегонка? Какие способы перегонки существуют?
2. В каких случаях используют перегонку для разделения смесей?
3. Какое оборудование и посуду применяют для простой перегонки?
4. Что такое фильтрование? Какие способы фильтрования существуют?
5. Какие бывают фильтры?
6. Какую посуду и оборудование используют при фильтровании?
7. Что такое экстракция?
8. В каких случаях применяют экстракцию?
9. Какие растворители используют для экстракции?
10. Какую посуду применяют для экстракции и как ею пользуются?



## ТЕМА 3. ОКСИСОЕДИНЕНИЯ

### Цель занятия:

- освоить материал учебника и лекций по теме «Оксисоединения»;
- разобраться в классификации и номенклатуре спиртов;
- знать формулы и названия наиболее важных представителей оксисоединений;
- знать особенности строения ОН-группы и основные типы химических реакций, характерные для спиртов.

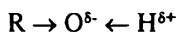
### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- провести эксперименты, подтверждающие кислотные свойства спиртов, способность спиртов к окислению и образованию простых эфиров;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

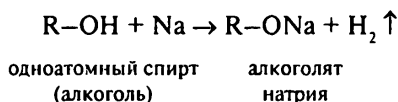
### 3.1. Образование металлических производных одноатомных спиртов

**Краткая теория к работе.** Спирты практически нейтральные вещества. Они не показывают ни кислой, ни щелочной реакции на лакмус, не проводят электрического тока. Однако атом водорода гидроксильной группы спиртов обладает некоторой подвижностью и способен вступать в реакции замещения. В этих реакциях спирты обладают свойствами кислот. Однако кислотные свойства проявляются в разной степени и зависят от влияния радикала. Например, фенолы более сильные кислоты, чем одноатомные спирты.

Подвижность гидроксильного водорода зависит также от взаимного влияния атомов кислорода и водорода в гидроксильной группе спирта. Атом кислорода как более электроотрицательный элемент оттягивает электронную плотность от водородного атома и способствует поляризации связи O—H:

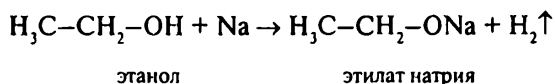


В результате атом водорода может замещаться реакционноспособными металлами, такими как Na, K, Li. Металлические производные одноатомных спиртов называются **алкоголяты**:

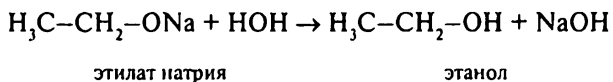


В реакциях образования **алкоголятов** кислотные свойства спиртов выражены еще слабее, чем у воды, и реакция протекает менее энергично. Поэтому спирт часто используют в лаборатории для уничтожения остатков натрия.

**Сущность метода.** Метод основан на способности спиртов образовывать металлические производные за счет замещения атома водорода в гидроксильной группе спирта на катион металла. Одноатомные спирты образуют при этом **алкоголяты**, которые носят название соответствующего спирта, например метилаты — из метанола, этилаты — из этанола и т. д.:



**Алкоголяты** — твердые вещества, обычно хорошо растворимые в соответствующем спирте. Они подобны солям очень слабых кислот и нацело гидролизуются при действии воды с образованием спирта и щелочи:



Образование щелочи можно подтвердить появлением малинового окрашивания в присутствии фенолфталеина.

### **Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирка вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, пинцет, кусочек фильтровальной бумаги, спички, вода дистиллированная;
- 96°-ный этанол, металлический натрий в бюксе с керосином, 1%-ный раствор фенолфталеина.

**Ход работы.** В сухую пробирку наливают 1...2 см<sup>3</sup> 96°-ного этанола и закрепляют ее в держателе. Пинцетом достают из бюкса кусочек очищенного от корочек металлического натрия и отжимают его от керосина на фильтровальной бумаге. Подготовленный таким образом натрий опускают в этанол.

Наблюдают за выделением газа и накапливают его в пробирке, закрыв отверстие большим пальцем. Затем палец убирают и подносят к отверстию пробирки зажженную спичку. Водород сгорает с характерным звуком.

Когда натрий полностью растворится, к концентрированному раствору алкоголята добавляют 3...4 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 1 каплю раствора фенолфталеина, чтобы подтвердить щелочную реакцию среды в пробирке.

При работе с металлическим натрием в целях безопасности необходимо следить, чтобы на столе не оказалось даже самых незначительных количеств воды, и не было открытых вблизи брызгающих водопроводных кранов.

### **3.2. Образование металлических производных многоатомных спиртов**

**Краткая теория к работе.** Спирты с двумя гидроксильными группами называются двухатомными, с тремя — трехатомными, вообще многоатомными. Гидроксильные группы в многоатомных спиртах расположены на разных атомах углерода, потому что структуры с двумя гидроксильными группами на одном атоме углерода нестабильны и разлагаются с выделением молекулы воды.

Двухатомные спирты называют гликолями, трехатомные — глицеринами, четырехатомные — эритритами, пятиатомные — пентитами, шестиатомные — гекситами.

Двух-, трех- и многоатомные спирты, так же как одноатомные, могут образовывать производные с металлами. В этих реакциях спирты тоже проявляют свойства кислот. Однако если ОН-групп в молекуле

Большая кислотность двух-, трех- и многоатомных спиртов, в отличие от одноатомных, проявляется в способности растворять даже гидроксиды тяжелых металлов.

Например, при приливании глицерина к голубому студенистому осадку гидроксида меди  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  образуется синий раствор глицерата меди:



**глицерат меди**

Эта реакция используется как *качественная* при обнаружении глицерина или веществ, молекулы которых содержат хотя бы две соседние ОН-группы в *цис*-положении.

Кислотные свойства одноатомных спиртов слабее, чем у многоатомных. Поэтому алкоголи не реагируют с основаниями. Убедиться в этом можно, добавив одноатомный спирт к осадку гидроксида меди  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ , который не растворяется после смешивания, и характерного синего окрашивания не появляется.

- штатив для пробирок, две пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>;
- 5%-ный раствор сульфата меди, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 96°-ный этанол, глицерин.

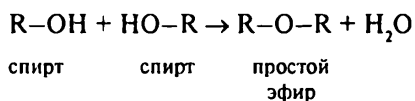
**Ход работы.** Сначала получают гидроксид меди(II). Для этого в пробирку наливают около 2 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия и около 1 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора сульфата меди. Образуется студенистый осадок гидроксида меди(II). Половину его переносят во вторую пробирку. В одну из пробирок добавляют несколько капель этанола, а в другую — глицерина. Обе пробирки встряхивают.

В пробирке с глицерином наблюдают растворение осадка и появление характерного ярко-синего окрашивания. В пробирке с этанолом гидроксид меди оседает, а жидкость над ним остается бесцветной. Это доказывает, что одноатомные спирты не реагируют с основаниями, так как их кислотные свойства значительно слабее, чем у многоатомных спиртов.

### 3.3. Образование простого эфира

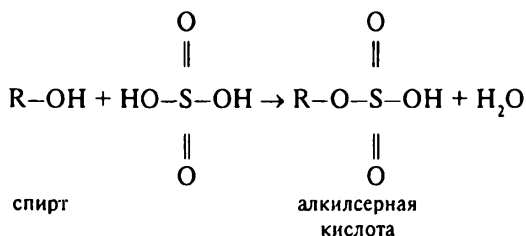
**Краткая теория к работе.** Спирты могут подвергаться дегидратации. Причем в зависимости от условий происходит внутримолекулярное или межмолекулярное отщепление воды. Для связывания воды используют различные водоотнимающие средства. Ими могут быть кислоты (серная, фосфорная, шавелевая, бензолсульфокислота и др.), оксиды (алюминия, тория и др.), некоторые соли (сульфаты алюминия, меди, хлорид цинка и др.).

При межмолекулярной дегидратации получают простые эфиры:

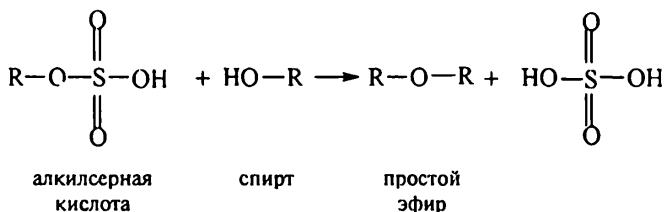


В действительности реакция протекает в две стадии.

На первом этапе при комнатной температуре образуется алкилсерная кислота (если в качестве водоотнимающего средства применять серную кислоту):

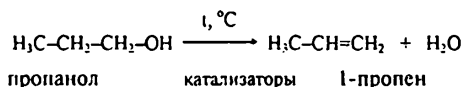


На втором этапе алкилсерная кислота при нагревании до 130...140 °С с избытком спирта разлагается с выделением простого эфира и серной кислоты:

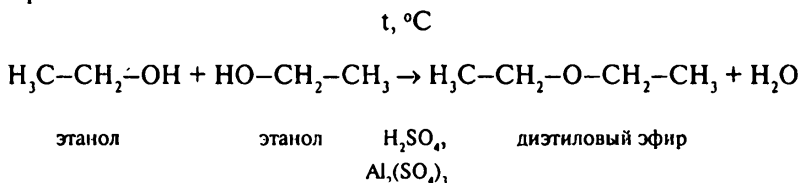


Серная кислота оказывает в известной степени каталитическое действие (1 мас. часть  $\text{H}_2\text{SO}_4$  расходуется на образование 200 мас. частей эфира) [19]. По мере выделения воды дегидратирующее действие серной кислоты снижается.

Если спирты нагревать с теми же катализаторами при температуре выше 160 °С, то происходит внутримолекулярная дегидратация. При этом образуются непредельные углеводороды:



**Сущность метода.** Метод основан на способности спиртов подвергаться межмолекулярной дегидратации. Реакция протекает при нагревании в присутствии водоотнимающих средств. В результате получают простые эфиры. Например, диэтиловый эфир можно получить нагреванием этанола:



В качестве водоотнимающего средства чаще всего используют концентрированную серную кислоту или безводный сульфат алюминия.

В лаборатории простые эфиры чаще всего используют как растворители. В живой природе простые эфирные группы встречаются во многих соединениях, таких как углеводы, алкалоиды, гормоны и др.

### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирка вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, спиртовка;
- этилсерная кислота (смесь этанола и концентрированной серной кислоты в соотношении 1:1), 96°-ный этанол.

**Ход работы.** В пробирку осторожно наливают 1 см<sup>3</sup> этилсерной кислоты и 0,5 см<sup>3</sup> этанола. Закрепляют пробирку в держателе и нагревают на пламени спиртовки до кипения смеси. В результате образуется диэтиловый эфир. Он обладает специфическим запахом, который называют больничным, так как диэтиловый эфир применяется в медицине для наркоза и как составная часть некоторых лекарств.

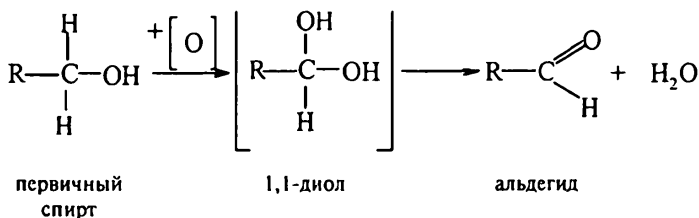
Пары эфира чрезвычайно легко воспламеняются, а с воздухом образуют взрывоопасные смеси. Поэтому обращаться с ними нужно крайне осторожно.

### 3.4. Окисление спиртов

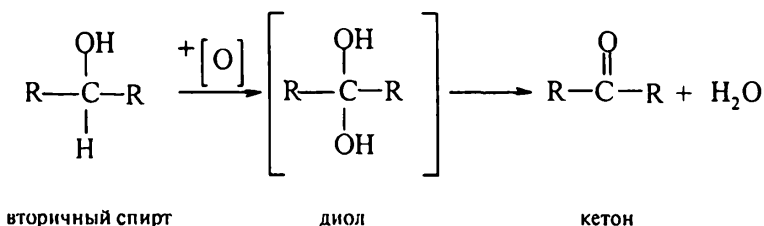
**Краткая теория к работе.** Спирты окисляются легче, чем соответствующие им предельные углеводороды. Это объясняется влиянием имеющихся в молекулах спиртов гидроксильных групп. Молекулы спиртов содержат углеродные атомы, как бы уже подвергшиеся окислению, то есть связанные с кислородом гидроксила. Дальнейшее действие окислителя, прежде всего, направляется на углерод, содержащий OH-группу.

Окислению наиболее легко подвергаются первичные и вторичные спирты, в которых при частично окисленном углеродном атоме имеется водород. При этом образуются неустойчивые промежуточные соединения — диолы, из которых быстро выделяется молекула воды.

В результате первичные спирты всегда окисляются до альдегидов без изменения углеродного скелета:



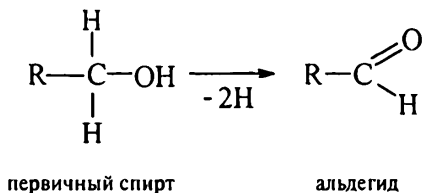
Вторичные спирты окисляются до кетонов с тем же углеродным скелетом:



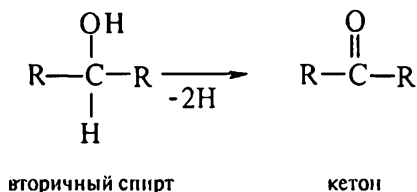
Такое окисление протекает в присутствии кислорода и называется *аэробным*.

В животных и растительных организмах окисление часто протекает в бескислородных условиях путем *дегидрирования*. Несмотря на различный ход реакций, конечные продукты окисления те же.

Первичные спирты окисляются до альдегидов. Слово «альдегид» буквально означает «спирт, лишенный водорода» (от лат. *alcohol dehydrogenatus*), то есть окисленный спирт.



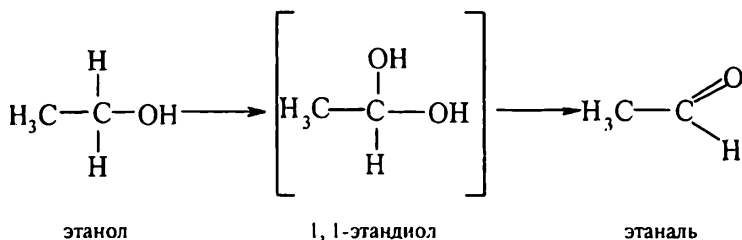
Вторичные спирты окисляются до кетонов:



Такое окисление называется *анаэробным*.

**Сущность метода.** Этанол, являясь первичным спиртом, окисляется до этанала, обладающего характерным запахом лежалых яблок:





В лабораторных условиях источником кислорода служит перманганат калия ( $\text{KMnO}_4$ ) или смесь дихромата калия и серной кислоты, так называемая хромовая смесь ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + \text{H}_2\text{SO}_4$ ). Внешне реакция проявляется в том, что в случае перманганата калия исчезает его фиолетовая окраска, а в случае хромовой смеси ее оранжевый цвет переходит в зеленый.

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, спиртовка;
- 5%-ный раствор дихромата калия, 5%-ный раствор серной кислоты, 96%-ный этанол.

**Ход работы.** В пробирку наливают 2 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора дихромата калия, 1 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора серной кислоты и 0,5 см<sup>3</sup> 96%-ного этанола. Пробирку закрепляют в держателе, встряхивают и осторожно нагревают содержимое в пламени спиртовки. Нагревание заканчивают, когда оранжевая окраска переходит в зеленую и появляется запах лежалых яблок, который характерен для уксусного альдегида.

#### Вопросы для самоконтроля

1. Спирты — представители окиссоединений. Распространенность спиртов в природе и их использование.
2. Физические свойства спиртов, фенолов, тиолов, простых эфиров.
3. Способы классификации спиртов.
4. Предельные, непредельные, ароматические спирты и фенолы. Примеры наиболее важных представителей этих классов спиртов.
5. Одноатомные, двухатомные, трехатомные и многоатомные спирты. Примеры наиболее важных представителей этих классов спиртов.

6. Первичные, вторичные и третичные спирты. Примеры наиболее важных представителей этих классов спиртов.
7. Особенности строения ОН-группы.
8. Образование производных спиртов с металлами на примере алколей, гликолей, глицеринов, фенолов.
9. Окисление первичных, вторичных спиртов, фенолов. Аэробное и анаэробное окисление.
10. Образование простых эфиров на примере одно- и многоатомных спиртов. Внутри- и межмолекулярная дегидратация.
11. Образование сложных эфиров на примере одно- и многоатомных спиртов.

## ТЕМА 4. ОКСОСОЕДИНЕНИЯ

### Цель занятия:

- освоить материал учебника и лекций по теме «Оксосоединения»;
- изучить строение карбонильной группы, ее физические характеристики и устойчивость;
- уметь писать уравнения реакций, происходящих с альдегидами и кетонами, учитывая различное расположение карбонильной группы в их молекулах;
- знать индивидуальные особенности важнейших представителей альдегидов и кетонов.

### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- провести качественные реакции на альдегиды и кетоны, осуществить синтез ацетона;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 4.1. Реакция серебряного зеркала

**Краткая теория к работе.** Альдегиды занимают исключительное место среди карбонильных соединений, потому что они легко окисляются слабыми окислителями и даже кислородом воздуха. При этом образуются карбоновые кислоты с таким же углеродным скелетом, как и у исходного альдегида.

В 1881 г. Толленсом разработана качественная реакция на альдегиды. В качестве реактива берут бесцветный раствор оксида серебра в водном аммиаке (реактив Толленса), содержащий комплексное соединение  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ . При нагревании реактива Толленса с альдегидом, а иногда и на холоду выпадает металлическое серебро, образующее на поверхности стеклянного сосуда зеркальный слой. Поэтому реакцию называют «серебряное зеркало».

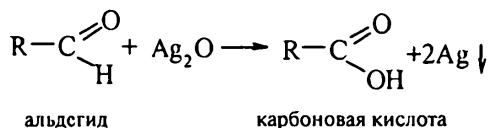
Реактив Толленса получают, добавляя по каплям гидроксид аммония ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) к 4...5 см<sup>3</sup> раствора нитрата серебра ( $\text{AgNO}_3$ ) до растворения первоначально образующегося осадка. Избыток гидроксильных ионов, получающийся при приготовлении реактива Толленса, ускоряет окисление альдегидов, а значительный избыток аммиака снижает чувствительность реакции.

Готовить аммиачный раствор оксида серебра следует в небольших количествах по мере необходимости, так как при длительном хранении из него может выделяться черный осадок нитрида серебра ( $\text{Ag}_3\text{N}$ ), разлагающийся при встряхивании даже во влажном состоянии с сильным взрывом.

**Сущность метода.** Метод основан на способности альдегидов легко окисляться до соответствующих карбоновых кислот и восстанавливать при этом металлическое серебро из оксида.

Реакция служит простым визуальным тестом и является качественной для альдегидов.

Источником кислорода в данной реакции служит оксид серебра ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) в аммиачном растворе:



Чтобы получить осадок серебра в виде зеркального слоя, перед опытом следует тщательно вымыть пробирку горячим раствором щелочи и затем ополоснуть ее дистиллированной водой.

После проведения опыта осадки и налеты на стенках пробирки необходимо растворить разбавленной азотной кислотой.

#### **Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, водяная баня;
- раствор альдегида, свежеприготовленный аммиачный раствор оксида серебра.

**Ход работы.** В пробирку наливают около 1 см<sup>3</sup> раствора исследуемого альдегида и добавляют около 1 см<sup>3</sup> свежеприготовленного аммиачного раствора оксида серебра. Закрепляют пробирку в держателе и, встряхнув ее, помещают в водяную баню при 50...60 °С.

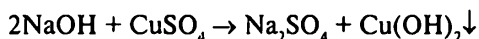
Через несколько минут серебро, выделяющееся после окисления альдегида, оседает зеркальным слоем на стенках пробирки.

## 4.2. Окисление альдегидов соединениями двухвалентной меди

Краткая теория к работе. Альдегиды легко окисляются до соответствующих карбоновых кислот, то есть являются сильными восстановителями. В препаративных целях для обнаружения альдегидов используют реактивы *Троммера* и *Фелинга*, содержащие гидроксид двухвалентной меди ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ).

При нагревании в щелочном растворе соединения двухвалентной меди восстанавливаются альдегидами до соединений одновалентной меди, окрашенных в оранжево-красный цвет.

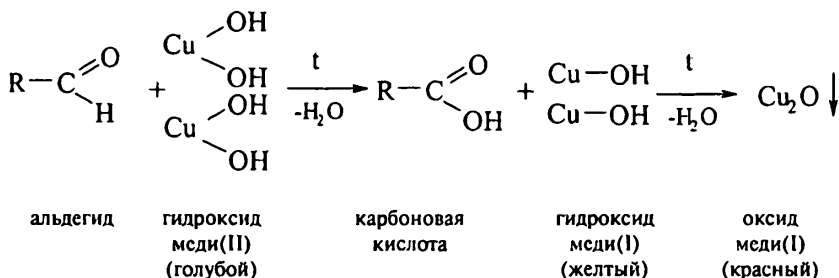
В пробе Троммера гидроксид двухвалентной меди получают, добавляя к исследуемому раствору альдегида равный объем щелочи и по каплям сульфат меди ( $\text{CuSO}_4$ ):



При этом есть вероятность получения избытка гидроксида меди, который не будет участвовать в реакции с альдегидом. Излишек гидроксида меди при нагревании теряет воду и переходит в черный оксид меди ( $\text{CuO}$ ), который затемняет основную реакцию. Появление черного оксида меди ( $\text{CuO}$ ) является недостатком пробы Троммера.

Отличие и преимущество реакции Фелинга заключается в том, что он предложил использовать калий-натриевую соль винной кислоты ( $\text{K,Na}$ -тарtrat, сегнетова соль) для связывания избытка гидроксида двухвалентной меди.

**Сущность метода.** Эта качественная реакция основана на способности альдегидов легко окисляться до карбоновых кислот и восстанавливать соединения двухвалентной меди до одновалентной и далее до металлической меди по схеме:



Все указанные в схеме соединения меди очень мало растворимы в растворах щелочей и выделяются в виде осадков, имеющих характерную окраску: гидроксид меди(II) — голубого цвета, гидроксид меди(I) — желтого цвета, а оксид меди(I) — красного. Металлическая медь выделяется в виде коричневатого-красного порошка [14]. Таким образом, ход реакции легко проследить по изменению цвета осадка.

Описанный метод используется также для *количественного* определения альдегидов.

#### Оборудование и реактивы:

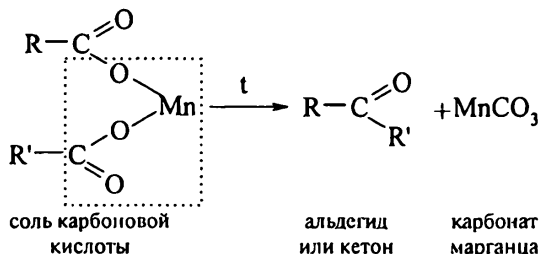
- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, спиртовка;
- раствор альдегида, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 5%-ный раствор сульфата меди.

**Ход работы.** В пробирку наливают около 1 см<sup>3</sup> раствора исследуемого альдегида. К альдегиду добавляют 0,5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия и 3...4 капли 5% раствора сульфата меди. Пробирку закрепляют в держателе, содержимое встряхивают и осторожно нагревают в пламени спиртовки до начала кипения, наблюдая за изменением цвета.

### 4.3. Получение ацетона пиролизом соли карбоновой кислоты

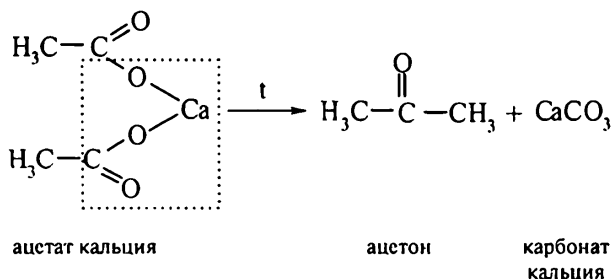
**Краткая теория к работе.** Пиролиз — это превращения органических соединений под воздействием высокой температуры. При пиролизе происходят различные превращения: разрыв углерод-углеродных связей, отщепление функциональных групп, изомеризация и другие процессы. Результаты пиролиза зависят от типа соединения, его молекулярной массы и условий процесса.

Например, при термическом разложении солей карбоновых кислот с двухвалентными металлами (Ba, Ca, Mn) образуются альдегиды и кетоны. Это один из способов получения оксосоединений:



В зависимости от строения соли можно получить симметричные (если  $R = R'$ ) или несимметричные (если  $R \neq R'$ ) кетоны. Альдегиды образуются, если один из радикалов — остаток муравьиной кислоты ( $R = H$ ).

**Сущность метода.** Из кетонов наибольшее значение имеет ацетон (2-пропанон, диметилкетон). По своему строению это симметричный кетон. Значит, получить его можно пиролизом соответствующей симметричной соли — ацетата кальция:



Впервые ацетон получил в 1661 г. английский ученый Роберт Бойль. Он заметил, что при нагревании продукта взаимодействия уксусной кислоты с мелом образуется легколетучая жидкость с характерным запахом. Ее так и называли — ацетон, что значит «полученный из уксусной кислоты» (от лат. *acetum* — уксус).

В животных организмах ацетон является промежуточным продуктом обмена веществ.

#### Оборудование и реактивы:

- штатив и лапки для него, штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, пробка с газоотводной трубкой, спиртовка, вода дистиллированная;
- кристаллический ацетат кальция.

**Ход работы.** В пробирку помещают 4...5 г сухого ацетата кальция и закрывают ее пробкой с газоотводной трубкой. Далее пробирку укрепляют в лапке штатива почти горизонтально, так, чтобы дно пробирки было несколько выше, чем ее отверстие, на такой высоте, чтобы пробирку можно было нагревать пламенем спиртовки. Легким постукиванием по пробирке достигают распределения соли в виде тонкого слоя.

В другую пробирку, которая будет служить приемником, наливают 2...3 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и ставят ее в стакан с холод-

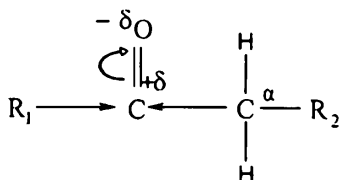
ной водой. Затем в эту пробирку погружают почти до дна газоотводную трубку.

Пробирку с ацетатом кальция нагревают на пламени спиртовки сначала осторожно, затем сильнее. При этом соль частично обугливается и чернеет, а летучие продукты разложения переходят в пробирку-приемник. Реакционную пробирку продолжают нагревать до тех пор, пока вся соль в ней не почернеет.

Жидкость в приемной пробирке имеет резкий запах и содержит ацетон, который можно обнаружить йодоформной пробой.

#### 4.4. Йодоформная реакция (проба Либена)

**Краткая теория к работе.** Карбонильная группа альдегидов и кетонв сильно поляризована и оказывает большое влияние на водородные атомы, находящиеся у соседнего с ней атома углерода ( $\alpha$ -положение):



В результате  $\alpha$ -водородные атомы приобретают повышенную реакционную способность и легко замещаются на галоген.

Если реакция протекает в щелочной среде с йодом и веществом, содержащим метильную группу при карбонильном атоме, то в результате образуется йодоформ — осадок желтого цвета.

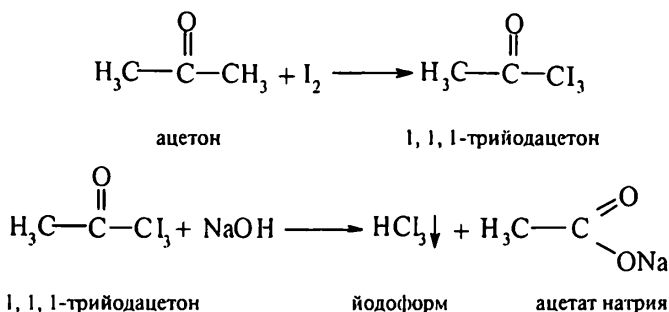
Карбонильный атом соседний с метилом есть в молекуле этанала, который образуется из этанола. Поэтому этанол тоже дает положительную пробу на йодоформ. Но для этой реакции требуется нагревание на стадии образования альдегида, а ацетон и другие метилкетоны образуют йодоформ при комнатной температуре. Вот почему йодоформная реакция является качественной для метилкетонв и ацетона.

**Сущность метода.** В основе метода лежит способность  $\alpha$ -водородных атомов метилкетонв замещаться на йод с последующим отщеплением йодоформа ( $\text{HC}\text{I}_3$ ) из 1, 1, 1-трийодпроизводного в щелочной среде. В реакции также используется плохая растворимость йодоформа в воде, в результате чего он выпадает в осадок в виде желтого



твердого вещества. Это является визуальным тестом на ацетон и метилкетоны, а реакция называется *йодоформной* пробой.

Типичный представитель метилкетонов — ацетон (диметилкетон). Схематично реакцию можно представить в виде двух этапов:



Йодоформная проба достаточно чувствительна и позволяет обнаружить ацетон при содержании 0,04%.

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирка вместимостью 10 см<sup>3</sup>;
- раствор альдегида, раствора йода, 5%-ный раствор гидроксида натрия.

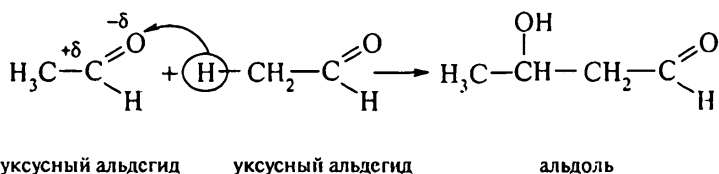
**Ход работы.** В пробирку помещают 1...2 см<sup>3</sup> ацетона, полученного в предыдущем опыте. Добавляют 1 см<sup>3</sup> раствора йода и несколько капель 5%-ного раствора гидроксида натрия. Одновременно с исчезновением окраски йода появляется осадок йодоформа и его характерный (больничный) запах.

### 4.5. Альдольная и кротоновая конденсация уксусного альдегида

**Краткая теория к работе.** Высокая электроотрицательность атома кислорода и наличие π-связи приводят к сильной поляризации карбонильной группы. Если у соседних с карбонильной группой α-углеродных атомов есть атомы водорода, то они становятся особенно подвижными и при подходящих условиях легко отщепляются. Образующиеся анионы являются нуклеофильными частицами и атакуют карбонильные атомы углерода. В результате возникает новая углерод-углеродная

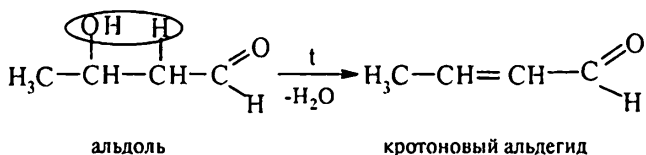
связь и образуется вещество, содержащее одновременно альдегидную и спиртовую группы. По существу это альдегидспирт или альдегидоалкоголь. Сокращенно его называют *альдолом*, а саму реакцию — *альдольной конденсацией*, поскольку реакциями конденсации обычно называют различные процессы усложнения органических молекул в результате возникновения новых связей между углеродными атомами. Фактически это реакция полимеризации, так как молекулярная масса альдоля является суммой молекулярных масс исходных молекул.

**Сущность метода.** Альдольная конденсация — это реакция на границе между карбонильной группой и  $\alpha$ -водородными атомами этих соединений. Например, две молекулы уксусного альдегида реагируют по следующей схеме:



Эта реакция изучена А. П. Бородиным (1863–1873).

Наличие в альдоле  $\beta$ -оксигруппы рядом с активным  $\alpha$ -водородным атомом создаст благоприятные условия для отщепления молекулы воды. Это обуславливает способность альдоля дегидратироваться в непредельный кротоновый альдегид при дальнейшем нагревании:



Из уксусного альдегида, таким образом, получается кротоновый альдегид, от названия которого конденсацию молекул карбонильных соединений, протекающую с выделением воды и образованием непредельных карбонильных соединений, называют *кротоновой конденсацией*.

Реакции этого типа очень важны в природе. Биосинтез многих природных соединений проходит через этап альдольной или кротоновой конденсации. Например, образование лимонной кислоты в цикле

трикарбоновых кислот или синтез высших жирных кислот в малоновом цикле.

**Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки, держатель для пробирок, спиртовка;
- раствор этанала, 5%-ный раствор гидроксида натрия.

**Ход работы.** В пробирку наливают 3 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора гидроксида натрия и добавляют 5...6 капель уксусного альдегида. Закрепляют пробирку в держателе, содержимое встряхивают и осторожно нагревают на пламени спиртовки.

Сначала появляется приятный запах альдоля. При дальнейшем нагревании образуется кротоновый альдегид, обладающий резким и неприятным запахом (нюхать осторожно).

При достаточно длительном нагревании жидкость становится бурой, образуется смола.

**Вопросы для самоконтроля**

1. Альдегиды и кетоны — представители оксосоединений. Распространенность в природе и использование альдегидов и кетонов.
2. Физические свойства альдегидов и кетонов.
3. Особенности строения карбонильной группы альдегидов и кетонов.
4. Особенности  $\alpha$ -водородных атомов альдегидов и кетонов.
5. Формулы и названия (тривиальные и систематические) наиболее важных альдегидов и кетонов.
6. Окислительно-восстановительные реакции альдегидов и кетонов.
7. Реакция «серебряного зеркала» и восстановления меди на примерах низших альдегидов.
8. Реакции присоединения полярных реагентов (HON, HCN, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) к низшим альдегидам и кетонам.
9. Альдольная конденсация альдегидов и кетонов.
10. Реакции радикала альдегидов и кетонов (галогенирование).
11. Качественная реакция на метилкетоны (йодоформная).

## ТЕМА 5. КАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ

### Цель занятия:

- освоить материал учебника и лекций по теме «Карбоновые кислоты»;
- разобраться в классификации и номенклатуре карбоновых кислот; запомнить формулы и названия основных представителей этого класса;
- изучить особенности строения карбоксильной группы и уметь писать уравнения реакций, характерных для карбоновых кислот.

### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- провести эксперименты, подтверждающие общие свойства и индивидуальные особенности некоторых карбоновых кислот;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 5.1. Окисление муравьиной кислоты

**Краткая теория к работе.** Муравьиная кислота (метановая) — самая простая и при этом сильная карбоновая кислота, она в десять раз сильнее уксусной. При попадании на кожу муравьиная кислота не просто жжет, а буквально растворяет ее, оставляя трудно заживающие раны.

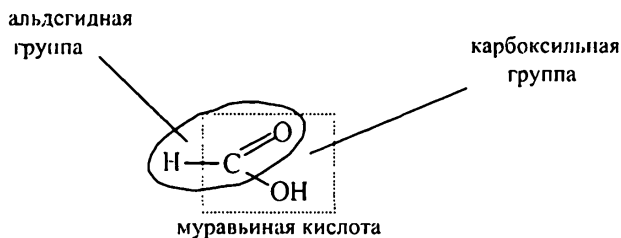
Впервые муравьиную кислоту получил в 1670 г. английский естествоиспытатель Джон Рэй. Он нагревал муравьев в перегонной колбе. После конденсации пара Рэй получил водный раствор нового химического соединения. Оно проявляло типичные свойства кислот и было названо муравьиной кислотой [32]. Соли и эфиры этой кислоты называют формиаты, что также связано с муравьями (лат. *formica* — муравей).

В свободном виде муравьиная кислота содержится в соке крапивы, хвое, фруктах, а также в поте и моче.

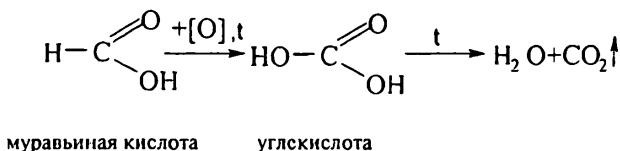
Важное отличие муравьиной кислоты от других карбоновых кислот в том, что в ее молекуле карбонил (C=O) связан с водородом, то есть формально это альдегидная группа. Вот почему муравьиная кислота обладает одновременно свойствами и кислоты, и альдегида. Подобно формальдегиду она обладает сильной бактерицидной активностью. Ее водные растворы используют как пищевой консервант для обработки тары или в борьбе с болезнями пчел. Слабый водно-спиртовой раствор муравьиной кислоты (муравьиный спирт) применяют в медицине для растираний.

Как альдегид муравьиная кислота легко окисляется и дает реакцию «серебряного зеркала», не свойственную кислотам. Только в случае муравьиной кислоты эта реакция, что тоже необычно, сопровождается выделением углекислого газа, поскольку образующаяся угольная кислота неустойчива и легко разлагается.

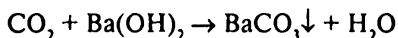
**Сущность метода.** Муравьиная кислота обладает свойствами кислоты и альдегида. Это объясняется ее строением. В молекуле муравьиной кислоты, с одной «стороны», можно увидеть кислотную (карбоксильную) группу, а с другой — тот же атом углерода, входящий в состав альдегидной группы:



Подобно альдегидам муравьиная кислота легко окисляется. Но окисление муравьиной кислоты сопровождается выделением углекислого газа, что не свойственно альдегидам, поскольку образующаяся угольная кислота неустойчива и распадается:



Присутствие углекислого газа можно обнаружить по помутнению гидроксида бария за счет образования карбоната бария:



В данной работе источником кислорода служит перманганат калия ( $\text{KMnO}_4$ ), фиолетовая окраска которого исчезает в ходе реакции.

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, пробка с газоотводной трубкой, спиртовка;
- муравьиная кислота, 20%-ный раствор серной кислоты, 5%-ный раствор перманганата калия, насыщенный раствор гидроксида бария.

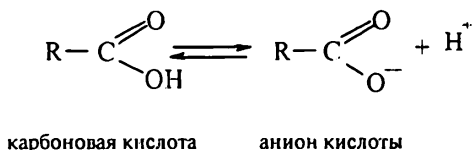
**Ход работы.** Сначала готовят пробирку-приемник, в которую наливают 1...2 см<sup>3</sup> насыщенного гидроксида бария.

В другую пробирку наливают около 1 см<sup>3</sup> муравьиной кислоты, 1 см<sup>3</sup> 20%-ного раствора серной кислоты и 1...2 см<sup>3</sup> раствора перманганата калия. Пробирку закрывают пробкой с газоотводной трубкой и укрепляют в зажиме для пробирок. Конец газоотводной трубки погружают в пробирку-приемник почти до дна, и нагревают реакционную смесь над пламенем спиртовки до начала кипения.

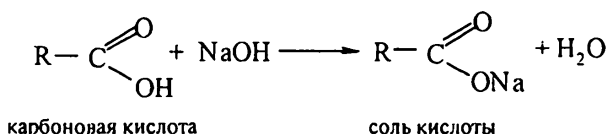
Наблюдают, как окрашенная перманганатом калия жидкость быстро обесцвечивается, а в приемной пробирке раствор мутнеет из-за образования малорастворимого карбоната бария.

## 5.2. Образование кислой и средней солей винной кислоты

**Краткая теория к работе.** Карбоновые кислоты подобно неорганическим кислотам в водных растворах диссоциируют на анионы кислот и катионы водорода:



Вот почему растворы карбоновых кислот окрашивают лакмус в красный цвет, проводят электрический ток, имеют кислый вкус, то есть являются электролитами и проявляют кислотные свойства. Как типичные кислоты они нейтрализуют щелочи. При этом образуются соли:



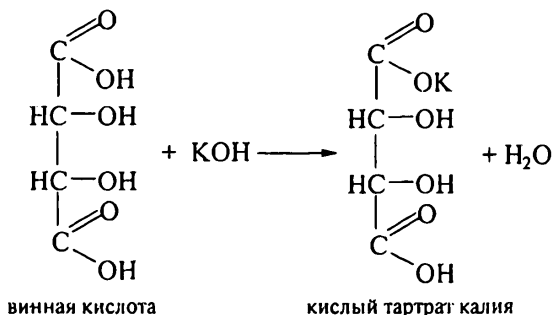
Химические свойства дикарбоновых кислот во многом схожи со свойствами монокрбоновых кислот. Они образуют соли, сложные эфиры, амиды и т. д. Однако, имея две карбоксильные группы, дикарбоновые кислоты дают два ряда производных: кислые и средние, которые отличаются не только составом, но и физико-химическими свойствами.

Например, у дикарбоновой винной кислоты многие соли хорошо растворимы в воде, а кислая калиевая соль малорастворима. Эта соль известна как винный камень. Так называется твердый осадок, который образуется при изготовлении виноградного вина в бочках. Именно из винного камня, действуя на него серной кислотой, впервые выделил винную кислоту в 1769 г. К. Шееле. Сама винная кислота содержится во многих растениях: свекле, малине, крыжовнике. Особенно много ее в винограде и виноградном соке.

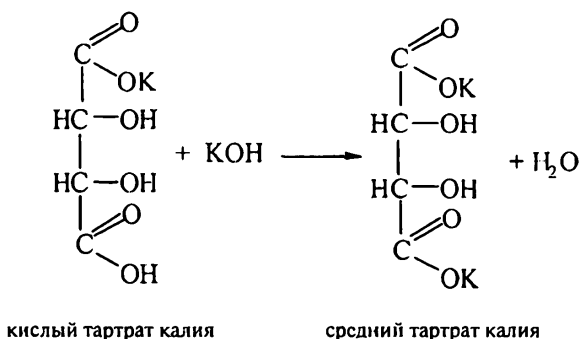
**Сущность метода.** Соли карбоновых кислот образуются в результате замещения атома водорода карбоксильной группы на катион металла.

Винная кислота относится к дикарбоновым кислотам, так как содержит в своей молекуле две карбоксильные группы и может образовывать две соли: кислую и среднюю. В кислой соли лишь один атом водорода карбоксильной группы замещен на катион металла, в средней соли — оба.

Соли винной кислоты называют тартратами. Многие из них хорошо растворимы в воде, но кислая калиевая соль винной кислоты малорастворима. Ее белый мелкокристаллический осадок можно увидеть, приливая по каплям раствор гидроксида калия к раствору винной кислоты:



Средний тартрат калия хорошо растворим в воде, поэтому осадок кислой соли исчезает в избытке щелочи:



#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирка вместимостью 10 см<sup>3</sup>, бюретка вместимостью 10 см<sup>3</sup> и ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>.
- 5%-ный раствор винной кислоты, 5%-ный раствор гидроксида калия, 1%-ный раствор фенолфталеина.

**Ход работы.** В пробирку наливают около 1 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора винной кислоты и добавляют одну каплю фенолфталеина. Далее в пробирку приливают из бюретки по каплям при постоянном взбалтывании 5%-ный раствор гидроксида калия.

Наблюдают, как появляется мелкокристаллический осадок кислой соли винной кислоты. Затем гидроксид калия приливают из бюретки в избытке, до растворения осадка. При этом образуется средняя соль винной кислоты, а щелочную реакцию подтверждает малиновое окрашивание.

### 5.3. Разложение дикарбоновых кислот при нагревании

**Краткая теория к работе.** Химические свойства дикарбоновых кислот определяются присутствием в молекуле двух карбоксильных групп. В целом карбоксильные группы, влияя друг на друга, усиливают кислотные свойства дикарбоновых кислот.

При нагревании дикарбоновых кислот могут протекать разные процессы. Это зависит от строения кислоты.

Если карбоксильные группы расположены рядом или через один углеродный атом в молекуле дикарбоновой кислоты, то ее нагревание

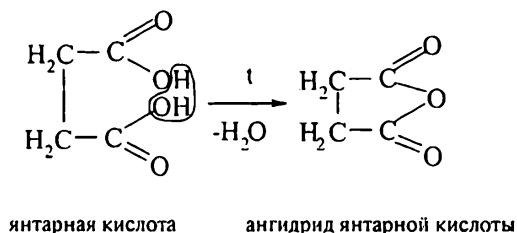


сопровождается реакцией декарбоксилирования. При этом из одной карбоксильной группы выделяется углекислый газ, а кислота превращается в монокарбоновую.

Дикарбоновые кислоты, карбоксильные группы в которых расположены через два и более углеродных атома, при нагревании отщепляют воду и превращаются во внутренние циклические ангидриды.

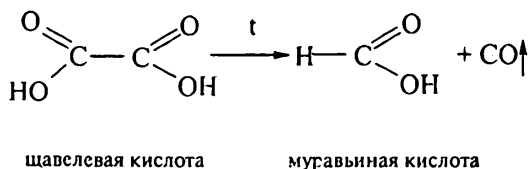
Такая разница в поведении дикарбоновых кислот при нагревании объясняется теорией строения А. Байера. С точки зрения этой теории взаимодействие групп внутри одной молекулы протекает легко, если для сближения этих групп не требуется значительного напряжения, связанного с изменением валентных углов углеродных атомов, образующих цепь [20].

В янтарной кислоте с карбоксилами в положении 1,4 цепь углеродных атомов может изогнуться так, что гидроксилы карбоксильных групп легко сближаются и возможно их взаимодействие:

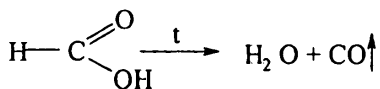


В молекуле же малоновой, а тем более щавелевой, кислоты сближение гидроксильных карбоксильных групп затруднено, так как требует значительного уменьшения валентных углов и напряжения всей системы. Поэтому циклические ангидриды этих кислот не образуются.

**Сущность метода.** При нагревании щавелевой кислоты выше температуры ее плавления (189 °С) одна из карбоксильных групп разрушается с выделением углекислого газа. Это реакция декарбоксилирования:

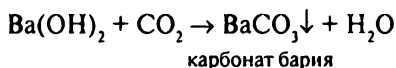


Образующаяся муравьиная кислота в условиях опыта разлагается на оксид углерода(II) и воду:

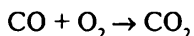


муравьиная кислота

Углекислый газ обнаруживают, пропуская его через насыщенный раствор гидроксида бария, который мутнеет по мере образования карбоната бария:



Оксид углерода(II) сгорает с характерным голубым пламенем:



**Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, пробка с газоотводной трубкой, спиртовка;
- кристаллическая щавелевая кислота, насыщенный раствор гидроксида бария.

**Ход работы.** В сухую пробирку помещают 1...2 г кристаллической щавелевой кислоты. В другую пробирку наливают 3...4 см<sup>3</sup> насыщенного раствора гидроксида бария. Пробирку со щавелевой кислотой закрепляют в держателе и закрывают пробкой с газоотводной трубкой. Конец газоотводной трубки погружают до дна пробирки с гидроксидом бария.

Пробирку со щавелевой кислотой нагревают в пламени спиртовки и наблюдают за помутнением гидроксида бария. Затем, не прекращая нагревания, убирают пробирку-приемник и поджигают газ, выделяющийся из отверстия газоотводной трубки.

#### 5.4. Разложение лимонной кислоты концентрированной серной кислотой

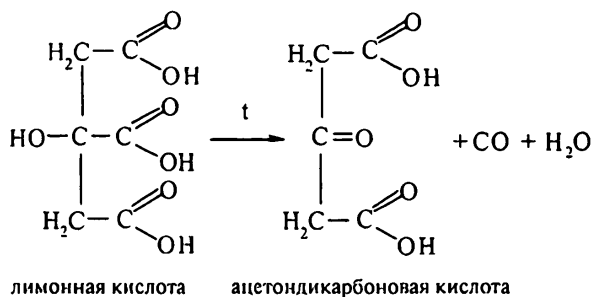
**Краткая теория к работе.** Лимонная кислота в большом количестве содержится в плодах цитрусовых: в мякоти апельсина ее около 2%, в грейпфруте — до 3%, а в лимоне — 6%. Поэтому неудивительно, что впервые она была выделена Шееле в 1784 году именно из лимонов. Эта

кислота вырабатывается микроорганизмами *Aspergillus niger* на растворе сахарозы (патоки). Она используется в пищевой промышленности при производстве фруктовых сиропов и различных напитков. Соли лимонной кислоты применяются в гематологии как антикоагулянты.

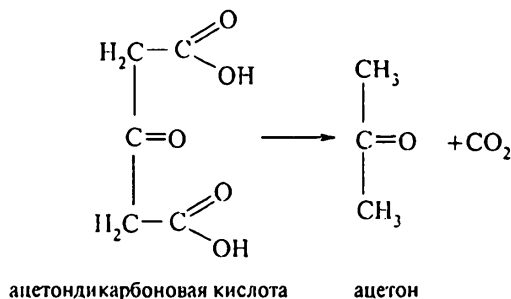
В живых организмах лимонная кислота является промежуточным продуктом обмена веществ. Она входит в завершающий этап распада энергетических материалов в клетке и дает одно из названий этому процессу — цикл лимонной кислоты.

**Сущность метода.** Лимонная кислота принадлежит к классу трикарбоновых кислот, а также содержит в молекуле спиртовый гидроксил, то есть одновременно является спиртокислотой.

Подтверждает структурную формулу лимонной кислоты ее распад в присутствии концентрированной серной кислоты. Первоначально образуется ацетондикарбоновая кислота:

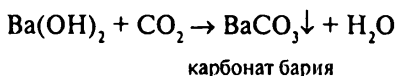


Ацетондикарбоновая кислота далее декарбоксилируется, образуя ацетон и углекислый газ:



Образование продуктов распада легко подтверждается соответствующими качественными реакциями.

Тестом на углекислый газ служит реакция с гидроксидом бария:



Ацетон определяется с помощью йодоформной пробы:



#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, три пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, пробка с газоотводной трубкой, спиртовка;
- кристаллическая лимонная кислота, концентрированная серная кислота, насыщенный раствор гидроксида бария, раствор йода, 5%-ный раствор гидроксида натрия.

**Ход работы.** В сухую пробирку помещают 1 г кристаллической лимонной кислоты и приливают 2 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты. Пробирку закрывают пробкой с газоотводной трубкой.

Готовят еще две пробирки. В одну из них наливают 2...3 см<sup>3</sup> прозрачного раствора гидроксида бария. В другую пробирку наливают около 1 см<sup>3</sup> раствора йода и добавляют несколько капель 5%-ного раствора гидроксида натрия до исчезновения окраски йода.

Реакционную пробирку со смесью лимонной и серной кислот закрепляют в держателе для пробирок и осторожно нагревают над пламенем спиртовки. Смесью начинает пениться. К концу газоотводной трубки подносят горящую спичку. Наблюдают, как выделяющийся оксид углерода(II) загорается характерным для него голубым пламенем.

Не прекращая нагревание реакционной смеси, погружают газоотводную трубку в пробирку с гидроксидом бария, где раствор мутнеет из-за образования малорастворимого карбоната бария.

Затем газоотводную трубку погружают в раствор, приготовленный во второй пробирке. Появление осадка желтого цвета и характерного (больничного) запаха свидетельствуют об образовании йодоформа.

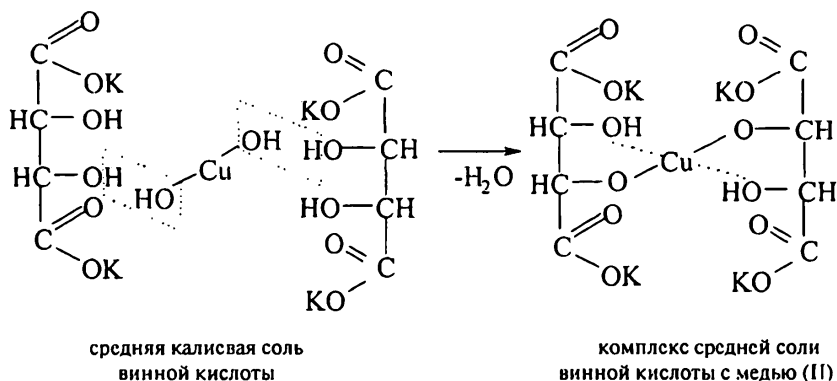
## 5.5. Образование комплекса средней соли винной кислоты с медью

**Краткая теория к работе.** Винная кислота — это бифункциональное соединение. В ее молекуле содержатся и кислые карбоксильные группы, и спиртовые гидроксилы. По числу карбоксильных групп это дикарбоновая (двухосновная) кислота. По числу гидроксильных групп, включая и те, что входят в состав карбоксильных групп, винная кислота является четырехатомной.

Карбоксильные группы винной кислоты могут вступать во все реакции, характерные для карбоновых кислот: образование солей, сложных эфиров, амидов и т. д.

Гидроксильные группы радикала проявляют свойства спиртов: образуют простые и сложные эфиры, производные с металлами и т. д.

**Сущность метода.** Молекула винной кислоты содержит в радикале два соседних гидроксильных атома с относительно подвижными атомами водорода и проявляет свойства многоатомных спиртов. Подтвердить это можно образованием комплексов с двухвалентной медью, которые интенсивно окрашены в характерный синий цвет:



Подобные комплексы хелатной структуры образуются у двух-, трех- и многоатомных спиртов (см. опыт 3.2), а реакция является качественной для соединений с двумя соседними гидроксильными атомами в цис-положении.

Для опыта важно использовать не саму винную кислоту, а ее среднюю соль, у которой обе карбоксильные группы блокированы катионами металла. Иначе в реакцию вступают не спиртовые гидроксилы, а карбоксильные группы, как более активные.

### **Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирка вместимостью 10 см<sup>3</sup>;
- 5%-ный раствор сульфата меди, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 5%-ный раствор виннокислого натрия.

**Ход работы.** Сначала получают гидроксид меди(II). Для этого в пробирку наливают около 1 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия и около 0,5 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора сульфата меди. Образуется студенистый осадок гидроксида меди(II), к которому приливают 5%-ный раствор виннокислого натрия. При этом голубой гидроксид меди растворяется и образуется темно-синяя прозрачная жидкость.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Распространенность карбоновых кислот в природе и их использование.
2. Физические свойства карбоновых кислот.
3. Особенности строения карбоксильной группы. Сила кислот.
4. Способы классификации карбоновых кислот.
5. Общие свойства карбоновых кислот: диссоциация, образование солей, сложных эфиров, галогенангидридов, ангидридов, амидов, галогенкислот, декарбоксилирование.
6. Монокарбоновые предельные кислоты. Примеры низших и высших кислот. Образование трихлоруксусной кислоты. Окисление муравьиной кислоты. Образование солей пальмитиновой и стеариновой кислот.
7. Монокарбоновые непредельные и ароматические кислоты. Отдельные представители. Гидрирование акриловой кислоты. Гидрирование высших жирных кислот. Образование амида бензойной кислоты.
8. Дикарбоновые предельные кислоты. Отдельные представители. Ступенчатая диссоциация. Образование кислой и средней солей малоновой кислоты. Разложение дикарбоновых кислот при нагревании. Образование внутренних ангидридов.
9. Дикарбоновые непредельные и ароматические кислоты. Отдельные представители. Гидрирование фумаровой кислоты. Образование внутренних ангидридов.
10. Оксикислоты. Примеры предельных (моно-, ди-, трикарбоновых) оксикислот. Примеры ароматических оксикислот. Окисление молочной кислоты. Образование ацетилсалициловой кислоты. Образование комплексов винной кислоты с медью.
11. Оксокислоты. Примеры моно-, ди-, трикарбоновых оксокислот. Восстановление пировиноградной кислоты.

## ТЕМА 6. ЛИПИДЫ

### Цель занятия:

- разобраться в классификации липидов; знать состав простых и сложных липидов, научиться писать их формулы;
- уметь писать уравнения кислотного и щелочного гидролиза простых и сложных липидов;
- разобраться в основных физико-химических характеристиках жиров.

### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- проверить растворимость жиров в различных растворителях, провести эксперименты по омылению разных жиров и выделению жирных кислот из полученного мыла;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 6.1. Растворимость жиров

**Краткая теория к работе.** Липидами называют многочисленную группу веществ, построенных по принципу сложных эфиров и осуществляющих разнообразные функции в организме животных. Липиды являются источником энергии, выполняют защитную роль, служат предшественниками многих биологически важных соединений. Особенно важна роль липидов в качестве структурных компонентов клеточных мембран, которые почти наполовину состоят из липидов.

Состав и химическое строение липидов отличаются большим разнообразием и не являются классификационными признаками. Их молекулы построены из остатков спиртов, высокомолекулярных кислот, фосфорной кислоты, углеводов, азотистых оснований и других компонентов, соединенных между собой различными связями. К липидам

относят совершенно различные по строению вещества: триглицериды, фосфолипиды, гликолипиды, воски, терпены, стероиды.

Часто липиды подразделяют на две группы: омыляемые и неомыляемые. Омыляемые липиды, в свою очередь, подразделяют на простые и сложные. Простые липиды — это собственно жиры и масла.

Несмотря на трудности структурной классификации липидов, они обладают общим физико-химическим признаком — растворимостью в органических растворителях и нерастворимостью в воде. Это свойство липидов используется в различных технологиях (пищевых, фармацевтических, лакокрасочных) и лабораторных методах исследования.

**Сущность метода.** Жиры являются неполярными соединениями, поскольку содержат в своем составе только неполярные гидрофобные группировки. Следуя общему эмпирическому правилу: «подобное растворяет подобное», жиры растворимы в неполярных жидкостях — бензоле, толуоле, эфире и др.

Вода — полярная жидкость, поэтому жиры в ней нерастворимы. Однако жиры могут образовывать в воде эмульсии, которые стабилизируются в присутствии таких поверхностно-активных веществ (ПАВ), как белки, мыла и некоторые сульфокислоты. Природной эмульсией жира, стабилизированной белками, является молоко. При смешивании жира с водой без добавления ПАВ жидкости быстро расслаиваются.

Для растворения жиров и масел часто используют этиловый спирт. При их смешивании образуется мутный раствор, что указывает на плохую растворимость масла в спирте. Тем не менее, этанол широко применяется в лабораторной практике, так как он более безопасен и менее токсичен, чем другие органические растворители.

#### **Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, вода дистиллированная;
- растительное масло, 96°-ный этанол, бензол, четыреххлористый углерод.

**Ход работы.** В четыре пробирки помещают по 5...6 капель растительного масла. В первую пробирку добавляют 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, во вторую — 1 см<sup>3</sup> этилового спирта, в третью — 1 см<sup>3</sup> бензола, в четвертую — 1 см<sup>3</sup> четыреххлористого углерода.

Смесь в пробирках хорошо встряхивают, отмечая наблюдаемые изменения.



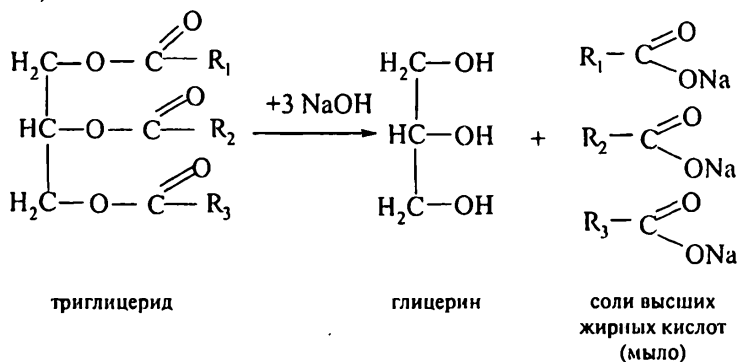
## 6.2. Омыление жиров щелочью

**Краткая теория к работе.** Жиры и масла входят в группу простых липидов. По своему строению — это сложные эфиры глицерина и высших жирных кислот. Все сложные эфиры могут подвергаться гидролизу. Гидролизом называется присоединение молекулы воды по месту разрыва связи.

Скорость гидролиза сложных эфиров значительно увеличивается в присутствии минеральных кислот. Протоны, отщепляемые кислотами, являются в этой реакции катализаторами. Еще быстрее сложные эфиры гидролизуются под влиянием щелочей. В этом случае каталитическое действие оказывают гидроксильные ионы. Кроме этого щелочи нейтрализуют выделяющиеся из эфиров кислоты и тем самым способствуют течению реакции.

**Сущность метода.** Жиры — это сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и различных жирных кислот.

Щелочной гидролиз жиров и масел называется *омылением*, так как одним из продуктов реакции является мыло (соли высших жирных кислот):



Жир нерастворим в водном растворе щелочи, поэтому омыление жира протекает медленно. При добавлении спирта растворимость жира повышается, смесь становится более однородной, и омыление резко ускоряется. Скорость гидролиза эфиров возрастает также при нагревании и в случае применения избытка воды.

Продукты щелочного гидролиза жира — глицерин и мыло — растворимы и в воде, и в спирте. Поэтому в результате образуется однородная смесь.

Для выделения мыла из смеси используют насыщенный раствор поваренной соли, в которой глицерин и спирт растворимы, а мыло — нет. При этом поваренная соль повышает плотность раствора и увеличивает выталкивающую силу, под действием которой нерастворимые частички мыла всплывают наверх в виде полутвердой массы или комочков [14]. Этот процесс называют *высаливанием*.

#### **Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, стакан химический вместимостью 100...200 см<sup>3</sup>, водяная баня, электрическая плитка, вода дистиллированная;
- растительное масло или растопленный животный жир, 96°-ный этанол, 30%-ный раствор гидроксида натрия, насыщенный раствор хлорида натрия.

**Ход работы.** Опыт проводят одновременно с несколькими различными жирами. В пробирку помещают 1 см<sup>3</sup> растительного масла или растопленного животного жира, 1 см<sup>3</sup> 96°-ного этанола и 1 см<sup>3</sup> 30%-ного раствора гидроксида натрия. Перемешивают смесь с помощью стеклянной палочки, закрепляют пробирку в держателе и помещают в горячую водяную баню. Нагревание ведут, периодически помешивая смесь, пока она не станет однородной, то есть исчезнут границы между слоями жидкости.

К полученной густой жидкости добавляют при помешивании насыщенный раствор хлорида натрия, заполняя пробирку до самого отверстия, и снова помещают ее в горячую водяную баню. Через несколько минут на поверхность всплывает слой мыла. Тогда пробирку достают из бани и помещают на 5...10 минут в стакан с холодной водой для затвердевания мыла.

Полученное мыло извлекают из пробирки палочкой или шпателем и используют для выделения жирных кислот.

### **6.3. Выделение жирных кислот из мыла**

**Краткая теория к работе.** Жиры и масла являются производными глицерина и жирных кислот. На долю глицерина в массе триглицеридов приходится лишь около 10%. А все разнообразие жиров и масел обусловлено набором входящих в их состав жирных кислот.

Из различных тканей и клеток выделено свыше 70 разных жирных кислот. Почти все они содержат четное число атомов углерода, от 14 до 22. Практически во всех жирах присутствуют кислоты с 16 и 18 ато-

мами углерода в цепи. Наиболее распространенные карбоновые кислоты, входящие в состав природных жиров, см. в табл. 4.

**Таблица 4**

**Карбоновые кислоты**

Название кислоты		Число углеродных атомов	Условное обозначение (символ)
тривиальное	систематическое		
Насыщенные кислоты			
Лауриновая	Додекановая	12	C <sub>12:0</sub>
Миристиновая	Тетрадекановая	14	C <sub>14:0</sub>
Пальмитиновая	Гексадекановая	16	C <sub>16:0</sub>
Стеариновая	Октадекановая	18	C <sub>18:0</sub>
Ненасыщенные кислоты			
Олеиновая	9-Октадеценовая	18	C <sub>18:1</sub>
Линолевая	9,12-Октадекадиеновая	18	C <sub>18:2</sub>
Линоленовая	9,12,15-Октадекатриеновая	18	C <sub>18:3</sub>
Арахидоновая	5,8,11,14-Эйкозатетраеновая	20	C <sub>20:4</sub>

В организме животных карбоновые кислоты и их производные являются промежуточными продуктами обмена липидов, белков и углеводов.

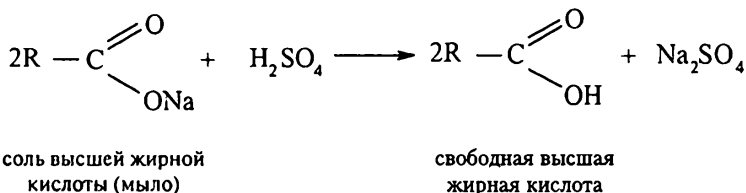
**Сущность метода.** В промышленности мыло получают из животных жиров (сало низких сортов) или растительных масел (пальмовое, кокосовое, хлопковое и др.).

Мыло, полученное из животных жиров, содержит в основном радикалы предельных кислот: пальмитиновой и стеариновой. В свободном виде эти кислоты при комнатной температуре являются твердыми веществами со слабым запахом.

Мыло, полученное из растительных масел, содержит в основном радикалы непредельных кислот: олеиновой, линолевой, линоленовой. В свободном виде эти кислоты при комнатной температуре — маслянистые жидкости без запаха.

Жирные кислоты, выделенные из молочного жира, образуют мягкую массу, которая пахнет подобно испорченному сливочному маслу. Это объясняется присутствием в молочном жире низших жирных кислот, обладающих интенсивным запахом.

Свободные жирные кислоты можно выделить из их солей, действием серной кислоты. В результате протекает простая обменная реакция:



#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, стакан химический вместимостью 100...200 см<sup>3</sup>, водяная баня, электрическая плитка, вода дистиллированная;
- мыло, 20%-ный раствор серной кислоты.

**Ход работы.** В пробирку шпателем или стеклянной палочкой помещают небольшой кусочек мыла и добавляют 3...4 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Закрепляют пробирку в держателе и нагревают на водяной бане до полного растворения мыла.

К полученному раствору мыла добавляют 2...3 см<sup>3</sup> 20%-ного раствора серной кислоты и погружают пробирку в кипящую водяную баню. Нагревание продолжают до выделения жирных кислот, которые всплывают на поверхность в виде жидкого слоя, а водный раствор осветляется.

Когда четкое разделение слоев достигнуто, вынимают пробирку из бани, доливают в нее дистиллированной воды столько, чтобы слой жирных кислот поднялся почти до края пробирки, и ставят ее в стакан с холодной водой.

После охлаждения пробирки сравнивают консистенцию и запах жирных кислот, выделенных из растительного и животного жира.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Липиды. Определение, биологические функции, распространенность в природе и использование.
2. Способы классификации липидов.
3. Физико-химические свойства липидов.
4. Основные константы жиров и масел: температура плавления, кислотное, йодное числа и число омыления.
5. Простые липиды. Условные формулы растительного, животного и молочного жиров.
6. Сложные липиды. Фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин.
7. Щелочной и кислотный гидролиз липидов.

## ТЕМА 7. УГЛЕВОДЫ

### Цель занятия:

- разобраться в классификации углеводов;
- научиться писать формулы моносахаридов в карбонильной и циклической формах;
- разобраться в строении ди- и полисахаридов, знать их биологическую роль;
- знать отличия в строении восстанавливающих и невосстанавливающих углеводов и качественные реакции для них;
- уметь писать уравнения реакций, отражающих свойства карбонильных и спиртовых групп углеводов.

### Задачи занятия:

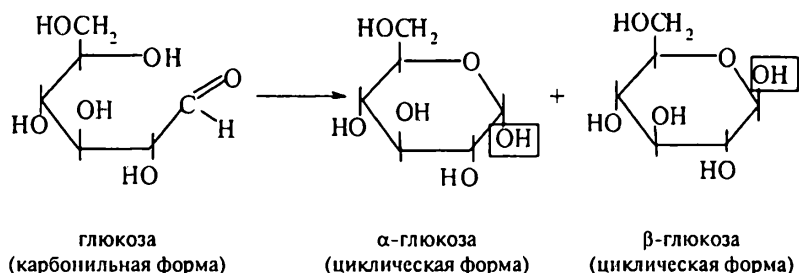
- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- с различными сахарами провести качественные реакции и эксперименты по гидролизу;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 7.1. Окисление альдоз аммиачным раствором оксида серебра

**Краткая теория к работе.** Моносахариды по своему строению являются полиоксиальдегидами или полиоксикетонами. Как известно, альдегиды и кетоны могут реагировать со спиртами. Благодаря такому взаимодействию моносахариды существуют в двух формах: *карбонильной* и *циклической*. Причем циклическая форма содержит гидроксил, которого нет в карбонильной форме. Этот гидроксил на-

зывают *гликозидным* или *полуацетальным*. По своим свойствам он отличается от других гидроксильных моносахарида высокой активностью. Именно большая подвижность атома водорода гликозидного гидроксила обуславливает взаимное превращение оксикарбонильной формы в циклическую. При этом положение гликозидного гидроксила относительно плоскости цикла определяет  $\alpha$ - или  $\beta$ -изомерную форму сахара.

На примере глюкозы это выглядит так:



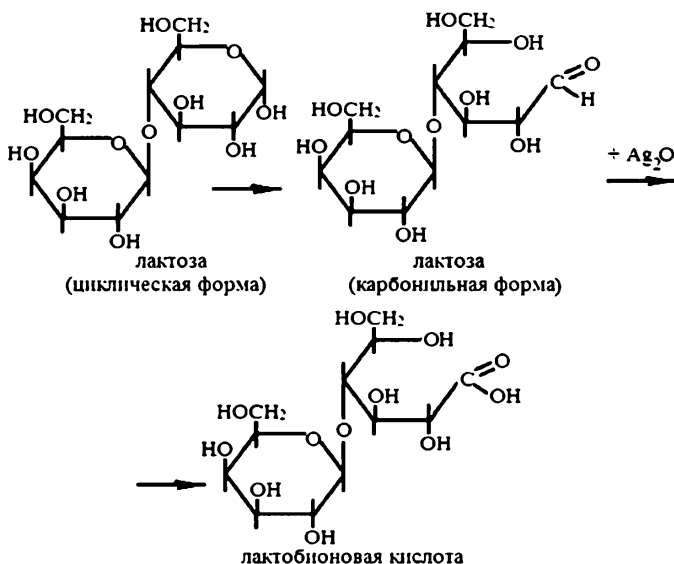
У альдоз гликозидный гидроксил всегда находится у первого атома углерода, а у кетоз — у второго.

Альдегидная группа альдоз может подвергаться окислению в мягких условиях. В результате образуются монокарбоновые полиоксикислоты. Их называют *альдоновые* у моносахаридов и *бионовые* — у дисахаридов.

Кетозы в таких условиях реагируют значительно хуже. Поэтому реакции окисления используют для отличия альдоз от кетоз.

**Сущность метода.** Реакция относится к окислительно-восстановительному типу и позволяет обнаруживать редуцирующие сахара, отличительной особенностью которых в циклической форме является свободный гликозидный гидроксил у первого углеродного атома.

Окисление сахаров происходит за счет восстановления одновалентного серебра до металлического в виде зеркального налета. Поэтому реакция называется «серебряное зеркало» и является качественной для редуцирующих сахаров. Ее могут давать как моно- так и дисахариды, в молекулах которых сохранился свободным гликозидный гидроксил:



В качестве реактива берут бесцветный раствор оксида серебра в водном аммиаке (реактив Толленса), содержащий комплексное соединение  $[Ag(NH_3)_2]OH$ . Избыток гидроксильных ионов, содержащихся в реактиве Толленса, ускоряет окисление, а значительный избыток аммиака снижает чувствительность реакции.

Реакция восстановления серебра сахарами используется в промышленности при изготовлении зеркал.

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, водяная баня, электрическая плитка;
- 1%-ные растворы сахаров, свежеприготовленный аммиачный раствор оксида серебра.

**Ход работы.** Опыт проводят одновременно с несколькими различными сахарами. Для положительной реакции важно использовать тщательно вымытую посуду.

В пробирке смешивают равные количества, примерно по 1 см<sup>3</sup> аммиачного раствора оксида серебра и раствора сахара. Закрепляют пробирку в держателе, встряхивают и погружают ее на несколько минут в водяную баню с температурой 60...80 °С.



Если пробирка была чистой, выделяющееся при окислении сахара металлическое серебро осаждается на стенках тонким зеркальным слоем; в ином случае выпадает черный осадок.

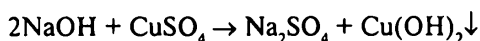
## 7.2. Окисление альдоз гидроксидом двухвалентной меди

**Краткая теория к работе.** В растворах моносахариды существуют преимущественно в циклической форме, которая может переходить в карбонильную. Это касается и дисахаридов, у которых сохранился свободным гликозидный гидроксил. Если карбонильная форма сахара имеет альдегидную группу, то он обладает редуцирующими свойствами (от лат. *reduction* — восстановление) и восстанавливает металлы.

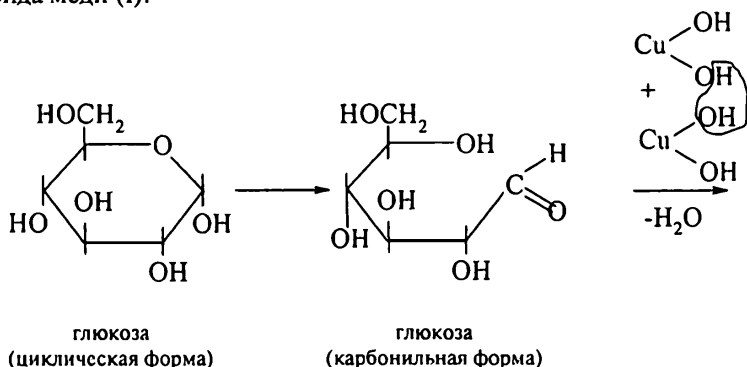
Сами сахара при этом окисляются до соответствующих кислот: моносахариды — до альдоновых, а дисахариды — до бионовых. Например, из глюкозы получается глюконовая кислота, из галактозы — галактоновая, из рибозы — рибоновая, из лактозы — лактобионовая, из мальтозы — мальтобионовая.

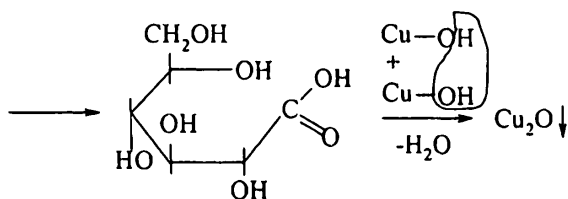
**Сущность метода.** В реакции окисления альдозы вступают в оксикарбонильной форме. При использовании мягких окислителей альдегидная группа превращается в карбоксильную.

Для окисления сахаров используют гидроксид меди(II), который получают взаимодействием сульфата меди с гидроксидом натрия:



Восстановление двухвалентной меди в щелочном растворе при нагревании сопровождается образованием красного нерастворимого оксида меди (I):





глюконовая кислота

Описанная реакция носит название «пробы Троммера» и является качественной на редуцирующие сахара. Она часто применяется для их обнаружения в растворах, а также лежит в основе количественного определения сахаров в крови, моче, молоке и других биологических жидкостях.

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, спиртовка;
- 1%-ные растворы сахаров, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 5%-ный раствор сульфата меди.

**Ход работы.** Опыт проводят одновременно с несколькими различными сахарами.

В пробирку наливают 1...2 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора сахара, затем добавляют 1...2 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия и 2...3 капли 5%-ного раствора сульфата меди. Образующийся голубой осадок гидроксида меди (II) при встряхивании растворяется, и жидкость окрашивается в ярко-синий цвет.

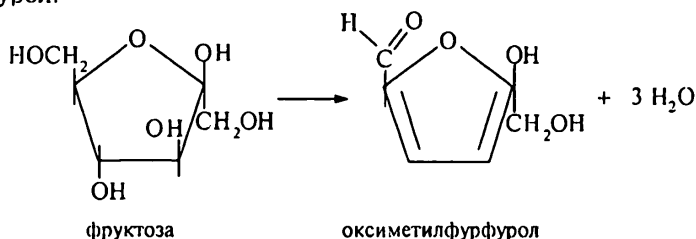
Пробирку закрепляют в держателе и осторожно нагревают содержимое в пламени спиртовки до начала кипения. Если сахар окисляется, то синяя окраска раствора при нагревании переходит сначала в зеленую. Одновременно появляется желтый, красный или коричневый осадок.

### 7.3. Реакция Селиванова на кетозы

**Краткая теория к работе.** Реакция носит имя Ф. Ф. Селиванова, который открыл ее в 1887 г. Она используется для обнаружения кетоз в растворах.

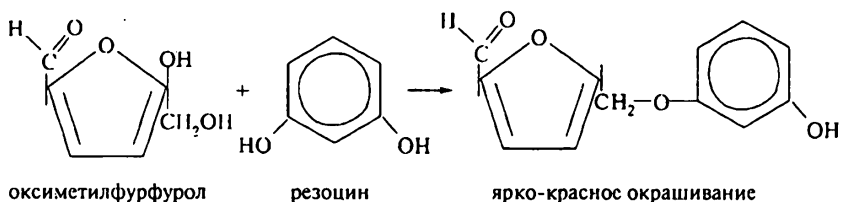
Реактив, предложенный Ф. Ф. Селивановым, состоит из 0,01 г ре-зорцина в смеси 10 см<sup>3</sup> воды и 10 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты. При нагревании растворов сахаров с этим реактивом про-

исходит дегидратация фруктозы. В результате образуется оксиметилфурфурол:



При этом соляная кислота, очевидно, оказывает каталитическое действие как для процесса дегидратации, так и для гидролиза дисахаридов.

Другой компонент реактива — резорцин — конденсируется с оксиметилфурфуролом и дает ярко окрашенный продукт состава  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_4$ . Превращение протекает, возможно, по следующей схеме:



Кетозы в условиях опыта превращаются в оксиметилфурфурол в десятки раз быстрее, чем альдозы, что и обуславливает быстроту появления окраски и ее интенсивность в растворах фруктозы и сахарозы.

**Сущность метода.** Положительным тестом на кетозы является появление ярко-красного цвета при добавлении реактива Селиванова к исследуемому раствору.

Этой пробой обнаруживаются кетогексозы, как свободные, так и связанные в молекулах дисахаридов, поскольку в условиях проведения реакции дисахариды успевают частично гидролизоваться, давая свободные моносахариды.

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, водяная баня, электрическая плитка, вода дистиллированная;

- 1%-ный раствор фруктозы, кристаллический резорцин, концентрированная соляная кислота.

**Ход работы.** В сухой пробирке готовят реактив Селиванова. Для этого в нее помещают небольшое количество кристаллического резорцина, чтобы заполнить дно пробирки, добавляют около 1 см<sup>3</sup> воды и осторожно около 1 см<sup>3</sup> концентрированной соляной кислоты.

Затем в пробирку с реактивом Селиванова добавляют около 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора фруктозы. Пробирку погружают в горячую водяную баню и наблюдают, как спустя несколько минут раствор окрашивается в красно-вишневый цвет.

#### 7.4. Кислотный гидролиз сахарозы

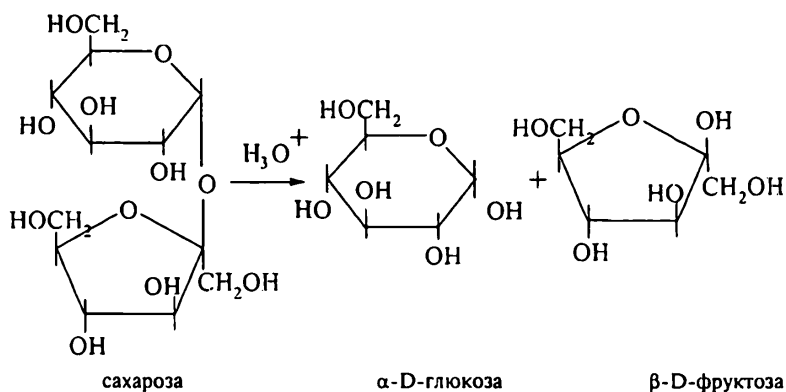
**Краткая теория к работе.** Сахароза — один из продуктов, издавна известный человеку. Ее выделяли на Древнем Востоке из сока сахарного тростника. Отсюда одно из названий сахарозы — тростниковый сахар. Родиной сахарного тростника считается Индия. Из Индии это растение было вывезено в Египет и Персию, откуда через Венецию сахар поступал в европейские страны и считался роскошью.

В поисках доступного источника сахара немецкий химик Андреас Сигизмунд Маргграф проводил опыты со свеклой, которые описал в 1747 г. [32]. Уже к концу XVIII века в Германии вывели свеклу с повышенным содержанием сахара. А в 1796—1802 гг. ученик Маргграфа Франц Карл Ахард разработал способ выделения сахара из свеклы. Вот почему сахарозу называют еще и свекловичным сахаром.

По своему строению сахароза является дисахаридом. Гидролиз сахарозы приводит к образованию глюкозы и фруктозы в соотношении 1 : 1. Удельное вращение сахарозы +66°, а гидролизата –20°, то есть в процессе гидролиза оптическое вращение меняет знак. По этой причине гидролиз сахарозы называют «инверсией», а глюкозо-фруктозную смесь — «инвертированным сахаром». Пчелиный мед на три четверти состоит из глюкозы и фруктозы, то есть является природным инвертным сахаром. Глюкозо-фруктозную смесь часто используют в пищевой промышленности, так как она слабо кристаллизуется, а значит, сиропы и варенья не засахариваются.

**Сущность метода.** Для определения структуры дисахарида его гидролизуют и идентифицируют составляющие его моносахариды.

Сахароза — это невосстанавливающий сахар, так как два моносахаридных остатка связаны своими гликозидными гидроксилами. Гидролиз сахарозы в присутствии минеральных кислот протекает по схеме:



Глюкоза относится к альдозам, а фруктоза — к кетозам. Каждый из этих моносахаридов можно идентифицировать определенной качественной реакцией. Глюкозу открывают реакцией «серебряного зеркала», а фруктозу — реакцией Селиванова.

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, водяная баня, электрическая плитка;
- 1%-ный раствор сахарозы, 20%-ный раствор серной кислоты.

**Ход работы.** В пробирку наливают 3...4 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора сахарозы и добавляют 3...4 капли 20%-ного раствора серной кислоты. Пробирку закрепляют в держателе и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10...15 минут, а затем охлаждают под струей водопроводной воды. Содержимое пробирки делят пополам.

В одной пробирке проводят реакцию «серебряного зеркала», чтобы подтвердить наличие глюкозы. Для этого туда вносят аммиачный раствор оксида серебра и около 1 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора гидроксида натрия (для нейтрализации кислой реакции среды).

В другой пробирке, чтобы подтвердить присутствие фруктозы, проводят реакцию Селиванова как в работе 7.3.

Обе пробирки погружают в горячую водяную баню на несколько минут до появления видимых изменений.

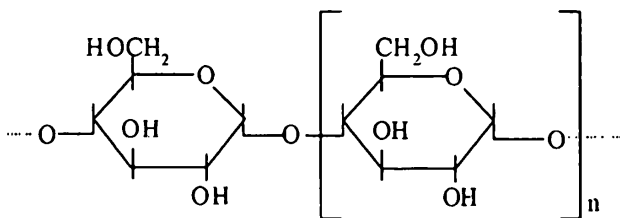
### 7.5. Кислотный гидролиз крахмала

**Краткая теория к работе.** Крахмал — широко распространенный в природе полисахарид. Он образуется в растениях и является конеч-

ным продуктом ассимиляции ими углекислого газа под влиянием солнечной энергии. Крахмал накапливается как резервный материал в зернах злаковых растений, в клубнях картофеля и т. п.

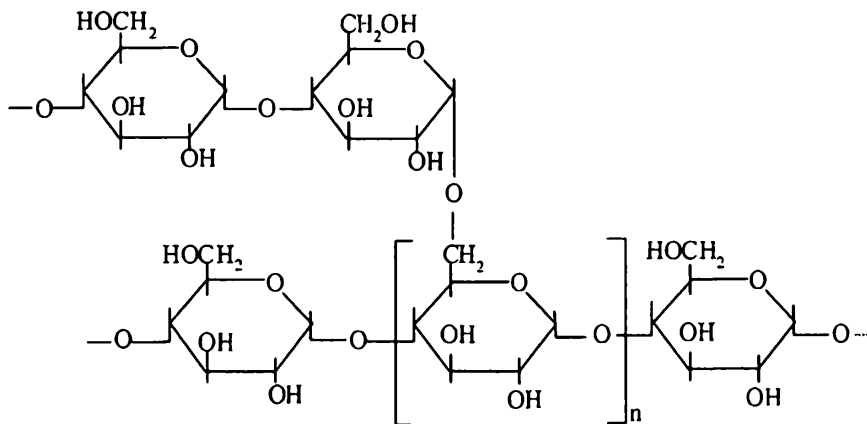
По своему составу крахмал неоднороден, он представляет собой смесь двух полисахаридов: растворимой в воде амилозы и нерастворимого в воде амилопектина.

Молекулы амилозы закручены в спираль,  $\alpha$ -глюкозные остатки в них связаны 1, 4-кислородными мостиками. В каждой молекуле амилозы содержится 200...400 остатков глюкозы:



фрагмент молекулы амилозы

Амилопектин, подобно амилозе, содержит 1,4- $\alpha$ -связанные остатки глюкозы, но, кроме этого, имеются еще поперечные 1, 6-кислородные мостики между некоторыми глюкозными остатками. В результате цепи амилопектина сильно разветвлены и имеют шаровидную форму. Полимер амилопектина содержит 600...6000 глюкозных остатков:



фрагмент молекулы амилопектина

Крахмал не растворим в холодной воде, но в горячей он легко набухает, образуя вязкий коллоидный раствор — крахмальный клейстер.

Крахмал способен как к ферментативному, так и к кислотному гидролизу. Расщепление молекул крахмала протекает ступенчато, и при определенных условиях или под влиянием специфических ферментов из него могут быть получены различные по сложности продукты. Например, ферменты солода доводят гидролиз крахмала до мальтозы, а ферменты дрожжей — до глюкозы.

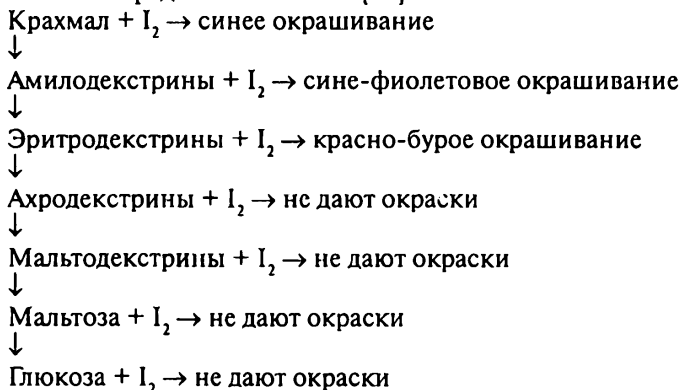
При частичном гидролизе сначала получается растворимый крахмал, уже не образующий клейстера, но еще дающий синее окрашивание с йодом.

При более глубоком гидролизе крахмал превращается в декстрины. Они представляют собой полисахариды со значительно более короткими цепями, чем у полисахаридов крахмала. В зависимости от длины цепи декстрины подразделяются на амилодекстрины, эритродекстрины, ахродекстрины, мальтодекстрины.

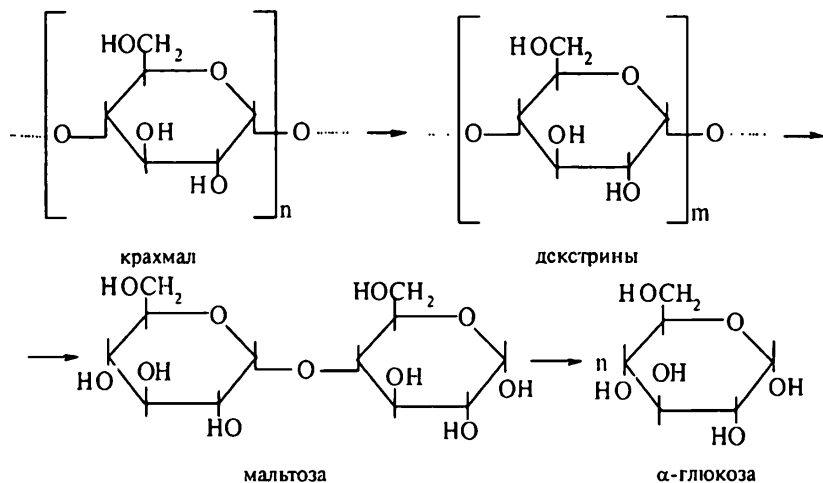
Предпоследней ступенью гидролиза крахмала является дисахарид мальтоза, которая затем расщепляется до  $\alpha$ -глюкозы.

Известно, что крахмал с йодом дает синее окрашивание. Причиной появления окраски считают образование молекулярных соединений йода с фрагментами глюкозы в крахмале —  $C_6H_{10}O_5 \cdot I_2$ .

Проба с йодом очень проста и позволяет наблюдать за гидролизом крахмала, поскольку продукты ступенчатого гидролиза крахмала также окрашиваются йодом, но имеют разный цвет в зависимости от длины полимера. Изменение окрашивания йода при гидролизе крахмала можно представить схемой [21]:



При нагревании с разбавленными минеральными кислотами крахмал подвергается гидролизу. При этом сначала образуются декстрины, затем дисахарид мальтоза и конечный продукт гидролиза — моносахарид  $\alpha$ -глюкоза:



Крахмал с йодом дает синее окрашивание. Исчезновение окрашивания свидетельствует об окончании процесса гидролиза.

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, водяная баня, электрическая плитка, палетка, пипетка вместимостью 1 см<sup>3</sup>, вода дистиллированная;
- 1%-ный раствор крахмала, 20%-ный раствор серной кислоты, раствор йода.

79



Контроль гидролиза крахмала проводят по пробе с йодом. Для этого в несколько ячеек палетки вносят по одной капле дистиллированной воды и по одной капле йода.

Через 1...2 минуты после внесения серной кислоты из пробирки пипеткой отбирают одну каплю исследуемой смеси и вносят в ячейку палетки с приготовленным раствором йода. Наблюдают за изменением окрашивания. Пробирку из бани при этом доставать не следует.

Такие пробы повторяют каждые 2...3 минуты до тех пор, пока йод не перестанет менять окрашивание после добавления капли исследуемой смеси. Это будет свидетельствовать об окончании гидролиза крахмала.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Углеводы. Определение. Биологическая роль. Физические свойства.
2. Классификация углеводов: по положению карбонильной группы, по числу углеродных атомов, по числу углеводных остатков.
3. Гликозидный (полуацетальный) гидроксил;  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы углеводов.
4. Восстанавливающий и невосстанавливающий тип углеводов. Качественные реакции на редуцирующие сахара.
5. Количественный метод на редуцирующие сахара на примере моно- и дисахаридов.
6. Образование гликозидов, их названия.
7. Моносахариды. Образование карбонильных и циклических форм на примерах рибозы, глюкозы, галактозы, фруктозы.
8. Дисахариды. Карбонильные и циклические формы сахарозы, лактозы, мальтозы, целлобиозы. Продукты гидролиза этих дисахаридов.
9. Полисахариды. Условные формулы крахмала (амилоза, амилопектин), гликогена, клетчатки.
10. Гидролиз ди- и полисахаридов. Конечные продукты гидролиза этих углеводов.

## ТЕМА 8. АМИНОКИСЛОТЫ

### Цель занятия:

- знать названия и формулы 20 протеиногенных аминокислот, разобраться в их классификации;
- разобраться в химических свойствах аминокислот по карбоксильной и аминогруппе, уметь писать уравнения соответствующих реакций;
- знать общие и специфические реакции на аминокислоты.

### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- провести эксперимент по разделению смеси аминокислот методом хроматографии на бумаге, а также выполнить ряд качественных реакций на аминокислоты;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 8.1. Хроматографическое разделение смеси аминокислот на бумаге

**Краткая теория к работе.** Хроматография — это простой способ разделения сложных веществ. Впервые метод распределительной хроматографии применил русский ученый М. С. Цвет в 1903 г. Название метода происходит от двух греческих слов «*chroma*» — «цвет» и «*grapho*» — «пишу».

Разделение смесей методом хроматографии основано на различном распределении их компонентов между двумя фазами — неподвижной и подвижной (элюентом). В случае хроматографии окрашенных веществ участки их адсорбции будут видимые, а в случае бесцветных веществ неподвижную фазу обрабатывают специальными реактивами, дающими с исследуемыми веществами цветные комплексы.

Хроматографические методы подразделяются по физическим принципам на распределительные (разделение смеси между двумя растворителями), адсорбционные (разделение между растворителем и адсорбентом) и вытеснительные (вытеснение вещества, захваченного адсорбентом, другим веществом).

По используемой методике различают хроматографию колоночную, хроматографию на бумаге, тонкослойную, газовую, жидкостную, ионообменную, на молекулярных ситах или гелях (гель-фильтрация).

С помощью метода распределительной хроматографии на бумаге легко произвести разделение аминокислот, содержащихся в гидролизате белка, сыворотке крови, моче, определить отдельные аминокислоты в смеси, а также исследовать и другие вещества.

Определение свободных аминокислот важно для изучения обмена белков и отдельных аминокислот в организме.

**Сущность метода.** В данной работе неподвижной фазой служит хроматографическая бумага. Это фильтровальная бумага хорошего качества и однородной структуры. Подвижной фазой является растворитель, который продвигается по капиллярам фильтровальной бумаги.

Растворитель увлекает за собой растворенные в нем аминокислоты. Однако разные аминокислоты движутся по бумаге с неодинаковой скоростью. Скорость движения аминокислоты зависит от степени сродства аминокислоты к растворителю. Те аминокислоты, которые имеют большее сродство к растворителю, то есть лучше в нем растворяются, перемещаются с большей скоростью и пройдут больший путь. Аминокислоты, которые хуже растворяются, пройдут меньший путь.

Степень сродства аминокислоты к растворителю характеризуется коэффициентом подвижности.

Для проявления аминокислот хроматографическую бумагу обрабатывают раствором нингидрина, с которым аминокислоты образуют комплексы красно-фиолетового цвета.

#### **Оборудование и реактивы:**

- цилиндр вместимостью 250 см<sup>3</sup>, центрифужные пробирки градуированные вместимостью 10 см<sup>3</sup>, круглодонная колба вместимостью 100 см<sup>3</sup>, полоска фильтровальной бумаги размером 200 × 20 мм с конусообразно срезанным концом с одной стороны, вода дистиллированная;
- смесь аминокислот для разделения, бутанол, ледяная уксусная кислота, 1%-ный раствор нингидрина в ацетоне.

**Ход работы.** В цилиндр, который будет служить хроматографической камерой, центрифужными пробирками наливают 4 см<sup>3</sup> бутилового спирта, 1 см<sup>3</sup> ледяной уксусной кислоты и 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

На полоске хроматографической бумаги на расстоянии 25 мм от срезанного края простым карандашом проводят стартовую линию. В середине стартовой линии также простым карандашом ставят точку. На расстоянии 100 мм от стартовой линии проводят еще одну линию, до которой должен дойти фронт растворителя.

На подготовленную таким образом полоску хроматографической бумаги из микропипетки порциями наносят 0,01 см<sup>3</sup> смеси аминокислот. При этом микропипеткой нужно прикасаться к точке, отмеченной на стартовой линии бумаги. Причем при нанесении каждой порции пятно не должно превышать 5 мм в диаметре. Пятно просушивают на воздухе и наносят следующую порцию. Так продолжают до тех пор, пока не будет нанесен весь указанный объем.

Разделение аминокислот проводят в упрощенной установке (рис. 6).

Для этого полоски хроматографической бумаги (1) помещают в цилиндр (2) и срезанным концом опускают в растворитель (4) так, чтобы стартовая линия (3) была выше уровня растворителя на 5...10 мм. Таким образом в цилиндр можно поместить две полоски хроматографической бумаги. Очень важно, чтобы одна полоска не касалась другой. Полоски удерживают в таком положении, закрывая цилиндр перевёрнутой вверх дном колбой (5).

Хроматографию прекращают, когда растворитель поднимется до второй линии — фронт растворителя (6). Полоски извлекают из цилиндра, просушивают на воздухе, а затем в сушильном шкафу. Высушиванием аминокислоты фиксируются на бумаге.

Хроматограммы проявляют нингидриновым реактивом. Для этого высушенные полоски хроматографической бумаги смачивают из специального приспособления на поддоне

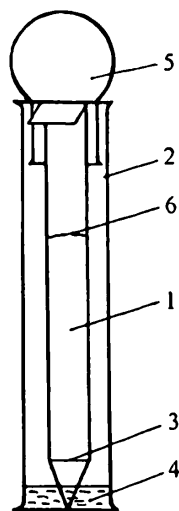


Рис. 6. Упрощенная установка для разделения аминокислот

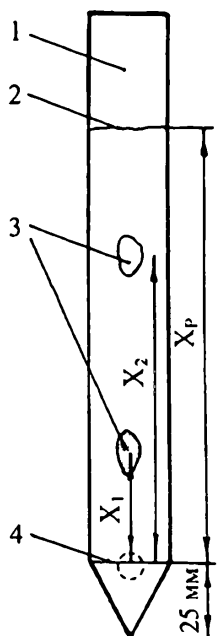


Рис. 7. Проявленная полоска хроматографической бумаги

1%-ным раствором нингидрина в ацетоне. Влажные хроматограммы помещают в вытяжной шкаф на 10 минут для удаления ацетона, а затем в сушильный шкаф, где оставляют на 15 минут при температуре 70 °С.

В результате на полоске хроматографической бумаги (1) появляются окрашенные в фиолетовый цвет пятна аминокислот (3) (рис. 7).

Для идентификации аминокислот выполняют следующие расчеты. Во-первых, измеряют фронт растворителя (2) — путь, пройденный растворителем  $X_p$ . Во-вторых, измеряют пути, пройденные аминокислотами ( $X_1$  и  $X_2$ ) — расстояния от стартовой линии (4) до центра пятен.

Затем для каждой аминокислоты рассчитывают коэффициент подвижности:

$$R_f = \frac{x_A}{x_p}$$

где  $R_f$  — коэффициент подвижности;  $X_A$  — путь, пройденный аминокислотой, в данном случае  $X_1$  ( $X_2$ ), мм;  $X_p$  — путь, пройденный растворителем, мм.

Полученные коэффициенты подвижности сравнивают со стандартными по табл. 5.

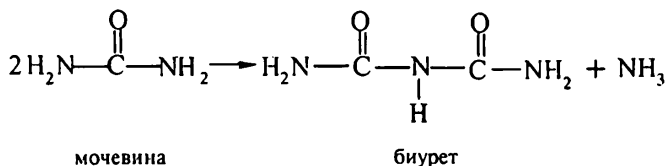
Таблица 5

Аминокислоты	Коэффициент подвижности в растворителе: бутанол, уксусная кислота, вода (4 : 1 : 1)
Цистин	0,13
Лизин	0,16
Гистидин	0,17
Аргинин	0,18

Серин	0,32
Аспарагиновая кислота	0,33
Глицин	0,34
Треонин	0,36
Глутаминовая кислота	0,37
$\alpha$ -Аланин	0,39
$\beta$ -Аланин	0,40
Пролин	0,50
Тирозин	0,53
Валин	0,56
Метионин	0,58
$\gamma$ -аминомасляная кислота	0,60
Триптофан	0,62
Фенилаланин	0,66
Изолейцин	0,68
Лейцин	0,72

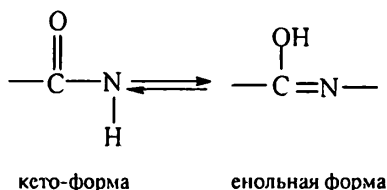
## 8.2. Биуретовая реакция (реакция Пиотровского)

**Краткая теория к работе.** Реакция была изучена с производным мочевины — биуретом, поэтому и носит такое название. Биурет легко образуется при нагревании мочевины:

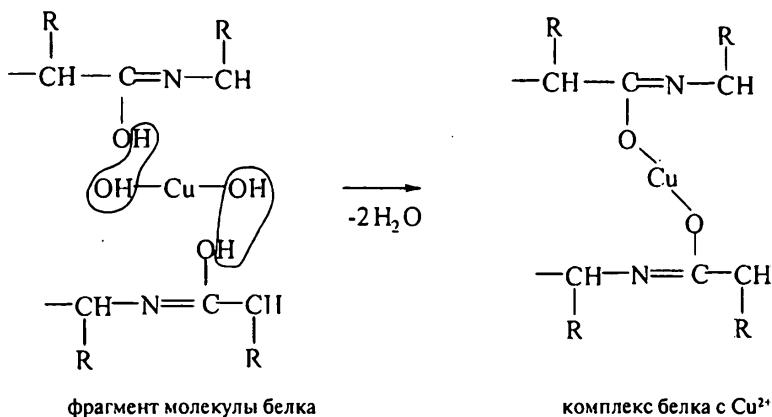


**Сущность метода.** Биуретовая реакция обнаруживает пептидные связи, за счет которых построены белки и поэтому является общей реакцией для всех белков. Биуретовую реакцию способны давать вещества, которые содержат не менее двух пептидных связей.

В условиях реакции пептидные связи белков и биурета претерпевают полную енолизацию:



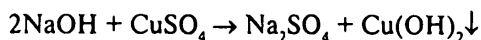
Затем енолизированные пептидные связи любых белков или пептидов взаимодействуют с гидроксидом меди(II) и образуют комплексное соединение по схеме:



Как видно из схемы, комплексообразователем является катион меди  $\text{Cu}^{2+}$ . Ковалентными связями (сплошные линии) он соединен с атомами кислорода, а координационные связи (пунктирные линии) образованы за счет электронных пар атомов азота иминных групп.

Комплексы такого типа могут отличаться окраской. При образовании двух или трех координационных связей появляется синее или фиолетовое окрашивание. Если в образовании комплекса участвуют четыре атома азота, то соединение имеет красный цвет. Вот почему при проведении биуретовой реакции окраска соединений варьирует от синей до красной с преобладанием фиолетовой.

Гидроксид двухвалентной меди получают при взаимодействии сульфата меди со щелочью:



Нельзя добавлять избыток сульфата меди, поскольку голубой осадок гидроксида меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса.

#### Оборудование и реактивы:

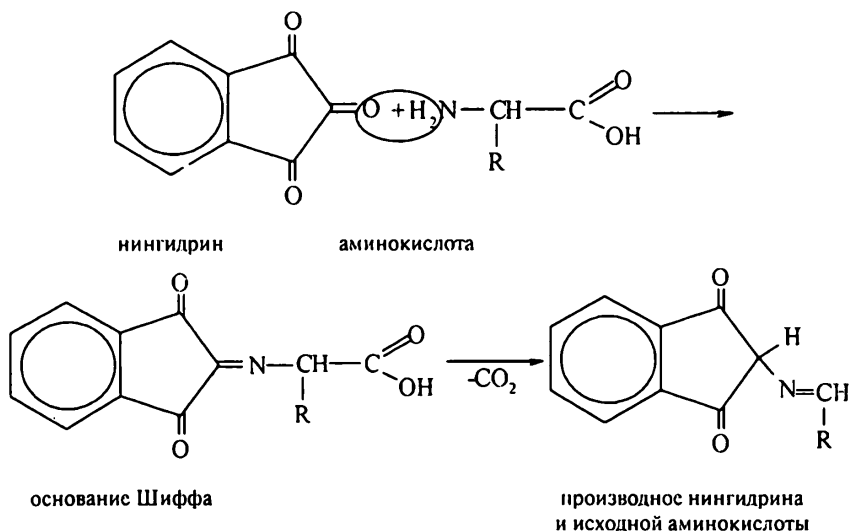
- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, автомат вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания гидроксида натрия;
- раствор исследуемого белка, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди.

**Ход работы.** В пробирку наливают около 1 см<sup>3</sup> раствора исследуемого белка, 1 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия и добавляют 0,5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора сульфата меди. После перемешивания содержимое пробирки приобретает фиолетовый цвет.

### 8.3. Нингидриновая реакция

**Краткая теория к работе.** Нингидрином называют трикетогидринден. Для обнаружения аминокислот и белков используют его раствор в ацетоне. Химизм реакции следующий [22].

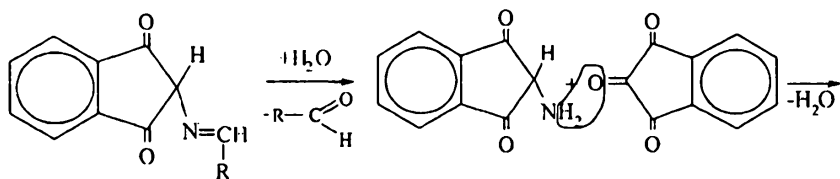
Сначала аминокислота дает с нингидрином основание Шиффа, которое подвергается перегруппировке и декарбоксилированию:





Образовавшееся производное нингидрина и исходной аминокислоты далее изменяется в двух направлениях.

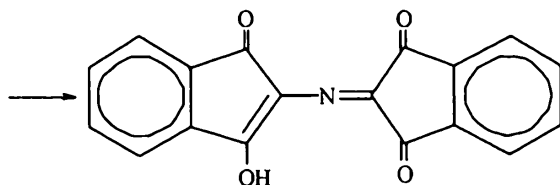
В первом случае происходит гидролитическое отщепление альдегида и образование аминодикетогидриндена, который конденсируется с еще одной молекулой нингидрина. Продукт этого превращения подвергается енолизации и называется сине-фиолетовый Руэман:



производное нингидрина  
и исходной аминокислоты

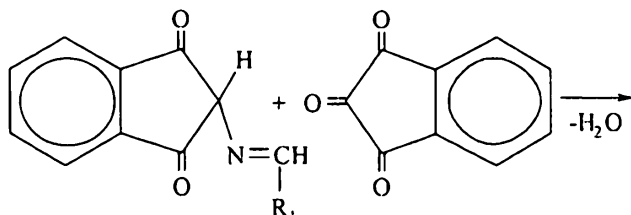
аминодикетогидринден

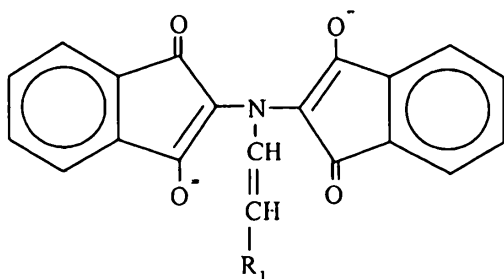
нингидрин



сине-фиолетовый Руэман

В параллельном превращении производное нингидрина и исходной аминокислоты без изменений конденсируется с другой молекулой нингидрина:

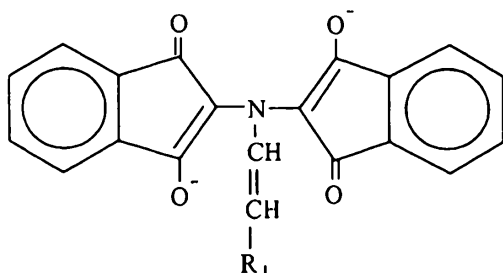




Продукт этой реакции сильно сопряжен и поэтому интенсивно окрашен. Окраска может быть от голубой до красной, в зависимости от радикала входящей в его состав аминокислоты.

**Сущность метода.** Нингидриновая реакция открывает  $\alpha$ -амино-группы как свободных аминокислот, так и аминных групп белковой молекулы, а значит, как и биуретовая реакция является общей для всех белков и аминокислот.

Химизм реакции достаточно сложен, она протекает в несколько этапов. Но известно, что в присутствии органических растворителей (аcetона, этанола и др.), на которых готовят раствор нингидрина, образуется интенсивно окрашенное соединение, в составе которого содержится радикал исходной аминокислоты:



Именно радикал исходной аминокислоты обуславливает различную окраску (голубую, фиолетовую, красную и др.) соединений, возникающих при реакции аминокислот с нингидрином.

В настоящее время нингидриновая реакция широко используется для обнаружения аминокислотных пятен при хроматографии на пластинках или на бумаге, для открытия отдельных аминокислот, а также

для колориметрического количественного определения аминокислот в биологических объектах.

**Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, водяная баня, электрическая плитка;
- раствор исследуемого белка, 1%-ный раствор нингидрина в ацетоне.

**Ход работы.** В пробирку наливают около 1 см<sup>3</sup> раствора исследуемого белка и добавляют 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора нингидрина в ацетоне. Закрепляют пробирку в держателе и после встряхивания погружают ее в горячую водяную баню на 1...2 минуты. При этом появляется розово-фиолетовое или сине-фиолетовое окрашивание.

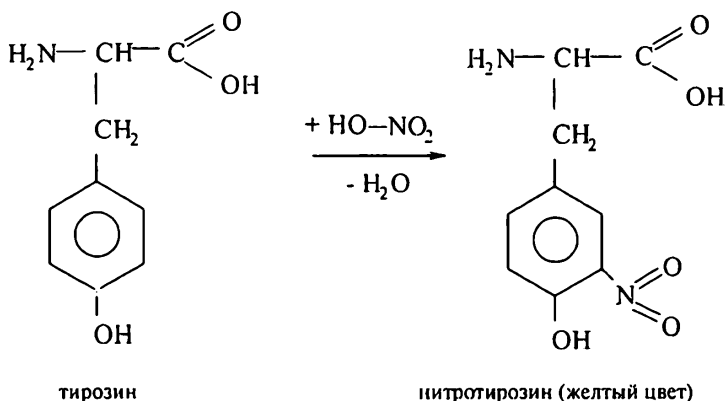
#### 8.4. Ксантопротеиновая реакция

**Краткая теория к работе.** Свое название реакция получила от греческого *xanthos* — желтый. Желтое окрашивание наблюдается при попадании концентрированной азотной кислоты на кожу, ногти и т. п.

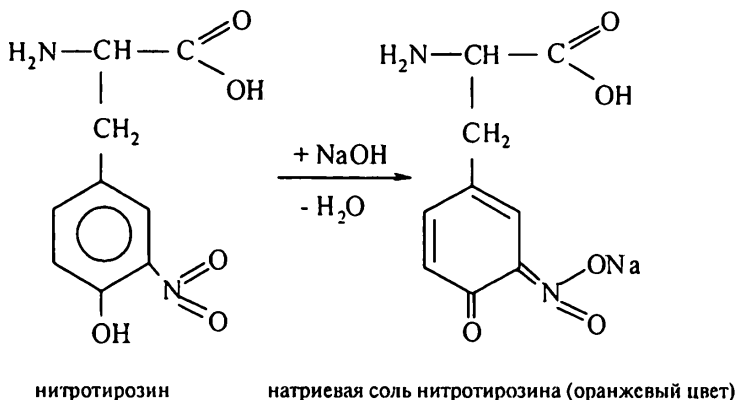
Ксантопротеиновая реакция является специфической реакцией для ароматических аминокислот: фенилаланина, тирозина, триптофана.

Желатин и ряд других белков, не содержащих ароматических аминокислот, не дают ксантопротеиновой реакции.

**Сущность метода.** В реакции с азотной кислотой бензольные кольца фенилаланина, тирозина и триптофана подвергаются нитрованию. В результате образуются нитропроизводные белков, окрашенные в желтый цвет:



Под влиянием щелочи из нитропроизводного образуется соль, имеющая хиноидную группировку:



#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, капельница для отмеривания азотной кислоты, держатель для пробирок, водяная баня, электрическая плитка;
- раствор исследуемого белка, концентрированная азотная кислота, 10%-ный раствор гидроксида натрия.

**Ход работы.** В пробирку наливают около 1 см<sup>3</sup> раствора исследуемого белка и добавляют 3...5 капель концентрированной азотной кислоты. При этом белок денатурирует с образованием белого коллоидного осадка. Затем пробирку закрепляют в держателе и погружают в горячую водяную баню на несколько минут. В результате развивается желтая окраска, а осадок почти полностью растворяется.

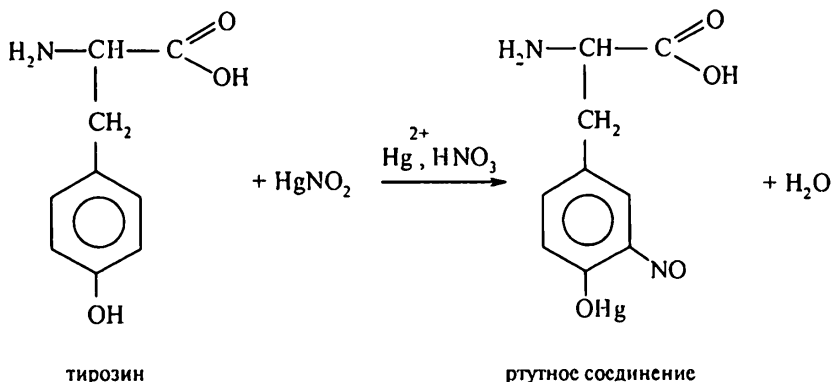
Пробирку достают из водяной бани и охлаждают под струей холодной воды. После чего к смеси, не взбалтывая, добавляют 10%-ный раствор гидроксида натрия и наблюдают за изменением желтого цвета смеси до ярко-оранжевого.

### 8.5. Азотно-ртутная реакция (реакция Миллона)

**Краткая теория к работе.** Эта реакция относится к группе специфических реакций. Она характерна для аминокислоты тирозина и белков, ее содержащих.

Для обнаружения тирозина используют реактив Миллона. Это смесь нитратов и нитритов ртути ( $\text{Hg}^+$  и  $\text{Hg}^{2+}$ ), растворенных в концентрированной азотной кислоте. Следует избегать прибавления избытка реактива Миллона, поскольку он содержит азотную кислоту, которая при взаимодействии с белком может дать желтое окрашивание (ксантопротеиновую реакцию), маскирующее реакцию Миллона.

**Сущность метода.** При взаимодействии реактива Миллона с фенольным ядром тирозина возникает нитрозотирозин, ртутное соединение которого окрашивается в кирпично-красный цвет:



#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, держатель для пробирок, водяная баня, электрическая плитка;
- раствор исследуемого белка, реактив Миллона.

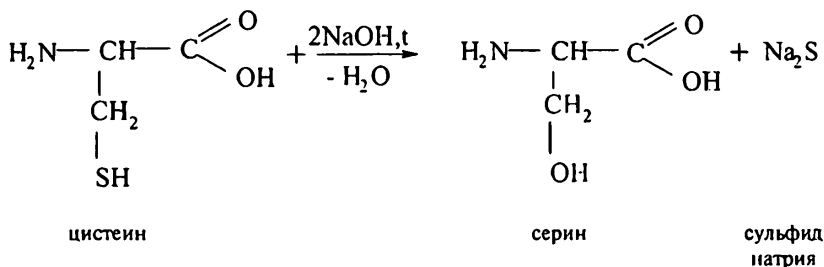
**Ход работы.** В пробирку наливают около 1 см<sup>3</sup> раствора исследуемого белка и добавляют 3...5 капель реактива Миллона. Вначале появляется коллоидный осадок белка белого цвета. Пробирку закрепляют в держателе и погружают в водяную баню с температурой не более 60 °С на несколько минут. При этом осадок белка окрашивается сначала в розовый, а затем в кирпично-красный цвет.

### 8.6. Реакция на серосодержащие аминокислоты (реакция Фоля)

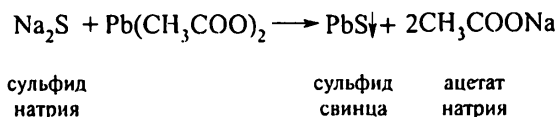
**Краткая теория к работе.** Иначе эту реакцию называют сульфгидрильная или реакция на тиоаминокислоты. Реакция специфична для

цистеина и цистина, содержащих слабосвязанную серу. Метионин, хотя и является содержащей серу аминокислотой, данной реакции не дает, поскольку сера в нем связана прочно.

**Сущность метода.** Сера, содержащаяся в белках, находится в виде сульфгидрильных групп (SH-) или в виде дисульфидных (-S-S-) мостиков. При нагревании белка с гидроксидом натрия от тиоаминокислот отщепляется сера в виде сероводорода, который в присутствии щелочи переходит в сульфид натрия:



Присутствие сульфида натрия обнаруживают действием ацетата свинца. При этом выпадает в осадок сульфид свинца, окрашенный в темно-коричневый или черный цвет:



Интенсивность окрашивания зависит от количества в белке аминокислот цистеина и цистина и от концентрации белка в растворе.

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, автомат вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания гидроксида натрия, держатель для пробирок, водяная баня, электрическая плитка;
- раствор исследуемого белка, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор ацетата свинца.

**Ход работы.** В пробирку наливают около 1 см<sup>3</sup> раствора исследуемого белка и добавляют 2 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия. Пробирку закрепляют в держателе и погружают в кипящую водяную баню на 5...7 минут.

При кипячении белка со щелочью в условиях данной реакции происходит частичный гидролиз пептидных связей и разрушение ряда аминогрупп. При этом выделяется аммиак, который обнаруживается по запаху и по посинению красной лакмусовой бумажки, если ее поднести к отверстию пробирки.

Далее к горячей реакционной смеси приливают 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора ацетата свинца и наблюдают за появлением темно-коричневого или черного окрашивания.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Аминокислоты. Определение. Общая формула.
2. Протеиногенные аминокислоты. Параметры классификации. Формулы, названия.
3. Классификация аминокислот по структуре. Ациклические незамещенные, ациклические замещенные (спирто-, тио-, карбокси-, ди-), циклические (ароматические, гетероциклические) аминокислоты.
4. Электрохимическая классификация аминокислот: нейтральные, кислые, основные.
5. Биологическая (физиологическая) классификация аминокислот: заменимые, незаменимые.
6. Физико-химические свойства аминокислот. Оптическая изомерия. Образование биполярного иона. Понятие изоэлектрической точки. Амфотерные и буферные свойства.
7. Реакции карбоксильной группы аминокислот: диссоциация, образование солей, декарбоксилирование.
8. Реакции по аминогруппе: дезаминирование (четыре типа), персаминирование.
9. Конденсация аминокислот с образованием пептидов.
10. Методы обнаружения аминокислот: формольное титрование, метод Ван-Слайка, нингидриновая проба и другие цветные реакции на аминокислоты.

## ТЕМА 9. БЕЛКИ

### Цель занятия:

- разобраться в строении белковой молекулы и физико-химических свойствах белков, знать классификацию белков;
- изучить строение и свойства гемоглобина как представителя хромопротеинов;
- разобраться в строении, свойствах и биологической роли нуклеиновых кислот — простетической группы нуклеопротеинов.

### Задачи занятия:

- изучить сущность и ход проведения опытов;
- провести эксперименты, подтверждающие физико-химические свойства белков;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 9.1. Осаждение белков при комнатной температуре нейтральными солями

**Краткая теория к работе.** Выделить из природных источников белки без изменения их свойств — сложная задача. Это связано с рядом причин. Во-первых, белки обладают особой чувствительностью к действию большинства химических реагентов (кислот, щелочей, органических растворителей и др.). Во-вторых, разрушаются от обычных процедур, применяемых при очистке веществ (нагревание, перегонка, возгонка, экстракция и т. п.). В-третьих, возможен автолиз (самопереваривание) выделяемых белков [29].

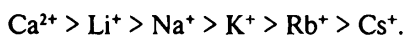
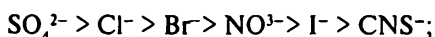
Самым распространенным способом, который позволяет осадить белки, не нарушая их природных свойств, является *высаливание*. Для этого используют концентрированные соли щелочных металлов, а также аммония и магния.

При добавлении таких солей удаляются гидрофильные оболочки с белковых частиц за счет гидратации самой соли. Одновременно



с дегидратацией происходит снятие электрического заряда с белковых молекул благодаря адсорбции противоположно заряженных ионов. Оба фактора снижают устойчивость коллоидного раствора, так как облегчают агрегацию частиц белков, которые выпадают в осадок.

Высаливающая способность солей различна. Она определяется дегидратирующими свойствами соли и характеризуется положением анионов и катионов в ряду Гофмейстера:



Наиболее активен в этом отношении сульфат аммония, который осаждает белки как в слабокислой, так и в нейтральной среде. При использовании других солей, например сульфатов и хлоридов натрия и магния, для полноты осаждения требуется подкисление растворов. Хлорид натрия осаждает белки при полном насыщении раствора (100%), а сульфат аммония — при полунасыщении (50%).

Метод высаливания позволяет также фракционировать или получать белки в кристаллическом виде. Разделение белков на фракции основано на том, что каждый индивидуальный белок разделяемой смеси осаждается из нее при определенной концентрации той или иной соли, в то время как другие белки при данной концентрации соли остаются в растворе. При дальнейшем насыщении солью выпадает следующий индивидуальный белок и, таким образом, последовательно наращивая содержание соли в реакционной среде, можно один за другим выделить относительно чистые индивидуальные белки. Таким способом получают, например, гормональные и ферментные препараты.

**Сущность метода.** Механизм действия концентрированных солей щелочных металлов, магния и аммония на белковую молекулу имеет двустороннюю направленность. Во-первых, эти соли, растворяясь, связывают большие количества воды, лишая молекулы белков гидрофильной оболочки. Во-вторых, ионы с противоположным зарядом адсорбируются на поверхности белковой частицы, и она становится электронейтральной. В результате понижается устойчивость белковых молекул в растворе и белки выпадают в осадок.

Глобулины, имеющие больший молекулярный вес, легче высаливаются, чем альбумины. Глобулины осаждаются в полунасыщенном

растворе сернокислого аммония, а альбумины — только в насыщенном растворе сернокислого аммония.

Важно отметить, что при высаливании макромолекулы белков сохраняют свои первоначальные свойства и не подвергаются денатурации. Поэтому действие солей щелочных металлов носит обратимый характер. Осадки белков, полученные таким способом, могут быть вновь растворены разбавлением водой или после удаления солей диализом.

#### **Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, воронка, шпатель, фильтры бумажные;
- раствор исследуемого белка, кристаллический хлорид натрия, 1%-ный раствор уксусной кислоты, насыщенный раствор сульфата аммония, кристаллический сульфат аммония, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди.

**Ход работы. 1. Высаливание белков хлоридом натрия.** В пробирку наливают 1 см<sup>3</sup> раствора исследуемого белка и прибавляют тонко измельченный порошок хлорида натрия до полного насыщения раствора, то есть до тех пор, пока новая порция порошка остается нерастворенной. Через несколько минут появляется осадок глобулинов.

Содержимое пробирки отфильтровывают. В фильтрате остается альбумин, который в нейтральных растворах не выпадает в осадок при добавлении хлорида натрия даже до полного насыщения.

К фильтрату прибавляют 1 каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и кипятят. При этом альбумин выпадает в осадок, так как достигнута слабокислая реакция среды, соответствующая его изоэлектрической точке.

Через несколько минут альбумин отфильтровывают через складчатый фильтр и проверяют фильтрат на наличие белка при помощи биуретовой реакции. Для этого к фильтрату добавляют 0,5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия, 3...4 капли 1%-ного раствора сульфата меди и тщательно перемешивают. Если фиолетовая окраска не появляется, значит, белки в растворе отсутствуют.

**2. Высаливание белков сульфатом аммония.** В пробирку наливают 1 см<sup>3</sup> раствора исследуемого белка и добавляют 1 см<sup>3</sup> насыщенного раствора сульфата аммония. Смесь тщательно перемешивают. Получается полунасыщенный раствор сульфата аммония, в котором вы-

падает осадок глобулинов. Через 5...7 минут содержимое пробирки отфильтровывают через складчатый фильтр.

В фильтрате остается другой белок — альбумин. К фильтрату добавляют кристаллический сульфат аммония до полного насыщения, то есть пока новая порция порошка остается нерастворенной. Оставляют пробирку на 5...7 минут. За это время альбумины выпадают в осадок, о чем свидетельствует помутнение раствора в пробирке. Содержимое пробирки отфильтровывают через складчатый фильтр, а в фильтрате проверяют отсутствие белка биуретовой реакцией. Для этого к фильтрату добавляют 0,5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия, 3...4 капли 1%-ного раствора сульфата меди и тщательно перемешивают. Если фиолетовая окраска не появляется, значит, белки в растворе отсутствуют.

## **9.2. Осаждение белков ионами тяжелых металлов**

**Краткая теория к работе.** При осаждении белков солями тяжелых металлов требуются слабые их концентрации и небольшие количества по сравнению с осаждением белков солями щелочных металлов.

При избытке ацетата свинца и сульфата меди образованный ими осадок растворяется. Это объясняется адсорбцией избытка ионов металла и перезарядкой белкового комплекса. В результате в раствор переходит комплекс измененного белка с металлом.

Осаждение белков солями тяжелых металлов используют для выделения белков или для освобождения растворов и биологических жидкостей от белков.

**Сущность метода.** Осадить белки из растворов можно действием солей тяжелых металлов (Pb, Cu, Hg, Ag и др.). В этом случае наступает необратимая коагуляция белков. Об этом свидетельствует тот факт, что даже после удаления солей диализом или разбавления водой, осадки, полученные этим способом, не удается перевести в раствор.

Ионы тяжелых металлов взаимодействуют с реакционноспособными аминокислотными радикалами белковой молекулы. В результате образуются прочные комплексные соединения и молекулы белков лишаются одноименного заряда. Кроме этого, тяжелые металлы, очевидно, глубоко изменяют вторичную, третичную и четвертичную структуры макромолекул белка.

Свойство белков необратимо связываться с тяжелыми металлами используют в медицинской и ветеринарной практике как противоядие при отравлении солями ртути, меди, свинца и др.

#### **Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>;
- раствор исследуемого белка, 1%-ный раствор ацетата свинца, 1%-ный раствор сульфата меди.

**Ход работы.** В две пробирки вносят по 1 см<sup>3</sup> раствора исследуемого белка. Затем по каплям добавляют в первую пробирку 1%-ный раствор ацетата свинца ((CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Pb), во вторую — 1%-ный раствор сульфата меди (CuSO<sub>4</sub>). Наблюдают появление осадка в пробирках.

### **9.3. Осаждение белков спиртом и ацетоном**

**Краткая теория к работе.** В органических растворителях, таких как спирт, ацетон, эфир и др., белки не растворяются и выпадают в осадок.

В зависимости от природы белка для его осаждения требуются различные концентрации органических растворителей.

При осаждении спиртом раствор белка должен быть нейтральным или слабокислым, но не щелочным.

**Сущность метода.** Действие спирта, ацетона и других органических растворителей сводится к дегидратации белковых молекул, что ведет к понижению устойчивости их в растворе.

Осадок образуется быстрее, если в растворе присутствуют соли (например, NaCl). Это лишает белковые частицы другого фактора агрегативной устойчивости — заряда.

Осаждение белков органическими растворителями может иметь как обратимый, так и необратимый характер в зависимости от продолжительности воздействия.

При быстром отделении осадка денатурация не успевает произойти и белок опять может растворяться, то есть осаждение обратимо. Длительный контакт с органическими растворителями приводит к необратимому осаждению белков.

#### **Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, шпатель;
- раствор исследуемого белка, 96°-ный этанол, ацетон, кристаллический хлорид натрия.

**Ход работы.** В две пробирки вносят по 1 см<sup>3</sup> раствора исследуемого белка. Затем в одну пробирку добавляют 1 см<sup>3</sup> спирта, а в другую —

1 см<sup>3</sup> ацетона. В каждую пробирку вносят небольшое количество (на кончике шпателя) кристаллического хлорида натрия, и содержимое встряхивают. Пробирки оставляют в покое. Через 5...7 минут выпадает осадок белка.

#### 9.4. Очистка белков методом диализа

**Краткая теория к работе.** Растворы белков обладают коллоидными свойствами. Их так и называют — «молекулярные коллоиды». Обусловлено это тем, что молекулы белков — высокомолекулярные соединения (ВМС) и по своим размерам (1...100 нм) сопоставимы с коллоидными частицами.

Как и любые коллоиды, растворы белков способны к диализу. Диализ (от греч. *dialysis* — разложение, отделение) — это удаление низкомолекулярных примесей из коллоидных систем и растворов ВМС путем диффузии через полупроницаемую мембрану.

Природными полупроницаемыми мембранами являются стенки животных и растительных клеток. Различные ионы и низкомолекулярные соединения легко минуют полупроницаемые перегородки, в то время как белки не способны проникать сквозь их поры.

В лабораторных или промышленных условиях полупроницаемые мембраны изготавливают из пергаменты, целлофана, коллодия или других полимерных материалов. Приборы для этих целей называют диализаторами.

Очистка белков методом диализа длится несколько суток. Для ускорения процесса дистиллированную воду под мембрану подают непрерывно или применяют действие электрического поля (*электродиализ*).

В более современном методе — *ультрафильтрации* — используют мембраны высокой прочности из нецеллюлозных материалов с калиброванными порами. Этот метод сочетает в себе законы диализа и разные способы их активизации. Например, продавливание растворов белков через мембраны ультрафильтрационной установки достигается сжатым газом или центробежной силой.

**Сущность метода.** В основе метода диализа лежит явление диффузии, в результате которой частицы растворенного вещества перемещаются в область с меньшей концентрацией. Границей, отделяющей растворы с разной концентрацией, служит полупроницаемая мембрана. Низкомолекулярные вещества способны проникать сквозь ее поры, а белки, как высокомолекулярные соединения — нет.

Заменяя раствор под мембраной на дистиллированную воду, раствор белка очищают от примесей.

Простейший диализатор можно приготовить самостоятельно (рис. 8).

Для этого необходимо срезать дно пластикового стаканчика (1) и образовавшееся отверстие закрыть пергаментом или целлофаном (2) с помощью эластичной резинки (3).

Перед экспериментом диализатор необходимо поместить в стакан (4) с дистиллированной водой (5) так, чтобы мембрана диализатора (6) была погружена в воду. При этом следует обратить внимание на то, чтобы между мембраной и водой не было воздушных пузырьков.

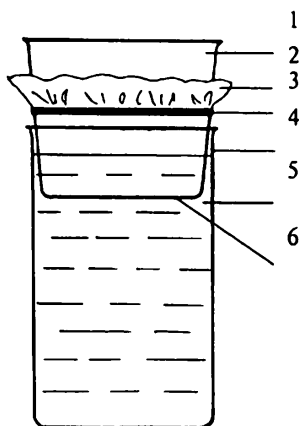


Рис. 8. Простейший диализатор

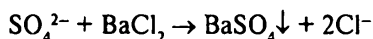
#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, диализатор, стакан химический вместимостью 200 см<sup>3</sup>, вода дистиллированная;
- раствор исследуемого белка, загрязненного сульфат-ионами, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди, 1%-ный раствор хлорида бария.

**Ход работы.** На мембрану диализатора из пипетки вносят 10 см<sup>3</sup> раствора белка, загрязненного сульфат-ионами. Через 10 минут воду под мембраной берут для исследования на наличие белка и на сульфат-ионы.

Присутствие белка в воде из-под диализатора проверяют с помощью биуретовой реакции. Для этого в пробирку из стакана наливают 1 см<sup>3</sup> воды, добавляют 0,5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия и 3...4 капли 1%-ного раствора сульфата меди. При правильной постановке опыта фиолетовое окрашивание не развивается, так как белки не проникают сквозь мембрану.

Ход диализа контролируют с помощью качественной реакции на сульфат-ионы:



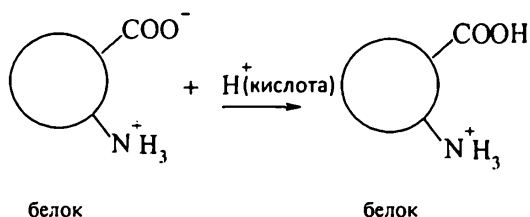
Для этого в пробирку из стакана наливают 1 см<sup>3</sup> воды и добавляют 3...5 каплей хлорида бария. Реакция считается положительной, если в пробирке появляется муть (осадок BaSO<sub>4</sub>).

После каждой положительной пробы на сульфат-ионы воду в стакане меняют и продолжают очистку белка.

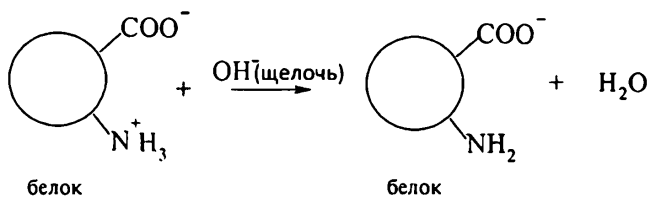
Пробу на сульфат-ионы повторяют через 10...15 минут до тех пор, пока она не станет отрицательной. Это свидетельствует о полной диффузии сульфат-ионов из раствора белка в воду и о прекращении процесса диализа.

## 9.5. Амфотерные и буферные свойства растворов белков

**Краткая теория к работе.** Свободные карбоксильные и аминокислотные группы на поверхности молекул белков обуславливают их амфотерные свойства. При подкислении среды белки проявляют свойства оснований:



С появлением в среде гидроксильных ионов белки действуют как кислоты:



Амфотерный характер лежит в основе буферных свойств белков, то есть позволяет их растворам сохранять неизменную реакцию среды. Эта особенность белков имеет большое значение для живых организмов.

**Сущность метода.** Реакцию среды раствора можно определить визуально с помощью кислотно-основных индикаторов (от лат. *indicator* — указатель), которые обратимо меняют окраску в зависи-

мости от кислотности раствора. Например, зона перехода индикатора *конго* находится в пределах 3,0...5,2 единиц pH. При значении pH ниже 3,0 окраска сине-фиолетовая, выше 5,2 — красная. Индикатор фенолфталеин в кислой и нейтральной среде бесцветен, а в щелочной имеет малиновую окраску. Поэтому фенолфталеин используют лишь для определения щелочной среды.

#### **Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, вода дистиллированная;
- раствор исследуемого белка, 1%-ный раствор соляной кислоты, 1%-ный раствор гидроксида натрия, растворы индикаторов конго и фенолфталеина.

**Ход работы.** В две пробирки наливают по 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Далее их маркируют под номерами 1 и 2.

В 1-ю пробирку добавляют 1...2 капли индикатора конго и по каплям 1%-ный раствор соляной кислоты до появления сине-фиолетового окрашивания, свидетельствующего о кислой реакции среды.

Во 2-ю пробирку добавляют 1...2 капли индикатора фенолфталеина и по каплям 1%-ный раствор гидроксида натрия до появления розового (не малинового) окрашивания, свидетельствующего о щелочной реакции среды.

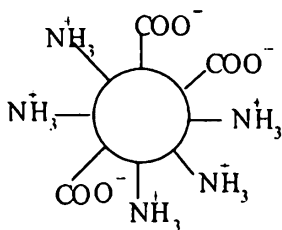
В две другие пробирки наливают по 2...3 см<sup>3</sup> раствора яичного белка. В одну пробирку понемногу наливают раствор из 1-й пробирки и наблюдают за изменением синей окраски. В другую пробирку приливают раствор из 2-й пробирки и наблюдают за исчезновением розовой окраски.

### **9.6. Определение изоэлектрической точки белков**

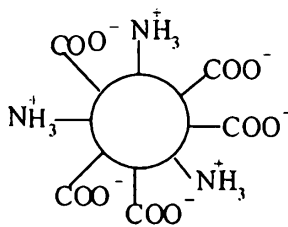
**Краткая теория к работе.** Устойчивость белков в биологических жидкостях организма обусловлена двумя факторами: зарядом и водной оболочкой.

Находящиеся на поверхности белковой молекулы карбоксильные и аминокислотные группы в растворе ионизируются. В результате молекулы белков в биологических жидкостях приобретают одноименный электрический заряд. В зависимости от преобладания кислых (аспарагиновая, глутаминовая) или основных (лизин, аргинин, гистидин) аминокислот белковые частицы существуют в виде поликатионов или в виде полианионов:





поликатион  
(суммарный заряд «+»)



полианион  
(суммарный заряд «-»)

При определенном значении pH среды (для каждого белка не одинаковое) количество ионизированных карбоксильных и аминогрупп уравнивается и белковая молекула становится электронейтральной. Такое состояние называют *изоэлектрической точкой (pI)*. В результате лишены заряда белковые частицы склонны агрегировать и выпадать в осадок.

**Сущность метода.** Изоэлектрическая точка — это важная характеристика белков. Значение pI белка зависит от его аминокислотного состава. Кислые белки имеют pI в слабокислой среде, основные белки — в слабощелочной среде.

Определение изоэлектрической точки заключается в определении значения pH среды, при котором подавляется электролитическая диссоциация карбоксильных и аминогрупп и достигается осаждение белка.

В лабораторных условиях удобным объектом исследования служит раствор яичного белка, который содержит простые и сложные протеины. Основная масса белков яйца относится к классу альбуминов и имеет pI, лежащую в кислой среде при pH 4,6...4,7.

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>;
- раствор исследуемого белка, ацетатные буферные смеси с различным значением pH.

**Ход работы.** Нумеруют пять пробирок и в каждую из них с помощью автоматов наливают по 1 см<sup>3</sup> ацетатной буферной смеси с различным значением pH.

В первую пробирку наливают буферную смесь со значением pH=3,6; во вторую — pH=4,0; в третью — pH=4,6; в четвертую — pH=5,5; в пятую — pH=5,8.

К буферным растворам добавляют по 0,5...1 см<sup>3</sup> яичного белка. Пробирки осторожно встряхивают для перемешивания содержимого и оставляют в покое.

Через несколько минут отмечают изменения в одной из пробирок. Если осаждение белка недостаточно видимо, можно применить простой тест на наличие коагуляции. Для этого на небольшом листе бумаги ручкой проводят жирную линию и смотрят на нее сквозь слой жидкости в каждой из пробирок. Там, где произошло осаждение белка, линия невидима или просматривается с трудом.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Белки, определение. Функции и характерные признаки белков. Элементарный состав белков.
2. Первичная структура белков. Особенности пептидной связи.
3. Вторичная структура белков. Разновидности вторичной структуры.
4. Третьичная структура белков. Связи, стабилизирующие третичную структуру.
5. Четвертичная структура белков. Связи, стабилизирующие четвертичную структуру.
6. Физико-химические свойства белков: амфотерность и буферность; понятие изоэлектрической точки; растворимость и факторы, понижающие растворимость; коллоидные свойства.
7. Классификация белков: по форме молекулы; по химической структуре.
8. Хромопротеины. Представитель — гемоглобин. Строение глобина и гема, условные обозначения гемоглобина. Функции гемоглобина и его производных. Транспорт O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>, эффект Бора, гемоглобиновая буферная система. Миоглобин и цитохромы — представители хромопротеинов.
9. Нуклеопротеины. Нуклеиновые кислоты — небелковая часть нуклеопротеинов. Состав нуклеиновых кислот. Нуклеозиды, нуклеотиды. Первичная структура ДНК и РНК. Вторичная и третичная структуры ДНК и РНК. Типы РНК.
10. Строение и роль адениловых кислот (АМФ, АДФ, АТФ и их аналоги).

## ТЕМА 10. ФЕРМЕНТЫ

### Цель занятия:

- знать химическую природу простых и сложных ферментов, разобраться в механизме их действия;
- изучить основные свойства ферментов; знать о влиянии посторонних веществ, температуры и реакции среды на ферментативную активность;
- разобраться в номенклатуре и классификации ферментов.

### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- исследовать различные свойства ферментов;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 10.1. Сравнение действия ферментов и небиологических катализаторов

**Краткая теория к работе.** Ферменты — это биологические катализаторы белковой природы. Роль ферментов в живой природе нельзя переоценить. И. П. Павлов отмечал, что ферменты «есть возбудители всех химических превращений». Благодаря каталитической функции разнообразные ферменты обеспечивают быстрое протекание в организме или вне его огромного числа химических реакций.

Подобно небелковым катализаторам ферменты ускоряют достижение равновесия в химических процессах, которые протекают сами по себе, но с очень малыми скоростями. Как и катализаторы неорганической природы, биокатализаторы не вызывают каких-либо химических реакций, а лишь ускоряют существующие.

Однако между ферментами и небелковыми катализаторами есть большие отличия. Во-первых, ферменты работают в очень мягких условиях (низкая температура, нормальное давление и т. п.). Во-вто-

рых, для ферментов характерна исключительно высокая каталитическая активность.

Еще Й. Берцелиус (1836) указывал, что для гидролиза крахмала при нагревании в растворе кислоты нужно несколько часов, а при участии соответствующего фермента этот процесс идет при комнатной температуре всего несколько минут. Или другой пример, гидролитический распад белка до аминокислот в присутствии неорганических катализаторов осуществляется десятки часов при температуре 100 °С и выше. Этот же процесс при каталитическом участии специфических ферментов протекает за десятки минут при температуре 30...40 °С.

Основное существенное различие между ферментами и обычными катализаторами заключается в белковой природе и уникальной структуре каждого фермента. Изучение механизма ферментативного действия показало, что ферментативный катализ — это серия элементарных превращений вещества, строго организованных в пространстве и времени. Большое значение при этом имеет эстафетная передача промежуточных продуктов реакции от одного компонента каталитической системы к другому без их высвобождения.

**Сущность метода.** В данной работе сравнивается эффективность гидролиза крахмала при действии разных катализаторов: соляной кислоты и фермента слюны амилазы. Контролем служит проба без катализатора. Остальные условия опыта (температура, продолжительность) одинаковые.

Для оценки степени гидролиза используют реакцию с йодом. Наличие редуцирующих сахаров в пробах обнаруживают реактивом Троммера.

#### **Оборудование и реактивы:**

- цилиндр вместимостью 25 см<sup>3</sup>, стакан химический вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>, коническая колба вместимостью 100 см<sup>3</sup>, пипетка градуированная вместимостью 5 см<sup>3</sup>, пипетки Мора вместимостью 1 см<sup>3</sup>, штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, автомат вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания гидроксида натрия, воронка, фильтр бумажный, вода дистиллированная;
- 1%-ный раствор крахмала, 5%-ный раствор соляной кислоты, раствор йода, 10%-ный раствор гидроксида натрия, глицерин, 1%-ный раствор сульфата меди.

**Ход работы.** Раствор амилазы получают следующим образом. Цилиндром отмеряют 20 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, переносят в хими-

ческий стаканчик вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>. Из стаканчика воду помещают в рот. Через 2...3 минуты раствор амилазы изо рта переносят в тот же стаканчик и фильтруют через складчатый фильтр в коническую колбу вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>.

В три пробирки пипеткой вносят по 2 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора крахмала. Затем с помощью пипеток добавляют в первую пробирку 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, во вторую — 1 см<sup>3</sup> раствора амилазы, в третью — 1 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора соляной кислоты.

Пробирки маркируют, тщательно встряхивают и помещают в термостат при температуре 37...40 °С.

Через 10 минут все три пробирки достают из термостата и охлаждают. Содержимое пробирок делят пополам.

С одной частью проводят реакцию с йодом на крахмал. Если синее окрашивание с йодом не появляется, значит гидролиз крахмала завершен.

С другой частью проводят пробу Троммера на редуцирующие сахара. Для этого в каждую пробирку автоматом вносят по 1 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия, по 3 капли глицерина и по 5 капель 1%-ного раствора сульфата меди. Содержимое пробирок тщательно перемешивают, и пробирки погружают в кипящую водяную баню. Появление красного осадка подтверждает присутствие редуцирующих сахаров, а количество осадка свидетельствует о глубине гидролиза.

## 10.2. Специфичность ферментов

**Краткая теория к работе.** Специфичность — одно из выдающихся качеств ферментов, которые отличают их от небелковых катализаторов.

Специфичность — это способность катализировать лишь определенную реакцию или воздействовать на определенную связь.

Пределы специфичности у разных ферментов различны.

Одни ферменты каталитически ускоряют только одну реакцию. Такую специфичность называют индивидуальной или абсолютной. Например, амилаза расщепляет крахмал, а уреазы гидролизуют мочевину.

Другие ферменты катализируют реакции определенного типа и отличаются групповой специфичностью. Основным признаком ферментов этого типа является характер разрушаемой или создаваемой связи. Например, целая группа протеиназ желудочно-кишечного тракта (пепсин, трипсин, химотрипсин, пептидазы и др.) расщепляет пептидные связи в белках и пептидах.

Некоторые ферменты обладают стереохимической специфичностью, то есть действуют только на один из пространственных изомеров. Например, фумаратгидратаза катализирует присоединение воды к фумаровой кислоте, но не к ее стереоизомеру — малеиновой кислоте.

В лабораторных условиях удобными объектами исследования служат ферменты класса гидролаз. Например, амилаза, которая вырабатывается у человека в ротовой полости околоушными, подчелюстными и подъязычными железами и выделяется вместе со слюной. Или другой фермент — сахараза, продуцируемая дрожжевыми клетками.

**Сущность метода.** Ферменты амилаза и сахараза относятся к классу гидролаз и расщепляют гликозидные связи с присоединением молекулы воды. Оба фермента обладают абсолютной специфичностью. Амилаза гидролизует крахмал до мальтозы, а сахараза расщепляет сахарозу до глюкозы и фруктозы.

Мальтоза и глюкоза — редуцирующие сахара. Их присутствие в растворе можно обнаружить по реакции Троммера.

#### **Оборудование и реактивы:**

- цилиндр вместимостью 25 см<sup>3</sup>, стакан химический вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>, коническая колба вместимостью 100 см<sup>3</sup>, воронка, пипетка градуированная вместимостью 5 см<sup>3</sup>, пипетки Мора вместимостью 1 см<sup>3</sup>, штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, автоматы вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания гидроксида натрия и сахаразы, термостат, водяная баня, электрическая плитка, фильтр бумажный, вода дистиллированная;
- 1%-ный раствор крахмала, 1%-ный раствор сахарозы, 1%-ный раствор сахаразы, 10%-ный раствор гидроксида натрия, глицерин, 1%-ный раствор сульфата меди.

**Ход работы.** Раствор амилазы готовят так же, как в работе 10.1. Раствор сахаразы получают путем разведения сухих дрожжей в воде.

Далее маркируют четыре пробирки, в которые по следующей схеме автоматом и пипетками вносят:

1-я пробирка: 5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора крахмала и 1 см<sup>3</sup> раствора амилазы;

2-я пробирка: 5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора крахмала и 1 см<sup>3</sup> раствора сахаразы;

3-я пробирка: 5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора сахарозы и 1 см<sup>3</sup> раствора амилазы;

4-я пробирка: 5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора сахарозы и 1 см<sup>3</sup> раствора сахаразы.

Пробирки тщательно встряхивают и выдерживают в термостате при температуре 37...40 °С в течение 20 минут.

По истечении указанного времени все четыре пробирки достают из термостата и проводят в них пробу Троммера — качественная реакция на редуцирующие сахара. Для этого в каждую пробирку автоматом вносят по 1 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия, по 3 капли глицерина и по 5 капель 1%-ного раствора сульфата меди. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и пробирки погружают в кипящую водяную баню.

Через несколько минут в некоторых пробирках появляется красный осадок. Это свидетельствует о наличии редуцирующих сахаров и о том, что в этих пробирках проходил гидролиз углеводов.

### 10.3. Термолабильность ферментов

**Краткая теория к работе.** Ферменты, являясь белками, обладают всеми их свойствами. В частности, активность ферментов зависит от температуры окружающей среды. Чувствительность ферментов к температуре называют *термолабильностью*.

Как правило, ферменты наиболее активны в небольшом интервале температур. Для ферментов организма животных и человека это промежуток от 36 до 40 °С. Пик активности фермента называют температурным оптимумом ( $t_{\text{опт}}$ ). У каждого фермента температурный оптимум имеет свое определенное значение.

Зависимость каталитической активности фермента от температуры выражается типичной кривой (рис. 9).

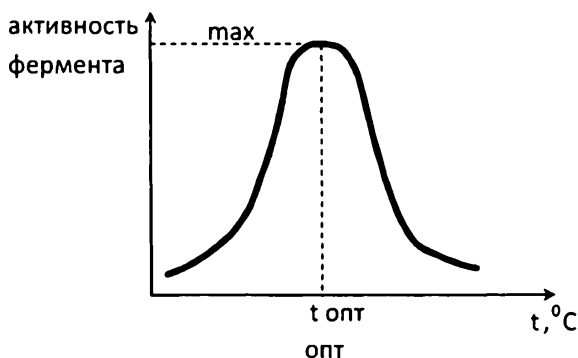


Рис. 9. Зависимость каталитической активности фермента от температуры

По характеру кривой видно, что, с одной стороны, с увеличением температуры до некоторого значения повышается скорость ферментативной реакции. Это объясняется тем, что температура влияет на скорость реакции образования фермент-субстратного комплекса и последующие этапы преобразования субстрата. В среднем при повышении температуры на 1 °С скорость реакции возрастает примерно на 20% [29]. Это имеет большое физиологическое значение при различных воспалительных процессах в организме, так как с увеличением температуры активизируются биохимические процессы, катализируемые ферментами.

В то же время, с другой стороны, при слишком высоких значениях температуры белковая часть фермента денатурирует. Такой критической температурой для большинства ферментов является 40...50 °С.

С уменьшением температуры до 0 °С активность действия ферментов падает до нулевой отметки. Однако в этом случае фермент не разрушается, а инактивируется и при повышении температуры до оптимального значения восстанавливает свои свойства.

Таким образом, инактивировать ферменты можно выдержкой при высоких температурах или глубоким охлаждением, если требуется сохранить свойства ферментов в дальнейшем.

Знание термолабильности ферментов широко применяется при заготовках кормов, хранении продуктов животноводства, в медицинской и ветеринарной практике, фармацевтических, пищевых и других технологиях.

**Сущность метода.** В данной работе термолабильность ферментов изучают на примере амилазы, которая расщепляет крахмал. Качественной реакцией на крахмал служит проба с йодом. По мере ступенчатого гидролиза крахмала под действием амилазы синее окрашивание с йодом исчезает.

Амилаза вырабатывается в ротовой полости человека и животных и должна проявлять максимальную активность при температуре их тела.

Одновременно проверяют интенсивность гидролиза крахмала амилазой при двух других температурных режимах: охлаждении до 0 °С и при кипячении.

#### **Оборудование и реактивы:**

- цилиндр вместимостью 25 см<sup>3</sup>, стакан химический вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>, коническая колба вместимостью 100 см<sup>3</sup>, пипетки градуированные вместимостью 1 и 5 см<sup>3</sup>, штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, термостат, бани водяные



с температурами 0 и 100 °С, палетка, автомат вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания гидроксида натрия, воронка, фильтр бумажный, вода дистиллированная;

- 1%-ный раствор крахмала, раствор йода, 10%-ный раствор гидроксида натрия, глицерин, 1%-ный раствор сульфата меди.

**Ход работы.** Раствор амилазы готовят так же, как в работе 10.1.

В три пробирки пипеткой вносят по 5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора крахмала. Далее пробирки маркируют, и одну из них помещают в ледяную баню, другую — в термостат при температуре 37 °С, третью — в кипящую водяную баню.

Через 10 минут, не вынимая пробирки из бань, в каждую вносят пипеткой по 1 см<sup>3</sup> раствора амилазы. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и оставляют их в тех же температурных условиях.

Контроль гидролиза крахмала проводят по пробе с йодом. Для этого в несколько ячеек палетки вносят по одной капле дистиллированной воды и по одной капле йода. Из пробирки, которая находится в оптимальных условиях, через 1...2 минуты после добавления раствора амилазы пипеткой отбирают одну каплю исследуемой смеси и вносят в ячейку палетки с приготовленным раствором йода. Наблюдают за изменением окрашивания. Пробирку из бани при этом доставать не следует.

Такие пробы повторяют каждые 2...3 минуты до тех пор, пока йод не перестанет менять окрашивание после внесения исследуемой смеси. Это свидетельствует об окончании гидролиза крахмала в пробирке при оптимальной температуре 37 °С.

Когда закончится гидролиз крахмала в пробирке с оптимальными условиями, все три пробирки достают из бань и проводят в них пробу Троммера: в каждую пробирку автоматом вносят по 1 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия, по 3 капли глицерина и по 5 капель 1%-ного раствора сульфата меди. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и погружают пробирки в кипящую водяную баню.

Наличие красного осадка в некоторых пробирках свидетельствует о том, что в них прошел гидролиз. По количеству красного осадка можно судить о глубине гидролиза.

#### **10.4. Влияние рН среды на активность ферментов**

**Краткая теория к работе.** Ферменты, как и любые белки, чувствительны к значению рН среды. Причем влияние концентрации водородных ионов (Н<sup>+</sup>) на активность ферментов многопланово.

Во-первых, водородные ионы воздействуют на активный центр фермента. При различных значениях pH в реакционной среде активный центр может быть слабее или сильнее ионизирован, больше или меньше экранирован соседними с ним группами.

Во-вторых, концентрация водородных ионов влияет на состояние белковой части фермента, определяя соотношение в нем анионных и катионных групп, что сказывается на третичной структуре. Как известно, именно при формировании третичной структуры фермента образуются активные центры фермента.

В-третьих, pH среды влияет на степень ионизации субстрата, фермент-субстратного комплекса и продуктов реакции.

Для каждого фермента существует свое оптимальное значение pH среды ( $\text{pH}_{\text{опт}}$ ), при котором его активность максимальна. Например, амилаза наиболее активна при pH 6,8...7,0, а пепсин — при pH 1,5...2,5.

Изменение pH в кислую или щелочную сторону сопровождается более или менее равномерным падением активности фермента, как показано на рис. 10.

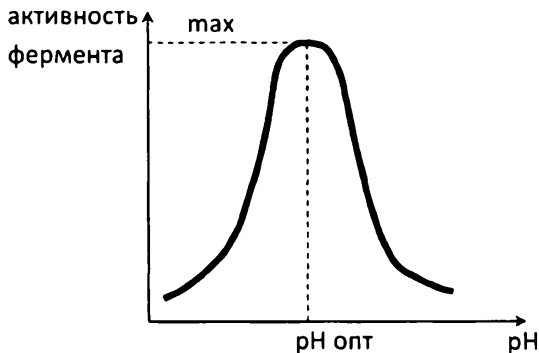


Рис. 10. Зависимость активности фермента от pH

**Сущность метода.** Влияние pH на активность ферментов изучают в модельных опытах с кислой, нейтральной и щелочной средой. Объектом исследования служит амилаза, специфичная по отношению к крахмалу.

Амилаза вырабатывается в ротовой полости, где нейтральная или слабокислая среда. Предполагается, что максимальную активность амилаза будет проявлять в привычных условиях. Поэтому пробы исследуемой смеси для контроля с йодом отбирают из пробирки с нейтральным значением pH среды.

**Оборудование и реактивы:**

- цилиндр вместимостью 25 см<sup>3</sup>, стакан химический вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>, коническая колба вместимостью 100 см<sup>3</sup>, воронка, пипетка градуированная вместимостью 5 см<sup>3</sup>, автоматы вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания буферных смесей, штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, термостат, палетка, фильтр, вода дистиллированная;
- 1%-ный раствор крахмала, фосфатные буферные смеси с pH 5,0, 6,8 и 8,1, раствор йода.

**Ход работы.** Раствор амилазы готовят так же, как в работе 10.1.

Далее нумеруют три пробирки. В каждую из них с помощью центрифужных пробирок вносят по 5 см<sup>3</sup> фосфатной буферной смеси с различным значением pH. В 1-ю пробирку вносят фосфатную буферную смесь с pH 5,0; во 2-ю пробирку — с pH 6,8; в 3-ю пробирку — с pH 8,1.

Затем в каждую пробирку добавляют соответствующими пипетками по 3 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора крахмала и по 1 см<sup>3</sup> раствора амилазы. Содержимое в пробирках тщательно перемешивают и помещают их в термостат при оптимальной температуре 37 °С.

Контроль гидролиза крахмала проводят по пробе с йодом. Для этого в несколько ячеек палетки вносят по одной капле дистиллированной воды и по одной капле йода.

Из пробирки, в которой находится фосфатная буферная смесь с pH 6,8, через 1...2 минуты после добавления раствора амилазы пипеткой отбирают одну каплю исследуемой смеси и вносят в ячейку палетки с приготовленным раствором йода. Наблюдают за изменением окрашивания. Пробирку из термостата при этом доставать не следует.

Такие пробы повторяют каждые 2...3 минуты до тех пор, пока йод не перестанет менять окрашивание после внесения исследуемой смеси. Это свидетельствует об окончании гидролиза крахмала в пробирке с оптимальным для амилазы значением pH 6,8.

Чтобы проверить ход гидролиза при других значениях pH, во все три пробирки вносят по 1...2 капле раствора йода и сравнивают окрашивание в них.

## 10.5. Влияние посторонних веществ на активность ферментов

Краткая теория к работе. Ферменты чувствительны к наличию в окружающей среде различных посторонних веществ. В целом посторонние вещества видоизменяют либо белковую часть фермента, либо его активный центр настолько, что катализируемая реакция ускоряется или замедляется. Поэтому все посторонние вещества можно разделить на две большие группы: *активаторы* — ускоряют скорость ферментативной реакции и *ингибиторы* — тормозят действие ферментов.

Нередко одни и те же вещества могут быть активаторами для одних ферментов и ингибиторами для других. Например, соляная кислота активизирует действие пепсина, но угнетает действие амилазы.

Часто активаторами ферментов являются катионы многих металлов ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $K^+$  и др.) и некоторые анионы, например  $Cl^-$ .

Действие ингибиторов может быть специфичным и неспецифичным.

Специфичное ингибирование означает, что вещество подавляет определенный фермент. Например, действие эластазы, выделяемой легкими блокируется ингибитором белковой природы — антитрипсином, который используется для лечения эмфиземы легких.

Неспецифичные ингибиторы действуют на любые ферменты. Например, ионы тяжелых металлов ( $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) являются неспецифичными ингибиторами, так как приводят к необратимой денатурации белковой части любого фермента.

Ингибирование может быть *обратимым*, если после удаления постороннего вещества активность фермента восстанавливается. В противном случае, если удаление постороннего вещества не приводит к восстановлению активности фермента, ингибирование называют *необратимым*.

Кроме этого ингибирование может быть *конкурентным* и *неконкурентным*. При конкурентном ингибировании постороннее вещество и субстрат имеют пространственное сходство и конкурируют за активный центр фермента. Эффект от конкурентного ингибитора можно снизить, увеличивая концентрацию субстрата, так как в этом случае возрастает вероятность связывания фермента с субстратом. При неконкурентном ингибировании постороннее вещество взаимодействует с белковой частью либо с регуляторным центром, вследствие чего фермент теряет активность. При таком ингибировании влияние постороннего вещества не может быть преодолено повышением концентрации субстрата.

**Сущность метода.** Влияние посторонних веществ на активность ферментов изучают в опытах при гидролизе крахмала амилазой. В качестве посторонних веществ используют хлорид натрия ( $\text{NaCl}$ ) и сульфат меди ( $\text{CuSO}_4$ ). Контролем служит вода.

Достоверно известно, что ионы тяжелых металлов, в частности ионы меди, являются неспецифическими ингибиторами ферментов. Значит, в пробе с сульфатом меди гидролиз крахмала не может происходить. Из некоторых литературных данных известно, что анионы хлора являются активаторами амилазы, поэтому за ходом гидролиза наблюдают в пробирке с хлоридом натрия.

**Оборудование и реактивы:**

- цилиндр вместимостью  $25 \text{ см}^3$ , стакан химический вместимостью  $50...100 \text{ см}^3$ , коническая колба вместимостью  $100 \text{ см}^3$ , воронка, пипетки градуированные вместимостью  $1$  и  $5 \text{ см}^3$ , автоматы вместимостью  $1 \text{ см}^3$  для отмеривания посторонних веществ, штатив для пробирок, пробирки вместимостью  $10 \text{ см}^3$ , термостат, палетка, фильтр, вода дистиллированная;
- 1%-ный раствор крахмала, 1%-ный раствор хлорида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди, раствор йода.

**Ход работы.** Раствор амилазы готовят так же, как в работе 10.1.

Далее в три пробирки вносят пипеткой по  $3 \text{ см}^3$  1%-ного раствора крахмала. С помощью автоматов в первую пробирку добавляют  $1 \text{ см}^3$  дистиллированной воды, в другую —  $1 \text{ см}^3$  1%-ного раствора хлорида натрия, в третью —  $1 \text{ см}^3$  1%-ного раствора сульфата меди. Пробирки маркируют соответствующим образом и в каждую из них пипеткой вносят по  $1 \text{ см}^3$  раствора амилазы. Содержимое в пробирках тщательно перемешивают и погружают их в термостат с оптимальной температурой  $37^\circ\text{C}$ .

Контроль гидролиза крахмала проводят по пробе с йодом. Для этого в несколько ячеек палетки вносят по одной капле дистиллированной воды и по одной капле йода.

Из пробирки, в которую добавлен раствор хлорида натрия, через  $1...2$  минуты после внесения раствора амилазы пипеткой отбирают одну каплю исследуемой смеси и переносят в ячейку палетки с приготовленным раствором йода. Наблюдают за изменением окрашивания. Пробирку из термостата при этом доставать не следует.

Такие пробы повторяют каждые  $2...3$  минуты до тех пор, пока йод не перестанет менять окрашивание после внесения исследуемой смеси. Это свидетельствует об окончании гидролиза крахмала в пробирке

с анионами хлора. Чтобы проверить ход гидролиза в других условиях, во все три пробирки вносят по 1...2 капле раствора йода и сравнивают окрашивание в них.

### **10.6. Изучение скорости ферментативной реакции в зависимости от количества фермента**

**Краткая теория к работе.** Схему ферментативного катализа можно описать следующим уравнением:



где F — фермент, S — субстрат, FS — ферментсубстратный комплекс, P — продукт реакции. Каждая стадия этого процесса характеризуется определенной скоростью и зависит от ряда факторов.

К ним относят химическую природу фермента и субстрата и условия их взаимодействия. Однако такие факторы, как температура, pH среды, активаторы и ингибиторы, влияют на скорость ферментативных реакций, поскольку вызывают изменения свойств ферментов как белковых тел. Поэтому при изучении кинетики ферментативных реакций учитывают главным образом концентрации реагирующих веществ и создают стандартные условия. Во-первых, это оптимальное для данного фермента значение pH среды. Во-вторых, рекомендуется придерживаться температуры 25 °С в тех случаях, где это возможно. В-третьих, что особенно важно, достигают полного насыщения фермента субстратом.

Скорость ферментативной реакции, измеренной при соблюдении перечисленных условий, называют максимальной скоростью ферментативной реакции.

За единицу любого фермента принимается то его количество, которое катализирует превращение одного микромоля субстрата в минуту в заданных оптимальных условиях (1 мкмоль/мин). Однако если субстратом служит белок, полисахарид или другая молекула, в которой фермент атакует более одной связи, то мерой скорости реакции считается число катализируемых связей, а не общее число вступивших в реакцию молекул.

**Сущность метода.** Скорость ферментативной реакции зависит от концентрации фермента, субстрата и их сродства.

Зависимость скорости ферментативной реакции от количества фермента изучают при действии амилазы на крахмал. В работе следует убедиться, что с увеличением концентрации амилазы в опытной пробе возрастает скорость гидролиза крахмала.

Различные концентрации амилазы получают методом разведений.

**Оборудование и реактивы:**

- цилиндр вместимостью 25 см<sup>3</sup>, стакан химический вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>, коническая колба вместимостью 100 см<sup>3</sup>, воронка, пипетки градуированные вместимостью 1 и 5 см<sup>3</sup>, штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, палетка, термостат, фильтр, вода дистиллированная;
- 1%-ный раствор крахмала, раствор йода.

**Ход работы.** Исходный раствор амилазы готовят так же, как в работе 10.1.

Контроль гидролиза крахмала проводят по пробе с йодом. Для этого в несколько ячеек палетки вносят по одной капле дистиллированной воды и по одной капле йода.

Затем готовят растворы амилазы с разной концентрацией. После добавления воды содержимое каждой пробирки тщательно перемешивают:

1-я пробирка: 1 см<sup>3</sup> исходного раствора амилазы (разведение 1:1);

1-я пробирка: 1 см<sup>3</sup> исходного раствора амилазы и 1 см<sup>3</sup> воды (разведение 1:2);

3-я пробирка: 1 см<sup>3</sup> смеси из 2-й пробирки и 1 см<sup>3</sup> воды (разведение 1:4);

4-я пробирка: 1 см<sup>3</sup> смеси из 3-й пробирки и 1 см<sup>3</sup> воды (разведение 1:8).

Далее 1 см<sup>3</sup> смеси из 4-й пробирки выбрасывают.

Затем в каждую пробирку, начиная с последней, быстро вносят пипеткой по 5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора крахмала. Пробирки помещают в термостат или водяную баню с температурой 25 °С и замечают начало опыта ( $t_0$ ).

Через 1...2 минуты из 1-й пробирки, где концентрация амилазы максимальна, пипеткой отбирают одну каплю исследуемой смеси и вносят в ячейку палетки с приготовленным раствором йода. Пробирку из бани при этом доставать не следует.

Такие пробы повторяют каждые 2...3 минуты. Когда йод перестанет менять окрашивание после внесения исследуемой смеси, замечают время ( $t_1$ ) окончания гидролиза крахмала в 1-й пробирке.

Пипетку переносят во 2-ю пробирку, контролируют гидролиз крахмала по пробе с йодом и записывают время ( $t_2$ ) окончания гидролиза крахмала во 2-й пробирке.

Затем последовательно проводят те же операции с 3-й и 4-й пробирками и записывают время окончания гидролиза крахмала в них ( $t_3$  и  $t_4$ ).

По полученным данным строят график зависимости продолжительности гидролиза крахмала от концентрации (разведения) амилазы.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Определение и химическая природа ферментов (простые и сложные).
2. Три стадии ферментативного катализа. Схема взаимодействия с субстратом: теории Фишера и Кошленда.
3. Специфичность ферментативного действия. Виды специфичности. Примеры.
4. Термолабильность ферментов.
5. Чувствительность ферментов к значению pH среды.
6. Зависимость ферментов от посторонних веществ. Активаторы и ингибиторы ферментов. Виды ингибирования.
7. Номенклатура и классификация ферментов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы.
8. Коферменты НАД, НАДФ: строение и активный центр.
9. Кофермент ФАД: строение и активный центр.
10. Кофермент А: строение и активный центр.



## ТЕМА 11. ВИТАМИНЫ

### Цель занятия:

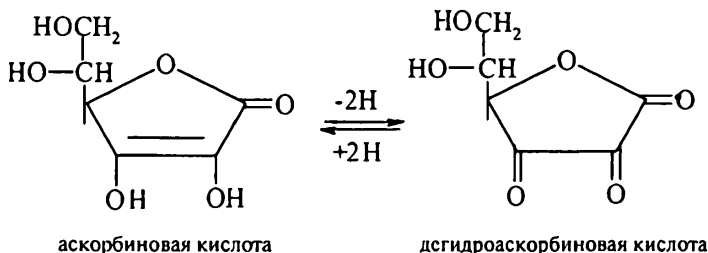
- разобраться в основных понятиях и классификации витаминов;
- знать биологическую роль, авитаминоз и источники водорастворимых витаминов.

### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- определить массовую долю витамина С в молоке и в растительных кормах;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 11.1. Определение массовой доли витамина С в кормах и молоке

**Краткая теория к работе.** Аскорбиновая кислота или витамин С относится к водорастворимым витаминам. По своему строению это лактон гексоновой кислоты. Благодаря наличию двух енольных гидроксильных групп в своей молекуле аскорбиновая кислота обладает сильным кислотным характером и может существовать в двух формах:



Особенности строения обуславливают участие аскорбиновой кислоты во множестве окислительно-восстановительных процессов в организме. Витамин С играет большую роль в обмене белков, углеводов и жиров в тканях; участвует в синтезе дезоксирибонуклеиновой кислоты и образовании стероидных оксигормонов надпочечников, в образовании дентина и коллагена, а также межклеточных веществ хряща и кости. Витамин С активирует функции других витаминов и многие процессы в тканях.

Синтез аскорбиновой кислоты может происходить у всех видов животных, кроме морских свинок, обезьян и человека.

В организме человека и животных аскорбиновая кислота находится в виде биохимических комплексов с белками. В этом состоянии она является более устойчивой, но менее активной. При гипо- и авитаминозах белки крови связывают значительно больше аскорбиновой кислоты, чем в норме.

Содержание аскорбиновой кислоты в плазме крови равно примерно 1 мг%. Рекомендуется судить о насыщенности организма аскорбиновой кислотой по содержанию ее в лейкоцитах. У здорового человека содержание аскорбиновой кислоты в лейкоцитах равно 25...40 мг%.

Недостаток витамина С вызывает цингу, которую раньше называли скорбут (отсюда другое название витамина — аскорбиновая кислота). При цинге повышается проницаемость сосудов, возникают кровотечения и кровоизлияния различного характера.

Источниками витамина С являются растительные продукты. В больших количествах аскорбиновая кислота содержится в шиповнике, черной смородине, апельсинах, лимонах, ягодах рябины и др.

Витамин С — один из самых нестойких витаминов. При хранении овощей и фруктов он легко разрушается под действием кислорода воздуха и особенно в присутствии катионов меди и железа. Витамин чувствителен к высокой температуре, особенно в щелочной среде, а в кислой среде не разрушается даже при кипячении. Высушивание кормовых и пищевых продуктов при повышенной температуре заметно снижает в них содержание витамина С. Потери аскорбиновой кислоты при тепловой обработке могут достигать 60%. Однако в засилосованных кормах и заквашенных продуктах он хорошо сохраняется.

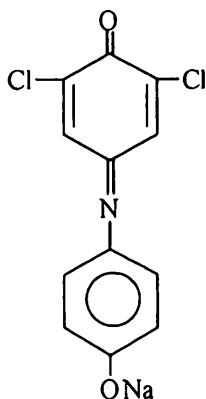
Окислительно-восстановительные способности аскорбиновой кислоты лежат в основе различных методов ее определения. Аскорбиновая кислота в определенных условиях может восстанавливать такие

вещества, как железосинеродистый калий, метиленовую синь, молекулярный йод, 2, 6-дихлорфенолиндофенол и др.

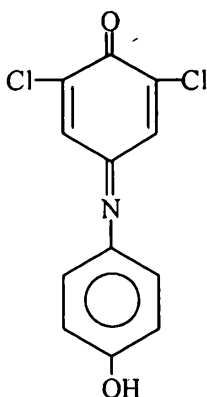
Подготовка различных объектов для определения витамина С несколько отличается. Растительные образцы измельчают в присутствии соляной кислоты, которая защищает аскорбиновую кислоту от разрушения. Из протертой массы получают водную вытяжку и используют для титрования. При исследовании молока определению аскорбиновой кислоты препятствуют белки. Поэтому сначала получают безбелковый фильтрат, осажая белки молока насыщенными растворами шавелевой кислоты и хлорида натрия.

Точность анализа во многом зависит от быстроты подготовки образцов, поскольку при растирании материала, осаждении белков и последующих операциях аскорбиновая кислота может легко окисляться. Существуют способы определения и окисленной формы витамина С — дегидроаскорбиновой кислоты, но это значительно усложняет и удлиняет проведение анализа.

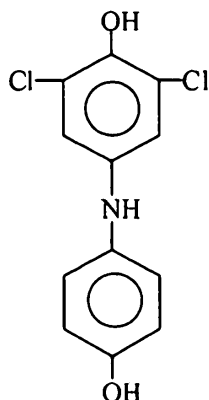
**Сущность метода.** При определении витамина С используется индикатор 2, 6-дихлорфенолиндофенол. Он по-разному окрашен в зависимости от pH среды. В щелочной среде 2, 6-дихлорфенолиндофенол имеет синюю окраску, в кислой — розовую, а при восстановлении обесцвечивается:



синий  
(щелочная среда)

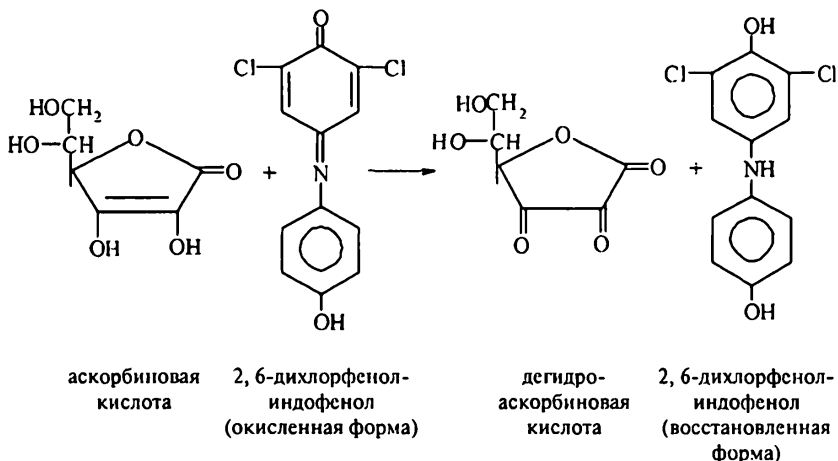


розовый  
(кислая среда)



бесцветный  
(нейтральная среда)

Количественный метод определения основан на способности аскорбиновой кислоты окисляться и восстанавливать при этом индикатор 2, 6-дихлорфенолиндофенол:



При количественном определении витамина С исследуемый раствор, подкисленный соляной кислотой, титруют щелочным раствором 2, 6-дихлорфенолиндофенола. Пока в титруемом растворе присутствует аскорбиновая кислота, приливаемый щелочной раствор 2, 6-дихлорфенолиндофенола будет обесцвечиваться за счет образования восстановленной формы.

Как только вся присутствующая в растворе аскорбиновая кислота окислится и титрование достигнет точки эквивалентности, титруемый раствор приобретает розовую окраску за счет образования недиссоциированных молекул 2,6-дихлорфенолиндофенола в кислой среде.

#### Оборудование и реактивы:

- весы лабораторные технические, ступка с пестиком, пипетка градуированная вместимостью 10 см<sup>3</sup>, пипетка Мора вместимостью 5 см<sup>3</sup>, мерная колба вместимостью 50 см<sup>3</sup>, бюретка вместимостью 10 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,05 см<sup>3</sup>, воронка, фильтр бумажный, вода дистиллированная;
- 1%-ный раствор соляной кислоты, насыщенный раствор щавелевой кислоты, насыщенный раствор хлорида натрия, раствор 2, 6-дихлорфенолиндофенола с эквивалентной концентрацией 0,001 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы. 1. Исследование кормов.** На технических весах отвешивают 1 г растительного материала, переносят в ступку и раздавливают пестиком. Затем к размятой массе из бюретки приливают 5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора соляной кислоты и продолжают растирание до образования гомогенной смеси, не содержащей волокон или комочков.

Полученную массу через воронку переносят в мерную колбу вместимостью 50 см<sup>3</sup>. Ступку и пестик смывают из бюретки 20 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора соляной кислоты, а затем небольшим количеством дистиллированной воды. Промывные воды также переносят в мерную колбу, объем которой доводят до метки дистиллированной водой. Колбу закрывают пробкой и несколько раз переворачивают для перемешивания раствора. Затем содержимое мерной колбы фильтруют через складчатый фильтр в коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>.

Далее в две конические колбы вместимостью 50 см<sup>3</sup> пипеткой Мора вносят по 10 см<sup>3</sup> фильтрата. Содержимое этих колб титруют из бюретки раствором 2, 6-дихлорфенолиндофенола с эквивалентной концентрацией 0,001 моль/дм<sup>3</sup> до появления розовой окраски. Для расчетов используют средние данные двух опытов.

Содержание витамина С в кормах рассчитывают по формуле:

$$W = \frac{V_{\text{и}} \cdot V_{\text{э}} \cdot T \cdot 0,088}{V_{\text{ф}} \cdot m} \cdot 1000$$

где  $W$  — содержание витамина С в кормах, мг/кг;

$V_{\text{и}}$  — объем раствора индикатора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованного на титрование фильтрата, см<sup>3</sup>;

$V_{\text{э}}$  — общий объем солянокислого экстракта, см<sup>3</sup>;

$T$  — поправочный коэффициент к титру индикатора;

0,088 — масса витамина С, соответствующая 1 см<sup>3</sup> раствора 2, 6-дихлорфенолиндофенола с эквивалентной концентрацией 0,001 моль/дм<sup>3</sup>, мг;

$V_{\text{ф}}$  — объем фильтрата, взятый для исследования, см<sup>3</sup>;

$m$  — масса растительного образца, г;

1000 — коэффициент пересчета на 1 кг корма.

**2. Исследование молока.** В коническую колбу вместимостью 250 см<sup>3</sup> пипетками приливают 50 см<sup>3</sup> молока, 4 см<sup>3</sup> насыщенного раствора щавелевой кислоты и 10 см<sup>3</sup> насыщенного раствора хлорида натрия. После внесения каждого реактива содержимое колбы перемешивают.

Спустя 3...5 минут пробу фильтруют через складчатый фильтр в коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>.

Пипеткой переносят 25 см<sup>3</sup> полученного фильтрата в другую коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> и титруют из бюретки раствором 2, 6-дихлорфенолиндофенола с эквивалентной концентрацией 0,001 моль/дм<sup>3</sup> до появления розовой окраски.

Содержание витамина С в молоке рассчитывают по формуле:

$$W = \frac{V_{\text{н}} \cdot V_{\text{э}} \cdot T \cdot 0,088}{V_{\text{ф}} \cdot V_{\text{м}} \cdot \rho_{\text{м}}} \cdot 1000,$$

где  $W$  — содержание витамина С в молоке, мг/кг;

$V_{\text{н}}$  — объем раствора индикатора 2, 6-дихлорфенолиндофенола, израсходованного на титрование фильтрата, см<sup>3</sup>;

$V_{\text{э}}$  — общий объем анализируемой жидкости после прибавления реактивов, в данном случае 64 см<sup>3</sup>;

$T$  — поправочный коэффициент к титру индикатора;

0,088 — масса витамина С, соответствующая 1 см<sup>3</sup> раствора 2, 6-дихлорфенолиндофенола с эквивалентной концентрацией 0,001 моль/дм<sup>3</sup>, мг;

$V_{\text{ф}}$  — объем фильтрата, взятый для исследования, см<sup>3</sup>;

$V_{\text{м}}$  — объем молока, соответствующий взятому фильтрату, в данном случае 19,5 см<sup>3</sup>;

$\rho_{\text{м}}$  — плотность молока, г/см<sup>3</sup> (при 20 °С  $\rho_{\text{м}} = 1,028...1,032$  г/см<sup>3</sup>);

1000 — коэффициент пересчета на 1 кг молока.

### Вопросы для самоконтроля

1. Определение, общие свойства витаминов, их классификация.
2. Понятия: авитаминоз, гипо- и гипervитаминоз. Их причины. Авитамины.
3. Строение, биологическая функция, авитаминоз и источники витаминов: витамин А (антиксерофтальмический; ретинол), витамин D (антирахитический; кальциферол), витамин Е (антистерильный; токоферол), витамин F (полиненасыщенные кислоты), витамин К (антигеморрагический; филлохинон), витамин В<sub>1</sub> (антиневритный; тиамин), витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин), витамин В<sub>3</sub> (пантотеновая кислота), витамин В<sub>5</sub> (антипеллагрический; никотинамид), витамин В<sub>6</sub> (адермин; пиридоксин), витамин В<sub>9</sub> (фолиевая кислота), витамин В<sub>12</sub> (антианемический; кобаламин), витамин С (антицинготный; аскорбиновая кислота).

## ТЕМА 12. ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

### Цель занятия:

- разобраться в процессах переваривания и всасывания углеводов;
- изучить основные этапы промежуточного обмена углеводов (синтез гликогена, анаэробное и аэробное окисление глюкозы), уметь писать соответствующие уравнения реакций;
- разобраться в вопросах регуляции и патологии углеводного обмена.

### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- провести исследования ферментативного расщепления углеводов;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

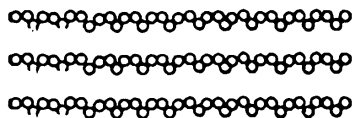
### 12.1. Исследование переваримости крахмала и клетчатки ферментами слюны

**Краткая теория к работе.** Крахмал и клетчатка относятся к несахароподобным полисахаридам. Это природные высокомолекулярные вещества, представляющие собой продукты конденсации большого числа молекул моносахаридов.

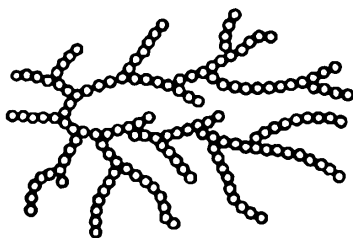
Несмотря на то, что крахмал и клетчатка принадлежат к одному классу соединений, они очень отличаются по своим физико-химическим свойствам.

Крахмал — самый распространенный в природе полисахарид, играющий роль резервного продукта многих растений. В крахмале обнаружены два полисахарида — амилоза (20...30%) и амилопектин (70...80%). Они построены из остатков  $\alpha$ -глюкозы (см. работу 7.5). Имея одинаковый химический состав, амилоза и амилопектин раз-

личаются пространственным строением. Молекулы амилозы построены линейно и состоят из 1000...6000 остатков  $\alpha$ -глюкозы. Молекулы амилопектина содержат до 6000 остатков  $\alpha$ -глюкозы и имеют разветвленную структуру:



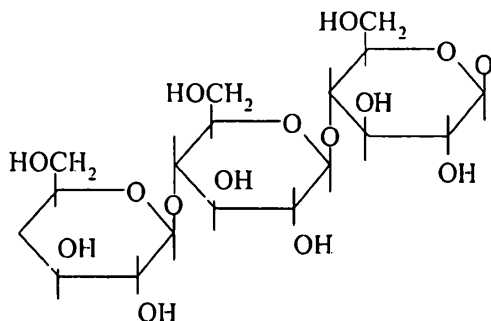
амилоза



амилопектин

Клетчатка — основной компонент стенок растительных клеток. Она содержится в древесине, оболочках некоторых плодов (например, семян подсолнечника). Хлопковая вата, тополиный пух или фильтровальная бумага могут служить образцами практически чистой клетчатки.

Макромолекулы клетчатки, или целлюлозы (от лат. *cellula* — клетка), состоят из 2000...3000 остатков  $\beta$ -глюкозы и имеют линейное строение:



Из таких длинных цепей образуются пучки. Макромолекулы клетчатки в них удерживаются друг около друга благодаря множественным межмолекулярным водородным связям между гидроксильными группами. Пучки сплетены в микроволокна, видимые глазом.



Еще большие отличия между крахмалом и клетчаткой в их свойствах.

Крахмал не растворим в холодной воде, но в горячей воде образует коллоидный раствор — крахмальный клейстер. Крахмал легко гидролизуется при нагревании с разбавленными минеральными кислотами.

Клетчатка — химически инертное вещество. Она не растворима в воде, спирте, эфире, ацетоне и других растворителях. Клетчатка труднее, чем крахмал, подвергается гидролизу, который протекает в присутствии кислот лишь при длительном кипячении, иногда под давлением. Промежуточными продуктами ее гидролиза являются амилоид и целлобиоза.

**Сущность метода.** Крахмал и клетчатка (целлюлоза) — это полисахариды, которые состоят из повторяющихся глюкозных единиц. Крахмал содержит  $\alpha$ -связанные, а клетчатка —  $\beta$ -связанные остатки глюкозы.

Для человека и плотоядных животных крахмал является важным пищевым веществом. Под действием амилазы слюны или амилазы поджелудочной железы он расщепляется до дисахарида мальтозы, из которой образуется конечный продукт гидролиза —  $\alpha$ -глюкоза.

Однако ферменты, гидролизующие крахмал, не расщепляют  $\beta$ -гликозидные связи клетчатки. Вот почему клетчатка кормов у плотоядных практически не усваивается.

У травоядных животных расщепление клетчатки происходит в пищеварительном тракте при помощи ферментов бактериального происхождения. Они выделяются колониями микроорганизмов, населяющих преджелудки у жвачных, слепую кишку у лошадей, кроликов и свиней.

#### **Оборудование и реактивы:**

- цилиндр вместимостью 25 см<sup>3</sup>, стакан химический вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>, коническая колба вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>, воронка, пипетки градуированные вместимостью 1 и 5 см<sup>3</sup>, штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, палетка, автоматы вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания раствора гидроксида натрия, фильтр бумажный, вода дистиллированная;
- 1%-ный раствор крахмала, раствор йода, 10%-ный раствор гидроксида натрия, глицерин, 10%-ный раствор сульфата меди.

**Ход работы.** Сначала готовят раствор амилазы. Для этого цилиндром отмеряют 20 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, переносят их в химический стаканчик вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>. Из стаканчика воду помещают в рот. Через 2...3 минуты раствор амилазы изо рта переносят

в тот же стаканчик и фильтруют через складчатый фильтр в коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>.

Одновременно готовят палетку с раствором йода для контроля гидролиза крахмала. Для этого в несколько ячеек палетки вносят по капле дистиллированной воды, добавляя в каждую по капле раствора йода.

Берут две пробирки вместимостью 15...20 см<sup>3</sup> и маркируют под номерами 1 и 2. В 1-ю пробирку помещают 5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора крахмала и 1 см<sup>3</sup> раствора амилазы. Во 2-ю пробирку вносят небольшой кусочек целлюлозы (можно использовать кусочек фильтровальной бумаги или ваты) и добавляют столько раствора амилазы, чтобы целлюлоза была полностью покрыта жидкостью. Содержимое каждой пробирки хорошо перемешивают с помощью пипетки. Пробирки с пипетками помещают в водяную баню с оптимальной для амилазы температурой 37...40 °С.

После внесения амилазы из каждой пробирки пипеткой отбирают по 1...2 капли исследуемой жидкости и проводят пробу с йодом в палетке. Смесь из 1-й пробирки окрашивает раствор йода в синий цвет. Содержимое 2-й пробирки окрашивания не даст.

Пипетки вновь помещают в пробирки. Через 2...3 минуты отбирают следующие пробы крахмала и целлюлозы. Опыт заканчивают, когда реакционная смесь из 1-й пробирки перестанет окрашиваться. За все время опыта содержимое 2-й пробирки не даст окрашивания с йодом.

Чтобы убедиться, что в результате гидролиза крахмала образовались редуцирующие сахара, а целлюлоза не подвергалась гидролизу амилазой, проводят пробу Троммера. Для этого в каждую пробирку автоматом вносят по 1 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия, по 5 капель 1%-ного раствора сульфата меди и по 3 капли глицерина. Содержимое пробирок хорошо перемешивают. Пробирки погружают в кипящую водяную баню на 5 минут и наблюдают за изменением окрашивания.

## **12.2. Использование неорганического фосфата при окислении углеводов**

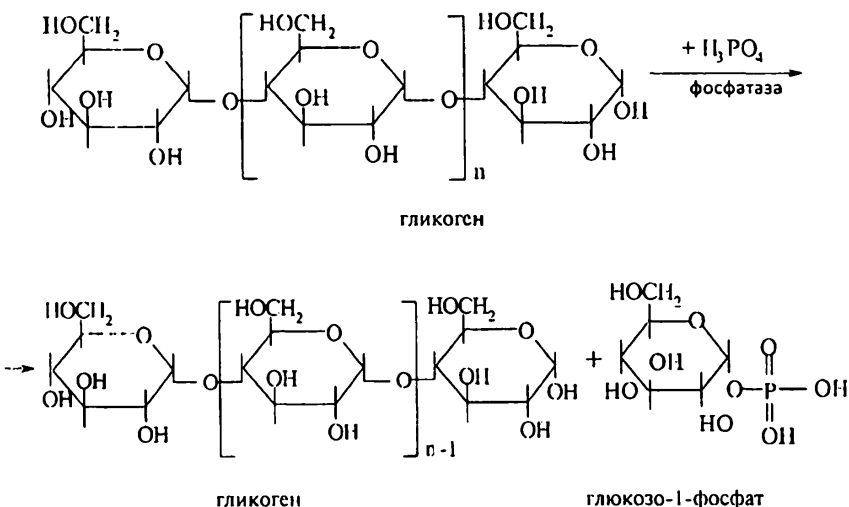
**Краткая теория к работе.** Углеводы всегда содержатся в тканях человека и животных — до 2% на сухой вес. В растительных тканях углеводы составляют основную часть — до 90% (на сухой вес).

В тканях человека и животных есть полисахарид гликоген (животный крахмал). Больше всего гликогена содержится в печени (до 5%) и мышцах (не более 2%). В других органах и тканях гликоген присут-

ствуется в значительно меньших количествах. Кроме гликогена в организме человека и животных содержится глюкоза. После всасывания в тонком отделе кишечника она попадает в печень и разносится ко всем органам и тканям.

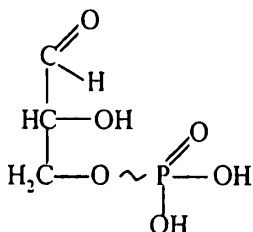
Гликоген и глюкоза — могут распадаться в тканях вне зависимости от наличия кислорода. В отсутствие кислорода, в анаэробных условиях, происходит процесс *гликогенолиза* — распад гликогена до молочной кислоты. В случае распада глюкозы этот процесс носит название *гликолиза*.

Начальный этап распада гликогена в организме идет путем фосфо-ролиза с нередуцирующего конца:

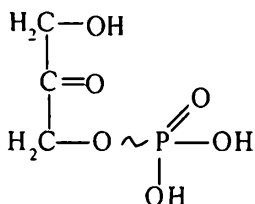


В результате возникают свободные моносахариды и их фосфорные эфиры. В дальнейшем обмене углеводов используются только фосфорные эфиры моносахаридов, как более реакционноспособные. Свободные моносахариды вовлекаются в обменные процессы лишь после фосфорилирования, то есть после превращения в фосфорные эфиры. Таким образом, гликолиз и гликогенолиз протекают с участием фосфорной кислоты.

Первый этап гликолиза также протекает с затратами фосфатов. В результате образуются две триозы — 3-фосфоглицериновый альдегид и диоксиацетонфосфат:



3-фосфоглицериновый альдегид



диоксиацетонфосфат

Следующие стадии распада углеводов сопровождаются накоплением энергии. Фосфорные остатки эфиров моносахаридов используются для создания богатого энергией соединения — аленозинтрифосфорной кислоты.

**Сущность метода.** Многочисленными исследованиями (А. В. Палладин и др.) выявлено сходство между обменом углеводов в тканях высших животных и процессами брожения. Поэтому в лабораторных условиях для изучения использования фосфата при окислении углеводов удобно использовать раствор сахарозы и дрожжи, которые вырабатывают ферменты, расщепляющие мальтозу и сахарозу.

Обнаружение фосфатов основано на способности фосфорной кислоты давать окрашенные продукты с молибденово-кислым аммонием  $((\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4)$ . В присутствии аскорбиновой кислоты образуется соединение синего цвета — «молибденовая синь». Предполагают, что молибденовая синь имеет состав:  $(\text{MoO}_2 \cdot 4\text{MoO}_3)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$ . Интенсивность окраски пропорциональна содержанию фосфорной кислоты в растворе.

#### Оборудование и реактивы:

- весы лабораторные технические, ступка с пестиком, штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, центрифужные пробирки градуированные вместимостью 10 см<sup>3</sup>, автоматы вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания молибдата аммония и аскорбиновой кислоты, водяная баня, электрическая плитка, термостат, воронка, фильтры бумажные, вода дистиллированная;
- сахароза кристаллическая, дрожжи хлебопекарные, фосфатная буферная смесь с pH 7,73, 2,5%-ный раствор молибдата аммония в растворе серной кислоты, 0,4%-ный свежеприготовленный раствор аскорбиновой кислоты.

**Ход работы.** В ступке растирают 1 г дрожжей и 1 г сахарозы. Центрифужными пробирками приливают 5 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 5 см<sup>3</sup> фосфатной буферной смеси с рН 7,73 и продолжают растирание. Затем маркируют две пробирки — контроль и опыт. Переносят в них по 5 см<sup>3</sup> полученной массы с помощью центрифужной пробирки.

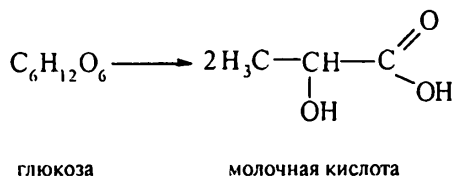
Контрольную пробирку погружают в кипящую водяную баню на 15...20 минут для инактивации ферментов дрожжей. Опытную пробирку помещают в термостат при температуре 37 °С на 1...2 часа.

По истечении указанного времени содержимое контрольной и опытной пробирок фильтруют через складчатый фильтр в центрифужные контрольную и опытную пробирки. В каждый фильтр автоматами вносят 1 см<sup>3</sup> молибдата аммония и 1 см<sup>3</sup> 0,4%-ного свежеприготовленного раствора аскорбиновой кислоты. Пробирки встряхивают и доводят их содержимое до верхней метки дистиллированной водой. Через 5...10 минут развивается синее окрашивание, интенсивность которого гораздо меньше в опытной пробирке.

### 12.3. Открытие продуктов брожения глюкозы

**Краткая теория к работе.** У микроорганизмов и растений протекают весьма сходные процессы расщепления углеводов, которые обычно называют брожением. Распад глюкозы при брожении и гликолизе протекает одинаково до образования пировиноградной кислоты. Различие начинается с дальнейшего преобразования пировиноградной кислоты. В зависимости от вида микроорганизмов и конечных продуктов различают несколько видов брожения.

Молочнокислое брожение используется в пищевой промышленности для получения различных молочнокислых продуктов и в животноводстве при силосовании кормов:



Уксуснокислое, пропионовокислое, маслянокислое, молочнокислое брожения имеют место в преджелудках жвачных:



**уксусная кислота**



**пропионовая кислота**



**масляная кислота**

$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow 3\text{CH}_4 + 3\text{CO}_2$$

**глюкоза**

## МСТАН

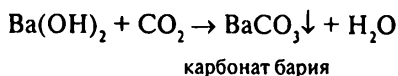
$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \longrightarrow 3\text{H}_3\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH} + 2\text{CO}_2$$

## ГЛЮКОЗА

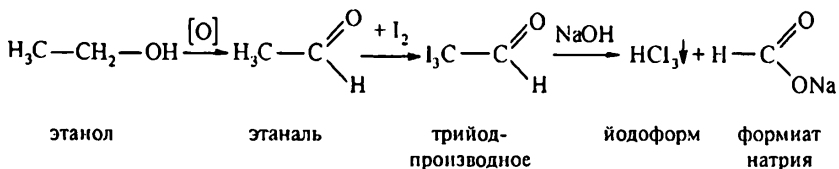
## ЭТАНОЛ

Сахароза первоначально подвергается гидролизу до глюкозы и фруктозы. В дальнейшем моносахариды сбраживаются до этанола, органических кислот и углекислого газа.

Тестом на углекислый газ служит образование нерастворимого осадка карбоната бария:



Спирт, образующийся при брожении, можно открыть йодоформной пробой (см. работу 4.4):



Молочную кислоту, как и другие оксикислоты, можно обнаружить по появлению желтого окрашивания с хлоридом железа(III). Сущность реакции заключается в восстановлении иона железа с  $\text{Fe}^{+3}$  до  $\text{Fe}^{+2}$  при одновременном окислении молочной кислоты и образовании стойкой комплексной соли железа.

Поскольку исходный раствор хлорида железа(III) имеет коричнево-желтый цвет, для лучшей наглядности перехода окраски целесообразно применять фиолетовый раствор фенолята железа, содержащий железо(III).

#### Оборудование и реактивы:

- весы лабораторные технические, ступка с пестиком, цилиндр вместимостью 10 см<sup>3</sup>, штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, пробка с газоотводной трубкой, термостат, воронка, фильтр бумажный, вода дистиллированная;
- сахароза кристаллическая, дрожжи хлебопекарные, насыщенный раствор гидроксида бария, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор фенола, 1%-ный раствор хлорного железа ( $\text{FeCl}_3$ ).

**Ход работы.** В ступке растирают 1 г дрожжей и 1 г сахарозы, приливая из цилиндра порциями 10 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Гомогенную массу переносят через воронку в реакционную пробирку. Пробирку закрывают пробкой с газоотводной трубкой.

В пробирку-приемник наливают 5...7 см<sup>3</sup> насыщенного гидроксида бария. Конец газоотводной трубки опускают до дна приемной про-

бирки. Собранную установку помещают в термостат при 37 °С. Через 30...60 минут (в зависимости от активности дрожжей) жидкость в пробирке мутнеет.

Затем обе пробирки достают из термостата. Убирают газоотводную трубку. Жидкость из реакционной пробирки фильтруют через складчатый фильтр в другую пробирку. Фильтрат делят на две части.

В одной порции проверяют наличие этанола. Для этого к фильтрату добавляют около 1 см<sup>3</sup> раствора йода, 2...3 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают пробирку на водяной бане. Наблюдают появление желтого окрашивания и характерного запаха йодоформа.

В другой части фильтрата проверяют наличие молочной кислоты (реакция Уфельмана). Для этого сначала готовят фенолят железа(III): в сухую пробирку вносят 0,5 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора фенола и 2...3 капли 1%-ного раствора хлорного железа (FeCl<sub>3</sub>); появляется фиолетовое окрашивание фенолята железа. К полученному раствору приливают вторую порцию фильтрата. В присутствии молочной кислоты появляется желто-зеленый цвет молочнокислого железа.

## **12.4. Определение массовой доли крахмала в зерне и картофеле поляриметрическим методом**

**Краткая теория к работе.** Поляриметрия — это метод определения концентрации оптически активных веществ с помощью измерения угла вращения поляризованного света.

Световой луч представляет собой набор волн, которые колеблются в разных направлениях в плоскостях перпендикулярных лучу.

Некоторые вещества могут действовать подобно оптическому фильтру и пропускают волны только в одной плоскости. В результате свет становится плоскополяризованным. Природные или искусственные материалы, обладающие свойствами оптических фильтров, называют поляризаторами. Как поляризаторы действуют призмы Николя, изготовленные из двух кристаллов исландского шпата.

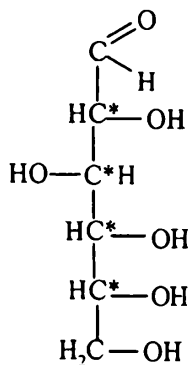
Оптически активные вещества вращают плоскость поляризованного света. Разные вещества вращают плоскость поляризации в различных направлениях. Если вещество поворачивает плоскость поляризованного света по часовой стрелке, то его называют правовращающим и обозначают знаком «+». В противном случае вещество называют левовращающим и обозначают знаком «-».

В основе поляризации лежит явление оптической активности. Оптической активностью обладают вещества, в молекуле которых име-



ется хотя бы один асимметричный углеродный атом. У такого атома углерода все четыре заместителя различны.

Например, в молекуле глюкозы есть четыре асимметричных атома углерода. Их принято помечать звездочкой (\*):



глюкоза

Способность раствора оптически активного вещества к вращению плоскости поляризованного света зависит от ряда факторов. При постоянной температуре и длине волны угол вращения зависит от концентрации исследуемого раствора и определяется соотношением:

$$\alpha = [\alpha] \cdot C \cdot l,$$

где  $\alpha$  — угол вращения плоскости поляризации, град;

$[\alpha]$  — удельное вращение плоскости поляризации;

$C$  — концентрация вещества, г/см<sup>3</sup>;

$l$  — толщина слоя раствора, дм.

При этом удельным вращением называется угол вращения плоскости поляризации (в градусах) водным раствором, содержащим 1 г/см<sup>3</sup> оптически активного вещества при толщине слоя 1 дм. Например, удельное вращение наиболее распространенных сахаров составляет: глюкоза (+52,8°), галактоза (+81,5°), фруктоза (−92,4°), сахароза (+66,5°),  $\alpha$ -лактоза (+88°),  $\beta$ -лактоза (+34°).

Содержание сахаров в вытяжках, определенное поляризметрическим методом, несколько отличается от истинного значения. Это свя-

зано с присутствием в растворах различных веществ, также вращающих плоскость поляризации. Например, в корнях сахарной свеклы преобладает сахароза, но имеется некоторое количество глюкозы и фруктозы, которые обладают иными оптическими свойствами.

Поэтому поляриметрический метод определения сахаров очень удобен для быстрой сравнительной оценки биологических объектов, когда не требуется большой точности, а нужно лишь выделить лучшие сорта, образцы и т. д. Для получения достоверных данных о количественном содержании того или иного сахара нужно использовать другие методы.

**Сущность метода.** Определение крахмала в зерне и картофеле поляриметрическим методом состоит из двух этапов: подготовительного и основного — анализа фильтрата. Подготовка образцов включает гидролиз крахмала соляной кислотой и осаждение белков. По окончании этого этапа исследуемый образец содержит раствор глюкозы. Именно использование оптических свойств глюкозы положено в основу поляриметрического метода определения крахмала.

Анализ оптической активности фильтрата проводят в приборах поляриметров. Поляриметры позволяют измерять угол вращения плоскости поляризованного света. В современных поляриметрах в качестве оптических фильтров используют пластины из кристаллического кварца.

В данной работе используют поляриметр круговой СМ-2. Подробное устройство прибора изложено в инструкции к нему. Принципиальная схема поляриметра (рис. 11) включает источник света (1), поляризатор (2), поляриметрическую трубку (3), анализатор (4) и окуляр (5).

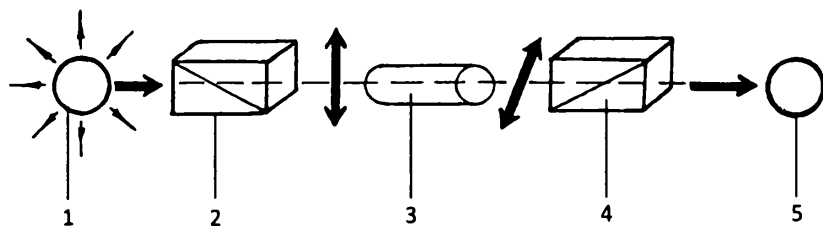


Рис. 11. Схема поляриметра

Перед началом работы проверяют установку прибора на нуль, установив в кюветное отделение поляриметрическую трубку с дистиллированной водой. Вращая втулку наблюдательной трубки, настраивают окуляр на резкое изображение линии раздела полей сравнения. Поворотом анализатора добиваются однородной освещенности обеих половин поля «по темноте». При таком положении снимают показания по шкале лимба и отсчетного устройства не менее пяти раз и вычисляют среднее значение, которое является нулевым отсчетом.

Затем в кюветное отделение помещают поляриметрическую трубку с исследуемым раствором. Однородность обеих половин поля зрения изменяется. Поворотом анализатора вновь добиваются однородности полей «по темноте» и производят отсчет не менее пяти раз. Вычисляют среднее значение, которое используют в расчетах.

При расчетах следует иметь в виду, что удельное вращение для крахмала различных культур характеризуется следующими величинами (в град): для пшеницы — 182,7; ржи — 184,0; ячменя — 181,5; кукурузы — 184,6; проса — 171,4; гречихи — 179,5; картофеля — 195,4.

#### **Оборудование и реактивы:**

- весы лабораторные технические, ступка с пестиком, мерные колбы вместимостью 100 см<sup>3</sup>, бюретка вместимостью 25 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>, цилиндр вместимостью 50 см<sup>3</sup>, пипетки градуированные вместимостью 1 и 5 см<sup>3</sup>, коническая колба вместимостью 100 см<sup>3</sup>, водяная баня, электрическая плитка, поляриметр круговой СМ-2, воронка, фильтр бумажный, вода дистиллированная;
- 1%-ный раствор соляной кислоты, 5%-ный раствор соляной кислоты, 10%-ный раствор сульфата цинка, 10%-ный раствор ферроцианида калия ( $K_4[Fe(CN)_6]$  — желтая кровяная соль).

**Ход работы.** 1. *Анализ семян зерновых культур.* В мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> через сухую воронку переносят 5 г хорошо измельченных семян и из бюретки приливают 25 см<sup>3</sup> 1%-ной соляной кислоты, смывая при этом остатки пробы с воронки в колбу. Содержимое колбы перемешивают, прибавляют к нему еще 25 см<sup>3</sup> 1%-ной соляной кислоты, смывая частицы материала со стенок. Затем колбу ставят на кипящую водяную баню и первые 5 минут нагревания непрерывно перемешивают.

Через 15 минут кипячения колбу достают из бани, охлаждают проточной водой до комнатной температуры и приливают из цилиндра 30 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Затем туда же пипетками вносят 3 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора сульфата цинка и 1,5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора ферроцианида калия для осаждения белков, мешающих определению крахмала. После этого объем жидкости в колбе доводят до метки дистиллированной водой и, дав отстояться, фильтруют через складчатый бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>. Первую порцию фильтрата объемом 20...30 см<sup>3</sup> отбрасывают. Прозрачный фильтрат анализируют в поляриметре.

2. *Анализ свежего картофеля.* На технических весах отвешивают 25 г свежего картофеля, переносят в ступку и раздавливают пестиком. Затем к размятой массе пипеткой приливают 5 см<sup>3</sup> 5%-ного раствора соляной кислоты и продолжают растирание до образования однородной смеси, не содержащей волокон или комочков.

Полученную массу через воронку переносят в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>. Ступку и пестик смывают из бюретки 25 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора соляной кислоты, которую переносят в мерную колбу. Затем колбу ставят на кипящую водяную баню.

Через 15 минут кипячения колбу достают из бани, охлаждают проточной водой до комнатной температуры и приливают из цилиндра 30 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Затем туда же пипетками вносят 1 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора сульфата цинка и 0,5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора ферроцианида калия для осаждения белков, мешающих определению крахмала. После этого объем жидкости в колбе доводят до метки дистиллированной водой и, дав отстояться, фильтруют через складчатый бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup>. Первую порцию фильтрата объемом 20...30 см<sup>3</sup> отбрасывают. Прозрачный фильтрат анализируют в поляриметре.

Массовую долю крахмала в зерне и картофеле рассчитывают по формул:

$$W = \frac{\alpha}{[\alpha] \cdot l} \cdot 100,$$

где  $W$  — массовая доля крахмала в продукте, %;

$\alpha$  — угол вращения плоскости поляризации, градусы поляриметра;

$[\alpha]$  — удельное вращение для крахмала анализируемой культуры;

$l$  — длина поляризационной трубки, 1 дм;

100 — повышающий коэффициент.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Биологическое значение углеводов. Состав и строение моно-, ди- и полисахаридов.
2. Переваривание и всасывание углеводов в желудочно-кишечном тракте моногастричных животных. Роль клетчатки. Пути использования глюкозы.
3. Особенности превращения углеводов в преджелудках у жвачных животных.
4. Концентрация углеводов в крови и ее регуляция: роль центральной нервной системы, эндокринных желез, печени.
5. Анаэробное окисление углеводов. Гликогенолиз (2 этапа). Гликолиз (3 этапа). Энергетическая ценность и биологическая роль анаэробного окисления.
6. Аэробное окисление углеводов. Цикл Кребса (энергетический котел, цикл трикарбоновых кислот). Энергетическая ценность, биологическая роль.
7. Сходства и различия анаэробного и аэробного путей окисления глюкозы.
8. Пентозо-фосфатный цикл (ПФЦ). Продукты ПФЦ, поступающие в гликолиз. Биологическая роль.
9. Синтез гликогена (2 этапа).
10. Патология углеводного обмена в организме животных.

## ТЕМА 13. ОБМЕН ЛИПИДОВ

### Цель занятия:

- разобраться в процессах переваривания и всасывания липидов;
- изучить основные этапы промежуточного обмена липидов (окисление глицерина и высших жирных кислот, синтез триглицеридов, кетоновых тел, обмен холестерина), уметь писать соответствующие уравнения реакций;
- разобраться в вопросах регуляции и патологии липидного обмена.

### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- определить физико-химические константы жиров различного происхождения и провести исследования ферментативного гидролиза жиров;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 13.1. Определение температуры плавления жиров животного происхождения

**Краткая теория к работе.** Температура плавления — одна из основных физических констант жира.

Температура плавления жиров определяется набором жирных кислот, входящих в состав триглицеридов. Как правило, жиры, в которых преобладают предельные кислоты (пальмитиновая, стеариновая), имеют более высокие температуры плавления, чем жиры, в которых больше непредельных кислот (олеиновая, линолевая, линоленовая).

Температура плавления зависит от строения высших жирных кислот. Например цис-форма олеиновой кислоты — это маслянистая жидкость, которая плавится при 14 °С, а ее транс-изомер — элаиди-

новая кислота — является твердым веществом с температурой плавления 52 °С.

Все природные ненасыщенные жирные кислоты имеют цис-конфигурацию. Транс-изомеры высших жирных кислот образуются при обработке растительных масел токами высокой частоты для производства маргаринов. Опасность употребления с пищей транс-изомеров высших жирных кислот состоит в том, что они, встраиваясь в мембраны клеток организма человека, изменяют конформацию мембранно-связанных ферментов и белков-рецепторов для гормонов. Это ведет к нарушению регуляции метаболизма в таких клетках, а затем во всем организме, что заканчивается развитием патологического процесса.

По температуре плавления можно, в известной степени, судить об усвояемости жира. Легкоплавкие жиры легче эмульгируются, а следовательно, и легче усваиваются. По усвояемости жиры можно разделить на три группы. Жир с температурой плавления ниже температуры тела человека и животных усваивается на 97...98%. Жир с температурой плавления выше 37 °С усваивается примерно на 90%. Усвояемость жиров с температурой плавления 50...60 °С составляет 70...80%.

**Сущность метода.** Для химически индивидуального вещества температура плавления — это определенная константа.

Природные жиры не имеют определенной точки плавления. Это объясняется следующим. Во-первых, природные жиры являются смесью индивидуальных веществ (глицеридов, свободных жирных кислот, пигментов, витаминов и др.). Во-вторых, в составе природных триглицеридов содержатся различные высшие жирные кислоты, отличающиеся друг от друга температурами плавления. Некоторые жиры содержат глицериды только трех или четырех различных кислот, другие — значительно больше. Например, в составе молочного жира обнаружены производные нескольких десятков кислот.

Поэтому при определении температуры плавления нативных (природных) жиров отмечают начало плавления, когда жир начинает размягчаться, и конец плавления, когда жир переходит в прозрачную жидкость и приобретает текучесть.

#### **Оборудование и реактивы:**

- капилляр стеклянный диаметром 1...2 мм и длиной 30...40 мм, бумага фильтровальная, термометр ртутный стеклянный лабораторный с диапазоном измерений 0...50 °С и ценой деления 0,1 °С, кольцо резиновое для крепления капилляра, про-

бирка вместимостью 10 см<sup>3</sup>, стакан химический вместимостью 100...200 см<sup>3</sup>, холодильник бытовой, штатив и лапки для него, электрическая плитка, вода дистиллированная;

- расплавленный и профильтрованный жир.

**Ход работы.** Сухой капилляр диаметром 1...2 мм опускают в расплавленный жир. Когда жир поднимется на высоту около 2 см, капилляр вытирают снаружи фильтровальной бумагой и помещают на лед в холодильник на 2 часа. За это время происходит кристаллизация триглицеридов.

По истечении указанного времени, собирают следующую установку (рис. 12).

Капилляр (1) за незаполненную часть достают из холодильника и с помощью резинового кольца (2) прикрепляют к нижней части термометра (3). При этом свободная часть капилляра должна быть направлена вниз, а заполненный жиром конец необходимо расположить на уровне середины ртутного резервуара термометра.

Термометр с капилляром подвешивают к кольцу штатива (4) за специальную петлю (5) и опускают в сухую пробирку (6). Пробирку с термометром погружают в стакан с дистиллированной водой (7), установленный на электрической плитке (8). Уровень воды в стакане должен быть выше верхнего конца капилляра.

Затем включают плитку и внимательно следят за агрегатным состоянием жира в капилляре. Температуру, при которой жир становится прозрачным и начнет стекать по капилляру, считают температурой плавления.

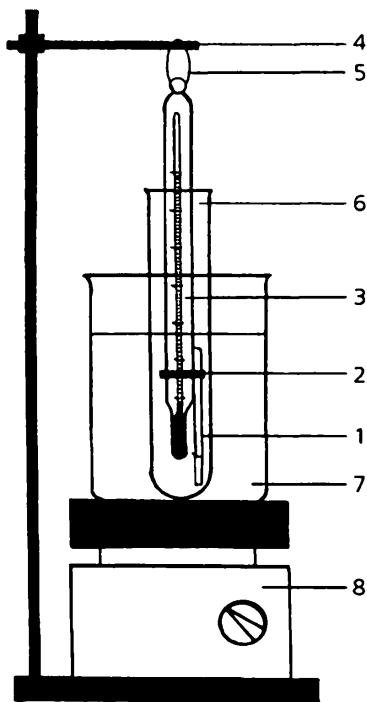


Рис. 12. Установка для определения агрегатного состояния жира



### 13.2. Определение числа омыления жира

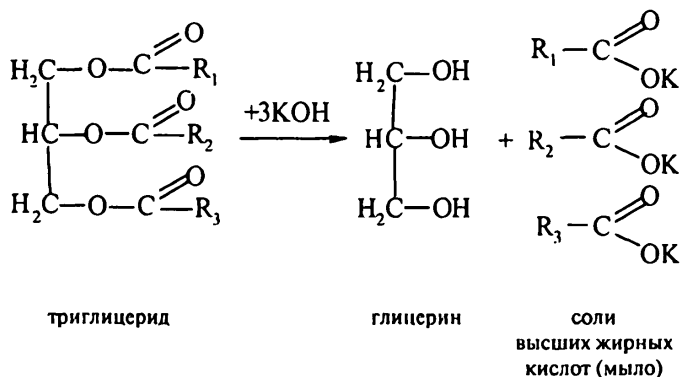
**Краткая теория к работе.** Биосинтез триглицеридов в организме осуществляется различными путями. Ферменты биосинтеза триглицеридов обнаружены в печени, слизистой оболочке кишечника, жировой ткани и т. п. Условия биосинтеза предопределяют набор кислот, входящих в состав жиров.

Большинство жирных кислот имеет  $C_{18}$ -скелет. Пальмитиновая кислота встречается почти во всех жирах. Гадолеиновая ( $C_{20}$ ) и цетолеиновая ( $C_{22}$ ) кислоты выделены только из рыбьего жира. Эруковая кислота ( $C_{22}$ ) встречается в больших количествах в маслах семян сурепки, горчицы, настурции. Кислоты с короткой цепочкой — масляная, капроновая, каприловая и каприновая могут составлять до 10% молочного жира.

Длина цепи определяет многие свойства как самих жирных кислот, так и жиров, образуемых этими кислотами. Длинноцепочечные жирные кислоты имеют твердую консистенцию, короткоцепочечные являются жидкими веществами. Чем выше молекулярный вес жирных кислот, тем выше и температура их плавления, а соответственно и температура плавления жиров, в состав которых входят эти кислоты.

**Сущность метода.** Число омыления характеризует среднюю молекулярную массу всех жирных кислот в жире.

Исследуемый жир подвергают щелочному гидролизу:



Очевидно, что чем больше молекулярная масса жирных кислот, входящих в триглицериды, тем меньше щелочи требуется для омыления. Выражают число омыления в миллиграммах гидроксида калия, необходимого для омыления 1 г жира.

Наибольшим числом омыления (212...247) отличается молочный жир, в состав которого входят низшие жирные кислоты. Для других жиров характерны следующие величины числа омыления: говяжий жир — 190...200, бараний — 192...198, свиной — 193...200, льняное масло — 187...195.

#### Оборудование и реактивы:

- весы лабораторные технические, конические колбы вместимостью 250 см<sup>3</sup>, бюретки вместимостью 25 и 50 см<sup>3</sup> и ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>, холодильник обратный, водяная баня, электрическая плитка;
- растительное масло или расплавленный и профильтрованный жир, спиртовой раствор гидроксида калия с эквивалентной концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup>, 1%-ный раствор фенолфталеина, раствор соляной кислоты с эквивалентной концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы.** Параллельно проводят два измерения: контрольное и опытное. Для этого берут две конические колбы вместимостью 250 см<sup>3</sup>. В опытную колбу отвешивают  $((1,0...2,0) \pm 0,1)$  г расплавленного и профильтрованного жира. Контрольную колбу оставляют пустой. Затем в обе колбы из бюретки вносят по 30 см<sup>3</sup> спиртового раствора гидроксида калия с эквивалентной концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup>). Каждую колбу закрывают пробкой с обратным холодильником. Колбы помещают в кипящие водяные бани. В холодильники подают воду в режиме противотока. Замечают момент закипания жидкости в колбах и продолжают омыление в течение 50 минут.

Затем прекращают нагревание бань и подачу воды в холодильники и отсоединяют от них колбы. В контрольную и опытную колбы вносят по 3 капли 1%-ного раствора фенолфталеина и титруют пробы из бюретки раствором соляной кислоты с эквивалентной концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup> до исчезновения малинового окрашивания.

Число омыления вычисляют по формуле:

$$K = \frac{(V_k - V_o)}{m} \cdot 28,05$$

где  $K$  — число омыления, мг КОН/1 г жира;

$V_k$  — объем раствора соляной кислоты, израсходованной на титрование щелочи в контрольной пробе, см<sup>3</sup>;

$V_0$  — объем раствора соляной кислоты, израсходованной на титрование щелочи в опытной пробе,  $\text{см}^3$ ;

$m$  — масса жира, г;

28,05 — масса гидроксида калия, соответствующая 1  $\text{см}^3$  раствора соляной кислоты с эквивалентной концентрацией 0,5 моль/ $\text{дм}^3$ , мг.

### 13.3. Определение йодного числа жира

**Краткая теория к работе.** Синтез высших жирных кислот в животных и растительных клетках катализируется полифункциональными ферментами и зависит от интенсивности многих обменных реакций в организме. Вот почему набор высших жирных кислот в жирах различного происхождения значительно отличается между собой.

Например, теплокровные животные имеют тенденцию продуцировать твердые жиры (жидкие при температуре тела или немного выше ее). Подобная зависимость наблюдается при синтезе жира и у растений. Известно, что льняное масло из семян, выращенных в теплице при 25...30 °С, содержит больше насыщенных высших жирных кислот, чем льняное масло из семян, выращенных в холодном климате.

Входящие в состав жиров насыщенные и ненасыщенные высшие жирные кислоты отличаются не только по физико-химическим свойствам, но и по биологической активности и ценности для организма.

Наиболее выраженными биологическими свойствами обладают полиненасыщенные высшие жирные кислоты: линолевая, линоленовая и арахидоновая. Они не синтезируются в организме человека и животных и являются незаменимыми. Само распределение этих кислот в организме свидетельствует о их важной роли в его жизнедеятельности: больше всего полиненасыщенных высших жирных кислот содержится в печени, мозге, сердце, половых железах.

Йодное число характеризует степень ненасыщенности кислот в жире. Чем больше в жире ненасыщенных кислот, тем выше йодное число. Для растительных масел оно выше, чем для животных.

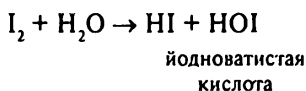
Выражают йодное число количеством граммов йода, которое присоединяется к 100 г жира по месту разрыва двойных связей.

Йодное число некоторых жиров и масел колеблется в следующих пределах: говяжий — 27...47, бараний — 31...46, свиной — 46...66, подсолнечное масло — 129...136, льняное масло — 175...201.

**Сущность метода.** Существуют разные методики определения йодного числа. Все они основаны на присоединении йода или его произ-

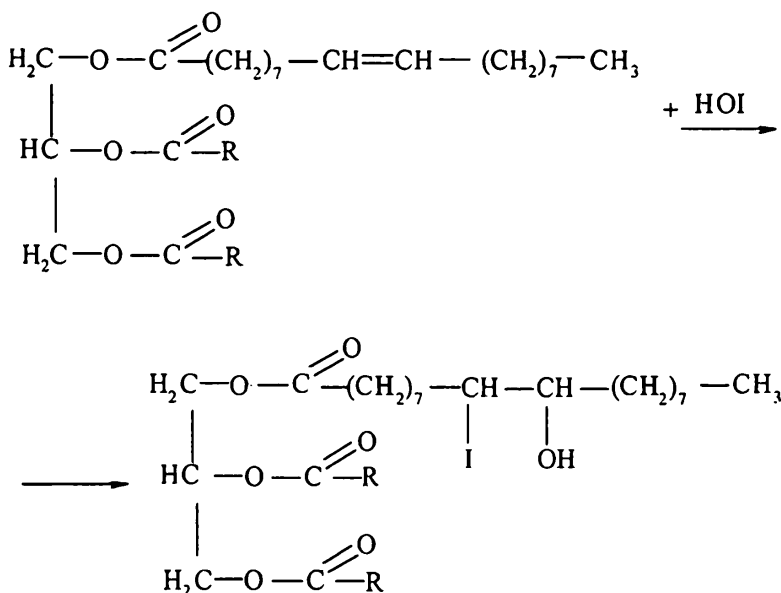
водных по месту разрыва двойных связей у ненасыщенных жирных кислот.

В данном методе как источник йода используется йодноватистая кислота (HOI), которая образуется при взаимодействии йода с водой:

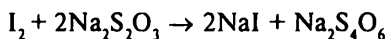


Такая реакция протекает только в том случае, если йодноватистая кислота отводится из системы или взаимодействует с другими веществами. В присутствии жира йодноватистая кислота поглощается при разрыве двойных связей у ненасыщенных жирных кислот.

Реакция протекает по схеме:



Непрореагировавший йод оттитровывают тиосульфатом натрия:



#### Оборудование и реактивы:

- весы лабораторные технические, конические колбы с притертыми пробками вместимостью 500 см<sup>3</sup>, бюретки вместимостью 25 и 50 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>, цилиндр вместимостью 200 см<sup>3</sup>, водяная баня, электрическая плитка, вода дистиллированная;
- растительное масло или расплавленный и профильтрованный жир, 96°-ный этанол, спиртовой раствор йода с эквивалентной концентрацией 0,2 моль/дм<sup>3</sup>, раствор тиосульфата натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы.** Параллельно проводят два измерения: контрольное и опытное. Для этого берут две конические колбы вместимостью 500 см<sup>3</sup> с притертыми пробками. В опытную колбу отвешивают ((0,20...0,30) ± 0,01) г расплавленного и профильтрованного жира. Контрольную колбу оставляют пустой. Затем в обе колбы из бюретки вносят по 20 см<sup>3</sup> 96°-ного этанола. Опытную пробу нагревают на водяной бане с температурой 50...60 °С до получения однородной эмульсии.

Затем в обе колбы из бюретки вносят по 25 см<sup>3</sup> спиртового раствора йода с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> и цилиндром — по 200 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Колбы закрывают пробками и непрерывно встряхивают в течение 5 минут при комнатной температуре.

Далее содержимое каждой колбы титруют из бюретки раствором тиосульфата натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> в два этапа как можно быстрее, чтобы максимально связать избыток йода. Сначала — до желтого окрашивания, после чего автоматом добавляют 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора крахмала и смесь приобретает буро-фиолетовое окрашивание. Затем титрование продолжают, добавляя тиосульфат по каплям до обесцвечивания раствора.

Йодное число вычисляют по формуле, используя весь объем тиосульфата натрия, израсходованного на титрование каждой пробы:

$$K = \frac{(V_k - V_o) \cdot 0,01269}{m} \cdot 100,$$

где  $K$  — йодное число, г  $I_2$ /100 г жира;

$V_k$  — объем раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование йода в контрольной пробе, см<sup>3</sup>;

$V_0$  — объем раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование йода в опытной пробе,  $\text{см}^3$ ;

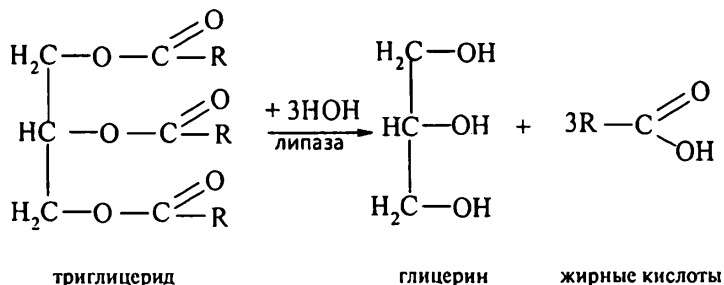
$m$  — масса жира, г;

0,01269 — масса йода, соответствующая 1  $\text{см}^3$  раствора тиосульфата натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/ $\text{дм}^3$ , г;

100 — коэффициент пересчета на 100 г жира.

### 13.4. Определение кислотного числа жира

**Краткая теория к работе.** Свежие жиры животного и растительного происхождения нейтральны. Однако при переработке или хранении в неблагоприятных условиях происходит гидролиз жира. Гидролитическая порча жира — это ферментативный процесс. Он провоцируется липазами бактериального происхождения:



В результате накапливаются свободные жирные кислоты, что сопровождается увеличением кислотности жира.

**Сущность метода.** Кислотное число характеризует степень свежести жира. Это один из важнейших показателей при оценке качества жиров и масел.

Для определения кислотного числа свободные жирные кислоты оттитровывают щелочью. При этом необходимо учитывать, что жиры нерастворимы в водном растворе щелочи. Поэтому для проведения полной нейтрализации свободных жирных кислот во всем объеме жира его переводят в состояние эмульсии с помощью этанола.

Кислотное число выражают количеством миллиграммов щелочи, которое требуется для нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г жира. Для свежего жира разных сортов кислотное число обычно не превышает 1,0...3,5. Повышенное кислотное число указывает на снижение качества жира.

#### **Оборудование и реактивы:**

- весы лабораторные технические, конические колбы вместимостью 100 см<sup>3</sup>, бюретки вместимостью 10 и 25 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>, водяная баня, электрическая плитка;
- растительное масло или расплавленный и профильтрованный жир, 96°-ный этанол, 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина, гидроксид натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы.** В коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> отвешивают 5 г растительного масла или расплавленного жира. В колбу из бюретки добавляют 20 см<sup>3</sup> 96°-ного этанола и при помешивании нагревают на водяной бане с температурой 50...60 °С до получения однородной эмульсии.

Затем в колбу добавляют 2 капли 1%-ного раствора фенолфталеина и титруют из бюретки раствором гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Кислотное число вычисляют по формуле:

$$K = \frac{V}{m} \cdot 4,0$$

где  $K$  — кислотное число, мг NaOH/1 г жира;

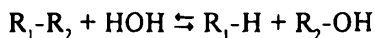
$V$  — объем раствора гидроксида натрия, израсходованного на титрование жира, см<sup>3</sup>;

$m$  — масса жира, г;

4,0 — масса гидроксида натрия, соответствующая 1 см<sup>3</sup> его раствора с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, мг.

### **13.5. Качественное открытие гидролиза жиров ферментами**

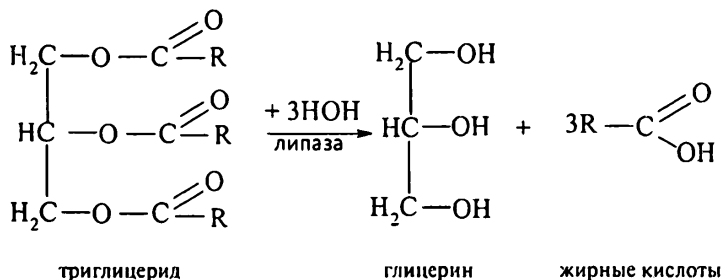
**Краткая теория к работе.** Фермент липаза относится к классу гидролаз. Гидролазы ускоряют реакции расщепления (а иногда и синтеза) органических соединений при участии воды:



В зависимости от характера субстрата, подвергающегося гидролизу, гидролазы делят на ряд подклассов. Один из наиболее важных подклассов — эстеразы, катализирующие гидролиз сложноэфирных связей. Липаза является представителем эстераз и ускоряет гидролиз  $\alpha$ -сложноэфирных связей в молекулах триглицеридов.

**Сущность метода.** В данной работе гидролиз жиров изучают в модельных системах. Объектами исследования служат эмульгированный молочный жир и раствор панкреатина, содержащий липазу. Оптимальное для липазы значение pH среды создают, подщелачивая раствор карбонатом натрия в присутствии фенолфталеина. Опыт проводят при оптимальной для липазы температуре 38 °С.

Открытие липазы основано на изменении реакции среды в результате гидролиза жира:



По мере накопления глицерина и жирных кислот реакция среды сдвигается в кислую сторону, и розовая окраска фенолфталеина исчезает.

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, пипетки градуированные вместимостью 2 см<sup>3</sup>, термостат;
- молоко, 1%-ный раствор фенолфталеина, 1%-ный раствор карбоната натрия, 1%-ный раствор панкреатина.

**Ход работы.** В две пробирки пипеткой наливают по 2 см<sup>3</sup> молока, по 1 капле 1%-ного раствора фенолфталеина и по каплям 1%-ный раствор карбоната натрия до появления бледно-розовой окраски (нельзя добавлять избыток раствора карбоната натрия). В первую пробирку добавляют 2 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, во вторую — 2 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора панкреатина. Пробирки помещают в термостат при температуре 38 °С.

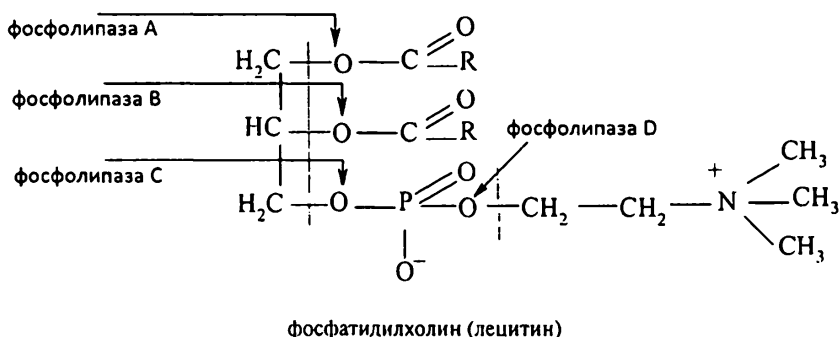


По истечении 30 минут наблюдают изменение окраски в пробирке с панкреатином.

### 13.6. Качественное открытие действия фосфолипаз поджелудочной железы

**Краткая теория к работе.** В поджелудочной железе содержатся ферменты фосфолипазы, катализирующие гидролитическое расщепление фосфолипидов. В составе поджелудочного сока содержится несколько фосфолипаз — фосфолипазы А, В, С и D. Фосфолипазы А и В гидролизуют сложноэфирные связи между глицерином и жирными кислотами в фосфатидах. Фосфолипаза D ускоряет гидролиз эфирной связи между фосфорной кислотой и холином. Фосфолипаза С катализирует отщепление фосфорной кислоты от глицерина в фосфатидах, освобождая таким образом фосфорную кислоту.

Место действия перечисленных фосфолипаз показано на схеме:



**Сущность метода.** Открытие действия фосфолипазы в данной работе основано на качественном обнаружении фосфорной кислоты, которая освобождается при гидролизе фосфолипидов.

Фосфорная кислота может давать окрашенные продукты с молибденовокислым аммонием  $((\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4)$ . В присутствии аскорбиновой кислоты образуется соединение синего цвета — «молибденовая синь». Предполагают, что «молибденовая синь» имеет состав:  $(\text{MoO}_2 \cdot 4\text{MoO}_3)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4$ .

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, пипетки градуированные вместимостью 2 см<sup>3</sup>, автоматы вместимостью

1 см<sup>3</sup> для отмеривания молибдата аммония и аскорбиновой кислоты, термостат;

- суспензия лецитина, 1%-ный раствор панкреатина, 2,5%-ный раствор молибдата аммония в растворе серной кислоты, 0,4%-ный свежеприготовленный раствор аскорбиновой кислоты.

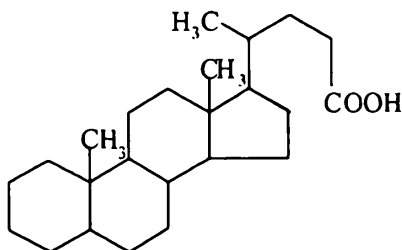
**Ход работы.** В две пробирки пипеткой наливают по 2 см<sup>3</sup> суспензии лецитина. В контрольную пробирку добавляют 2 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, в опытную — 2 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора панкреатина. Пробирки помещают в водяную баню или термостат при температуре 38 °С.

По истечении 30 минут в обе пробирки автоматами вносят 1 см<sup>3</sup> молибдата аммония и 1 см<sup>3</sup> 0,4%-ного свежеприготовленного раствора аскорбиновой кислоты. Пробирки встряхивают и оставляют на 5...10 минут для развития синей окраски в опытной пробе.

### 13.7. Эмульгирование жиров

**Краткая теория к работе.** Жиры нерастворимы в воде. Чтобы подвергнуться действию пищеварительных ферментов — липаз, они должны быть предварительно эмульгированы. Основным эмульгатором жира в пищеварительном тракте являются поверхностно активные желчные кислоты. Желчные кислоты поступают с желчью в двенадцатиперстную кишку, обволакивают капельки жира и препятствуют их слиянию.

Желчные кислоты — холевая, дезоксихолева, хенодезоксихолева и литохолевая — являются производными холановой кислоты:



холановая кислота

**Сущность метода.** При перемешивании жира с водой образуется быстро расслаивающаяся нестойкая эмульсия. Стабилизиро-

вать эмульсию можно добавлением поверхностно-активных веществ (ПАВ), молекулы которых полярны и имеют сродство как к водной, так и к жировой фазам. Эмульгаторы легко адсорбируются на поверхности раздела двух фаз, образуя тончайшую пленку, которая понижает поверхностно активное натяжение и препятствует слиянию капелек эмульсии.

Белки, мыла, соли угольной кислоты, содержащиеся в некотором количестве в двенадцатиперстной кишке, также эмульгируют жиры.

#### **Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, вода дистиллированная;
- растительное масло, желчь, раствор яичного белка, 1%-ный раствор мыла, 1%-ный раствор карбоната натрия.

**Ход работы.** В пять пробирок наливают по 5...6 капель растительного масла. Затем с помощью автоматов добавляют в первую пробирку 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, во вторую — 1 см<sup>3</sup> желчи, в третью — 1 см<sup>3</sup> раствора яичного белка, в четвертую — 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора мыла, в пятую — 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора углекислого натрия.

Содержимое пробирок тщательно встряхивают и спустя 5 минут наблюдают сохранение эмульсии.

### **13.8. Исследование динамики гидролиза липидов под действием ферментного препарата «Панкреатин»**

**Краткая теория к работе.** Липаза ускоряет гидролитическое расщепление простых липидов. В небольшом количестве она содержится в желудке. Основная масса липазы выделяется с соком поджелудочной железы. Сначала липазы неактивны, но в просвете кишечника активируются трипсином и желчными кислотами.

Липаза может действовать только на предварительно эмульгированные жиры, поэтому большинство жиров (95...97%) переваривается в тонком кишечнике. Именно здесь создаются оптимальные условия для действия липазы.

Эмульгирование липидов происходит в просвете двенадцатиперстной кишки под влиянием желчных кислот и их солей с глицином и таурином. Причем холевая и хенодезоксихолевая кислоты синтезируются в печени из холестерина, подвергаются конъюгации с глицином и таурином и выделяются в просвет двенадцатиперстной кишки через

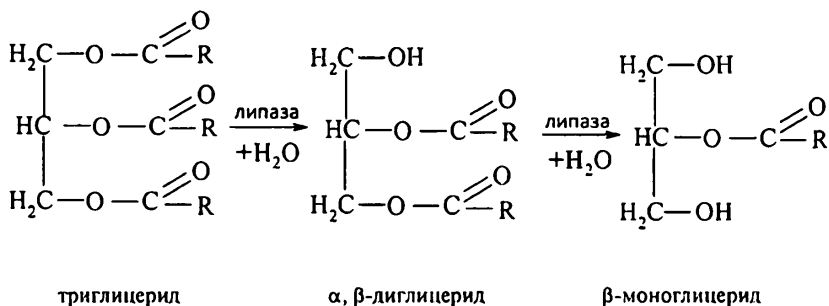
желчный пузырь или непосредственно из желчи. Две другие желчные кислоты — литохолевая и дезоксихолевая — образуются в просвете кишечника из выделившихся желчных кислот и их солей под влиянием бактериальных ферментов кишечника.

Молекулы желчных кислот и их солей состоят из полярной и неполярной частей и проявляют свойства поверхностно-активных веществ. Механизм эмульгирования заключается в том, что желчные кислоты адсорбируются на поверхности липидов, уменьшая поверхностное натяжение жировой капли. В результате из одной капли липидов образуется  $10^{12}$  мелких капель жира. При этом поверхность раздела возрастает в  $10^{14}$  раз.

**Сущность метода.** Об активности фермента судят по количеству субстрата, изменяющегося под влиянием фермента в единицу времени. За изменением субстрата в присутствии фермента можно следить также по появлению в растворе тех или иных продуктов реакции.

Об активности липазы можно судить по количеству жирных кислот, образующихся при гидролизе жира за определенный промежуток времени.

Гидролиз триглицеридов идет ступенчато. В первую очередь липаза расщепляет внешние сложноэфирные связи ( $\alpha$ -связи):



Образующиеся в результате  $\beta$ -моноголицериды способны всасываться кишечной стенкой. Далее  $\beta$ -моноголицериды используются в ресинтезе триглицеридов уже в кишечной стенке или полностью гидролизуются под действием неспецифических эстераз.

Количество выделяющихся жирных кислот определяют титрованием щелочью. Для активирования липазы и эмульгирования жира в опытную пробу вносят желчь.

### Оборудование и реактивы:

- весы лабораторные технические, конические колбы вместимостью 50 и 100 см<sup>3</sup>, пипетки Мора вместимостью 5 и 50 см<sup>3</sup>, автоматы вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания дистиллированной воды и желчи, бюретка вместимостью 25 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>, термостат, вода дистиллированная;
- растительное масло или расплавленный и профильтрованный жир, 1%-ный раствор панкреатина, желчь, 1%-ный раствор фенолфталеина, раствор гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,001 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы.** В две конические колбы вместимостью 100 см<sup>3</sup> отвешивают по 5 г растительного масла или расплавленного жира. В каждую колбу пипеткой приливают 50 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора панкреатина.

Затем колбы маркируют — «контроль» и «опыт». В контрольную колбу автоматом добавляют 1 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, а в опытную колбу автоматом добавляют 1 см<sup>3</sup> желчи. Обе колбы встряхивают до образования эмульсии и помещают в термостат с температурой выше температуры плавления жира на 1...2 °С. Записывают время начала опыта.

Через 15 минут колбы достают из термостата. После встряхивания из каждой колбы пипеткой отбирают по 5 см<sup>3</sup> эмульсии и переносят в две конические колбы для титрования вместимостью 50 см<sup>3</sup>.

Колбы с реакционной смесью снова помещают в термостат, а в колбы для титрования добавляют по 1 капле 1%-ного раствора фенолфталеина и титруют их содержимое из бюретки раствором гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,001 моль/дм<sup>3</sup> до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 секунд. Результаты титрования контрольной и опытной проб записывают.

Отбор проб и титрование проводят каждые 15 минут до тех пор, пока результаты титрования не будут одинаковыми в двух последних определениях. Это будет свидетельствовать об окончании процесса гидролиза.

Полученные данные используют для графического изображения процесса гидролиза жира в присутствии желчи и без нее. Для этого на оси абсцисс откладывают время гидролиза, а на оси ординат — количество щелочи (см<sup>3</sup>), израсходованной на каждое титрование.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Биологическое значение липидов в организме.
2. Состав и строение нейтральных липидов и фосфолипидов.
3. Переваривание липидов в желудочно-кишечном тракте животных. Роль желчных кислот.
4. Всасывание липидов и продуктов их гидролиза. Функция желчных кислот в этом процессе.
5. Распад липидов в тканях. Окисление глицерина.
6. Окисление высших жирных кислот:  $\beta$ -окисление — цикл Кнопа-Линена.
7. Биосинтез липидов в тканях. Синтез высших жирных кислот (цикл малоновой кислоты).
8. Синтез триглицеридов и фосфолипидов в тканях.
9. Синтез кетоновых тел (кетогенез) и холестерина.
10. Регуляция обмена липидов в организме животных.
11. Нарушения липидного обмена в животном организме.

## ТЕМА 14. ОБМЕН БЕЛКОВ

### Цель занятия:

- разобраться в процессах переваривания и всасывания простых и сложных белков;
- изучить основные этапы промежуточного обмена белков, аминокислот, хромо- и нуклеопротеинов;
- знать способы обезвреживания аммиака в организме, уметь писать соответствующие уравнения реакций;
- разобраться в вопросах регуляции и патологии обмена белков и аминокислот в организме.

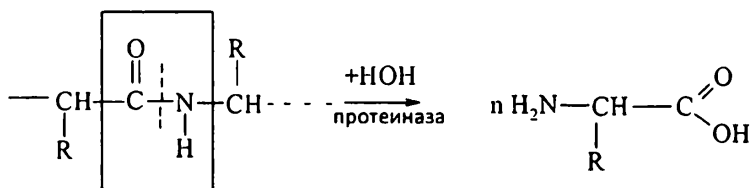
### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- провести исследования ферментативного гидролиза белков;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 14.1. Качественное открытие гидролиза белков ферментами

**Краткая теория к работе.** Гидролазы катализируют реакции распада органических соединений, протекающие с присоединением элементов воды. Один из важнейших подклассов гидролаз — пептидгидролазы, ускоряющие гидролиз пептидных связей в белках и пептидах.

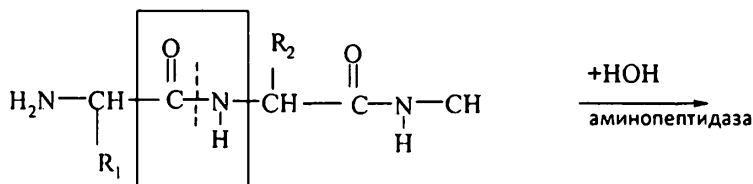
Среди пептидгидролаз различают *протеиназы* и *пептидазы*. Протеиназы по направленности своего действия являются эндопептидазами и расщепляют внутренние пептидные связи в белковой молекуле. В результате образуются пептиды, а при полном гидролизе — смесь аминокислот:



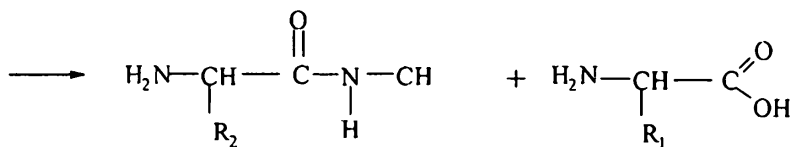
фрагмент молекулы белка

смесь аминокислот

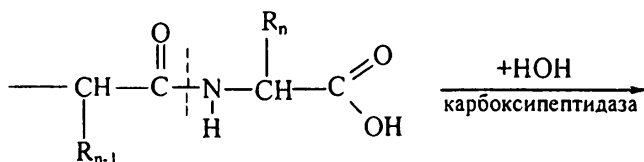
Пептидазы относятся к экзопептидазам и действуют на внешние пептидные связи, отщепляя при этом свободные аминокислоты. Химизм процесса можно выразить схемой:



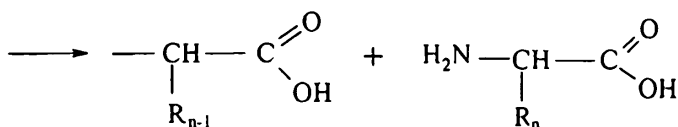
начало полипептидной цепи



N-концевая аминокислота



конец полипептидной цепи



C-концевая аминокислота



**Сущность метода.** В лабораторных условиях для гидролиза белка можно использовать ферментный препарат «Панкреатин». Это высушенный экстракт поджелудочной железы сельскохозяйственных животных. Наряду с другими ферментами панкреатин содержит протеиназы трипсин и химотрипсин.

В результате совместного действия трипсина и химотрипсина гидролизуются около 80% всех пептидных связей в молекуле белка.

**Оборудование и реактивы:**

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, цилиндр вместимостью 10 см<sup>3</sup> для отмеривания дистиллированной воды и панкреатина, термостат, вода дистиллированная;
- нежирный творог, 1%-ный раствор панкреатина.

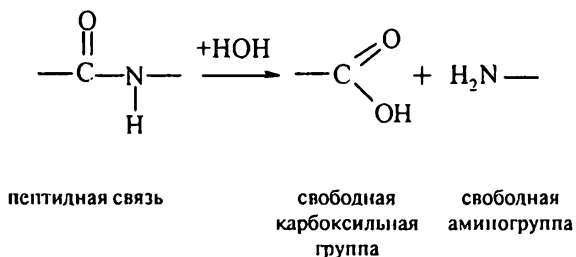
**Ход работы.** В две пробирки помещают по комочку нежирного творога размером с горошину. В первую пробирку добавляют 5...7 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, во вторую — такое же количество 1%-ного раствора панкреатина. Пробирки помещают в водяную баню или термостат при температуре 38 °С.

Спустя 1...2 часа наблюдают практически полное растворение исследуемого белка в пробирке с панкреатином.

## **14.2. Исследование динамики гидролиза белков под действием ферментного препарата «Панкреатин»**

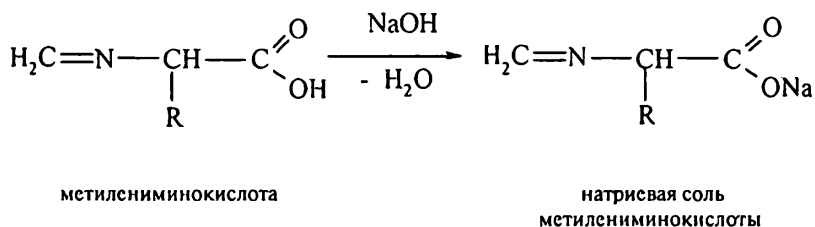
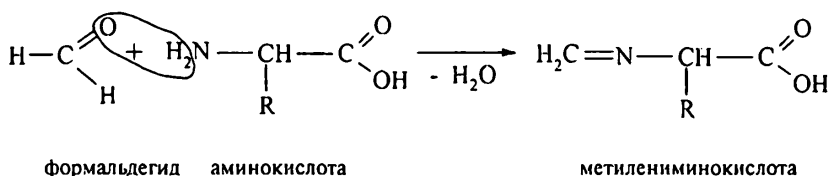
**Краткая теория к работе.** Гидролиз белков в организме протекает под влиянием группы пептидгидролаз — пепсин, трипсин, химотрипсин, амино- и карбоксипептидазы и др. Они содержатся в соках желудка, поджелудочной железы и кишечника. Важной особенностью этих ферментов является выборочный характер их действия на пептидные связи в белковой молекуле. Пепсин избирательно ускоряет гидролиз пептидных связей, образованных фенилаланином и лейцином. Трипсин осуществляет селективный гидролиз белка по пептидным связям у основных аминокислот аргинина и лизина, химотрипсин — у ароматических аминокислот фенилаланина, тирозина и триптофана. Аминопептидазы отщепляют N-концевые аминокислоты, а карбоксипептидазы ускоряют гидролиз C-концевых аминокислот.

Все эти ферменты осуществляют гидролитический разрыв пептидных связей с выделением свободных карбоксильных ( $-\text{COOH}$ ) и аминогрупп ( $-\text{NH}_2$ ):



**Сущность метода.** Степень распада белка при действии на него ферментов можно проследить по увеличению количества  $\alpha$ -аминовых групп, освобождающихся при гидролизе пептидных связей. Чем больше освободилось аминогрупп, тем больше распалось пептидных связей и тем выше, следовательно, степень деструкции белковой молекулы.

Для контроля динамики образующихся  $\alpha$ -аминовых групп используют метод формального титрования. Химизм метода заключается в связывании  $\text{NH}_2$ -групп формалином и нейтрализации карбоксильных групп иминокислот щелочью:



#### **Оборудование и реактивы:**

- конические колбы вместимостью 100 и 200 см<sup>3</sup>, пипетки Мора вместимостью 10 см<sup>3</sup> и 50 см<sup>3</sup>, автомат вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания формальдегида, бюретка вместимостью 10 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>, термостат;
- раствор исследуемого белка, 1%-ный раствор панкреатина, 30%-ный раствор формальдегида, 1%-ный раствор фенолфтаleiна, раствор гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы.** В коническую колбу вместимостью 200...250 см<sup>3</sup> пипеткой вносят 50 см<sup>3</sup> раствора исследуемого белка и 50 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора панкреатина. Содержимое хорошо перемешивают, пипеткой отбирают 10 см<sup>3</sup> смеси и вносят в коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> для титрования. Рабочую колбу закрывают пробкой и помещают в термостат с температурой 38 °С. Время начала опыта записывают.

В колбу для титрования к смеси белка и панкреатина автоматом добавляют 1 см<sup>3</sup> 30%-ного раствора формальдегида, 1 каплю 1%-ного раствора фенолфтаleiна и титруют содержимое из бюретки раствором гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup> до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 минуты. Записывают объем щелочи, израсходованной на титрование пробы в начале опыта.

Через 15 минут после начала опыта рабочую колбу достают из термостата. После встряхивания из нее пипеткой отбирают 10 см<sup>3</sup> исследуемой смеси и вносят в коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> для титрования. Сюда же автоматом добавляют 1 см<sup>3</sup> 30%-ного раствора формальдегида, 1 каплю 1%-ного раствора фенолфтаleiна и титруют содержимое из бюретки раствором гидроксида натрия как в предыдущий раз. Записывают объем щелочи, израсходованной на титрование второй пробы.

Рабочую колбу, закрытую пробкой, возвращают в термостат, а отбор проб проводят каждые 15 минут до тех пор, пока результаты титрования не будут одинаковыми в двух последних определениях. Это будет свидетельствовать об окончании процесса гидролиза белка.

Полученные данные используют для построения графика, отражающего процесс гидролиза белка под действием ферментного

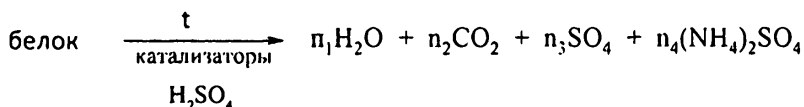
препарата «Панкреатин». Для этого на оси абсцисс откладывают время гидролиза (мин), а на оси ординат — количество щелочи (см<sup>3</sup>), израсходованной на каждое титрование.

### 14.3. Определение содержания азота в кормах методом Кьельдаля

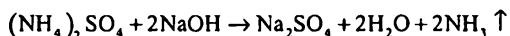
**Краткая теория к работе.** Определение азота методом Кьельдаля основано на способности органических соединений при нагревании с концентрированной серной кислотой окисляться до углекислого газа и воды. Азот белковых и близких к ним веществ при этом освобождается в форме аммиака и улавливается серной кислотой с образованием сернокислого аммония.

**Сущность метода.** Количественный метод определения азота по Кьельдалю включает три этапа.

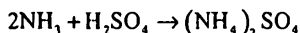
Первый этап называют *сжигание белка*. Его можно описать следующим суммарным уравнением:



Следующий этап — выделение аммиака из сульфата аммония с помощью гидроксида натрия:



Заключительный этап — *улавливание аммиака*, выделяющегося из сульфата аммония, путем связывания серной кислотой:



Для выделения и улавливания аммиака собирают специальную установку (рис. 13), в которую входят приемная колба (1), холодильник Либиха (2), перегонная колба (3), каплеуловитель с газоотводной трубкой (4) и электроплитка (5).

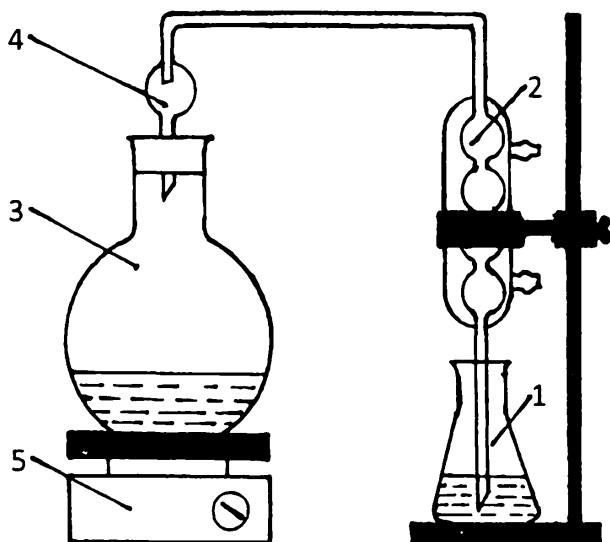
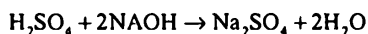


Рис. 13. Установка для выделения и улавливания аммиака

Избыток серной кислоты оттитровывают раствором гидроксида натрия:



#### Оборудование и реактивы:

- весы лабораторные технические, колба Кьельдаля вместимостью 100 см<sup>3</sup>, цилиндры вместимостью 25, 100 и 250 см<sup>3</sup>, конические колбы вместимостью 300 и 1000 см<sup>3</sup>, бюретка вместимостью 50 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>, баня песчаная, шкаф вытяжной, холодильник Либиха, каплеуловитель, красная лакмусовая бумажка, вода дистиллированная;
- концентрированная серная кислота плотностью 1840 кг/м<sup>3</sup>, металлический селен или сульфат меди, раствор серной кислоты с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, индикатор Таширо, 33%-ный раствор гидроксида натрия, раствор гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы.** На аналитических весах отвешивают 1 г воздушносухого или 5 г свежего растительного материала и помещают в грушеобразную круглодонную колбу Кьельдаля вместимостью 100 см<sup>3</sup>. Из цилиндра заливают навеску в колбе 10...15 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты плотностью 1840 кг/м<sup>3</sup> и оставляют для взаимодействия на 12...24 часа.

После выдержки в колбу добавляют катализаторы (0,1 г металлического селена или 0,5 г сульфата меди) и помещают ее в вытяжной шкаф на нагревательный прибор. Колба должна находиться в наклонном положении под углом 40...60°. В горлышко колбы вставляют маленькую воронку или полую стеклянную пробку и начинают постепенно, во избежание вспенивания, нагревать содержимое колбы. С появлением белых паров сернистого газа нагревание усиливают. Кипячение проводят до полного обесцвечивания и образования прозрачного раствора, которое достигается при окончательном сжигании образца.

При сжигании на горлышке колбы могут оставаться капли темного неозоленного вещества. Для их удаления колбу в процессе нагревания периодически поворачивают, чтобы смыть капли конденсатом, стекающим по стенкам колбы. Если темные капли не удаляются таким образом, то после охлаждения колбы их смывают ее содержимым и продолжают сжигание до полного обесцвечивания.

После окончательного озоления, которое достигается через 3...6 часов, приступают к выделению и улавливанию аммиака. Для этого собирают установку с холодильником Либиха.

Начинают с подготовки приемной колбы вместимостью 300 см<sup>3</sup>. В нее вносят 4 капли индикатора Таширо и 50 см<sup>3</sup> раствора серной кислоты с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>. Раствор окрасится в фиолетовый цвет. Колбу помещают под холодильник, конец которого погружают в раствор приемной колбы.

Затем готовят перегонную колбу вместимостью 1000 см<sup>3</sup>. В нее *количественно* переносят содержимое колбы Кьельдаля. Для этого цилиндром отмеряют 200 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, которой порциями в 3...4 приема ополаскивают стенки колбы Кьельдаля. Промывные воды сливают в перегонную колбу. Сюда же вносят немного талька (или пемзы) для равномерного кипения раствора, красную лакмусовую бумажку и цилиндром 100 см<sup>3</sup> 33%-ный раствор гидроксида натрия. Лакмусовая бумажка должна посинеть, указывая на щелочную реакцию среды. Если этого не происходит,

то добавляют еще щелочи, так как в кислой среде аммиак не выделяется.

После внесения щелочи колбу немедленно закрывают пробкой с каплеуловителем и газоотводной трубкой, которая соединена с холодильником Либиха. Колбу ставят на электроплитку, нагревают и кипятят в течение 40 минут.

Затем проверяют конец отгонки аммиака. Для этого холодильник поднимают над приемной колбой и стекающими из него каплями смачивают красную лакмусовую бумажку. Если она синее, то выделение аммиака не завершилось. В таком случае конец холодильника снова опускают в раствор и продолжают отгонку еще 5...10 минут. Если лакмусовая бумажка не меняет цвет, отгонку прекращают.

Далее содержимое приемной колбы титруют из бюретки раствором гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> до перехода окраски одной капли раствора из фиолетовой в зеленую. При этом количество раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование, равно избытку серной кислоты в приемной колбе.

Массовую долю азота в образце вычисляют по формуле:

$$W_N = \frac{(V_K \cdot T_K - V_{щ} \cdot T_{щ}) \cdot 0,0014}{m} \cdot 100,$$

где  $W_N$  — массовая доля азота в образце, %;

$V_K$  — объем раствора серной кислоты в приемной колбе до отгонки, см<sup>3</sup>;

$T_K$  — поправочный коэффициент к титру раствора серной кислоты;

$V_{щ}$  — объем раствора гидроксида натрия, израсходованного на титрование серной кислоты, см<sup>3</sup>;

$T_{щ}$  — поправочный коэффициент к титру раствора гидроксида натрия;

0,0014 — количество азота, соответствующее 1 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>;

$m$  — масса растительного материала, взятого на исследование, г;

100 — коэффициент пересчета на 100 г продукта.

#### 14.4. Определение общего белка в кормах

Краткая теория к работе. В практике часто приходится устанавливать белковость кормов и оценивать их по этому показателю. Белки характеризуются строго определенным элементарным составом. Они

содержат углерода 50...55%, водорода 6,5...7,3%, кислорода 21...24%, азота 15...18%, серы до 2,4% и золы до 0,5%.

Особенно характерный показатель — процентное содержание азота. В большинстве случаев оно составляет 16%, поэтому по содержанию белкового азота часто вычисляют содержание белка в кормах и продуктах питания. Если содержание всего белка в образце принять за 100%, а содержание азота — за 16%, тогда количество белка можно вычислить по формуле:

$$B = \frac{N \cdot 100}{16} = N \cdot 6,25,$$

где  $B$  — массовая доля белка в образце, %;

$N$  — массовая доля азота в образце, %;

6,25 — коэффициент пересчета общего азота на белок.

Таким образом находят количество так называемого «сырого протеина».

Чистого белка в растениях всегда бывает несколько меньше, чем «сырого протеина», поскольку часть азота входит в состав небелковых азотистых соединений. Поэтому для устранения этой неточности рекомендуется вводить поправочный коэффициент 0,95.

**Сущность метода.** Для точной оценки кормов на содержание белков необходимо проводить определение в них белкового азота. Для этого пользуются количественным методом определения азота по Кьельдалю.

Коэффициент пересчета общего азота на белок разных культур неодинаков. При анализе семян кукурузы, гречихи, фасоли его принимают равным 6,00; при анализе зерна пшеницы, овса, ржи, ячменя, гороха, бобов — 5,70; при анализе семян подсолнечника, льна, хлопчатника, земляного ореха, клешевины, люпина — 5,50.

Окончательный расчет белка проводят по формуле:

$$B = N \cdot K \cdot 0,95,$$

где  $B$  — массовая доля белка в образце, %;

$N$  — массовая доля азота в образце, %;

$K$  — коэффициент пересчета общего азота на белок;

0,95 — поправочный коэффициент на наличие небелковых азотистых соединений.



**В среднем содержание белка в кормах следующее:**

Наименование кормов	Содержание белка, %
<b>Зеленые</b>	
Преимущественно злаковые	2,7
Преимущественно бобовые	3,8
Кормовая капуста	2,3
<b>Силосованные</b>	
Злаковые растения	2,4
Бобовые растения	3,9
<b>Корне- и клубнеплоды</b>	
Свекла кормовая	1,2
Картофель	2,5
<b>Грубые</b>	
Сено злако-бобовое	9,4
Солома овсяная	3,0
<b>Концентраты</b>	
Мука овсяная	11,5
Мука ржаная	11,0
Жмых подсолнечниковых	39,3

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Биологическая ценность белков.
2. Переваривание и всасывание белков в желудочно-кишечном тракте моногастричных животных.
3. Особенности переваривания белков у жвачных животных.
4. Биохимические процессы в толстом отделе кишечника. Гниение белков и пути обезвреживания продуктов распада.
5. Распад белков до аминокислот в тканях. Тканевые протеиназы.
6. Общие пути распада аминокислот до конечных продуктов (дезаминирование, декарбоксилирование, распад углеродного скелета).
7. Пути распада отдельных аминокислот.

8. Образование небелковых азотистых соединений. Синтез мочевины (орнитиновый цикл) и другие пути обезвреживания аммиака.
9. Биосинтез аминокислот в организме животных.
10. Биосинтез белков в организме животных. Роль нуклеиновых кислот в данном процессе.
11. Обмен хромопротеинов. Распад гемоглобина в тканях.
12. Обмен нуклеопротеинов. Распад нуклеиновых кислот в тканях.
13. Регуляция и нарушения обмена белков и аминокислот в организме животных.
14. Баланс азота и его разновидности.

## ТЕМА 15. БИОХИМИЯ КРОВИ

### Цель занятия:

- изучить биохимические показатели плазмы крови;
- разобраться в особенностях клеток крови;
- знать основные функции крови.

### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- провести определение массовой доли белка, кальция, сахара и резервной щелочности в сыворотке крови;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 15.1. Определение массовой доли белка в сыворотке крови рефрактометрическим методом

Краткая теория к работе. Общее содержание белков крови млекопитающих колеблется в пределах 6...8%. Плазма крови содержит около 100 различных белковых компонентов. Условно их можно разделить на три основные группы: альбумины, глобулины и фибриноген. Белки плазмы, которые остались после удаления фибриногена, называют сывороточными белками крови. Их содержание (%) у различных животных неодинаково [9]:

Животное	Общий белок	Альбумины	Глобулины
Крупный рогатый скот	7,4	3,3	4,1
Лошадь	7,3	2,7	4,6
Овца	6,8	2,7	4,1
Свинья	8,0	3,5	4,5
Кролик	6,2	4,4	1,8
Курица	4,1	1,2	2,9

Соотношение между содержанием альбуминов и глобулинов определяется альбумино-глобулиновым коэффициентом — А/Г. В норме А/Г у лошади равен 0,6, у овцы — 0,7...0,9, у крупного рогатого скота — 0,7...1,0, у свиньи — 0,7...1,0. Альбумино-глобулиновый коэффициент изменяется в течение всей жизни животного, а также при беременности, в различные периоды продуктивности, при интенсивной работе и при патологии.

Альбумины сыворотки крови участвуют в транспортировании многих веществ: углеводов, жирных кислот, витаминов, билирубина, неорганических ионов и др. Кроме этого, они обуславливают около 88% онкотического давления, участвуют в регуляции pH, водного и минерального обмена.

Глобулины сыворотки крови подразделяют на  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -фракции. Так,  $\alpha$ - и  $\beta$ -глобулины участвуют в транспортировании к клеткам нерастворимых в воде липидов, стероидных гормонов, витаминов А, D, Е, К и связывают более 2/3 холестерина крови. В состав  $\alpha$ -глобулинов входят некоторые ферменты, протромбин и др. Фракция  $\beta$ -глобулинов включает трансферрины, антигемофильный глобулин и др.

Фракция  $\gamma$ -глобулинов содержит специфические белки — антитела. По химической природе их можно отнести к гликопротеинам. Антитела появляются в крови в первые дни постнатальной жизни. По иммунологическому действию они могут быть лизинами (растворяют чужеродные клетки), антитоксинами (нейтрализуют токсины), агглютинидами (связывают чужеродные белки), преципитинами (образуют осадки с антигенами) и др. Содержание антител возрастает при многих инфекционных и инвазионных заболеваниях.

$\gamma$ -Глобулины, полученные из сыворотки здоровых или иммунизированных животных, применяются с профилактической и лечебной целями.

Содержание белков в крови может снижаться или повышаться против нормы.

Гипопротеинемия — уменьшение общего содержания белков в крови. Чаще всего она возникает при недостаточном поступлении белков с кормами, нарушении пищеварения и всасывания их, нарушении синтеза белков в организме и в случае выделения их почками. Причиной гипопротеинемии могут быть поражение печени, большие кровопотери, истощающие заболевания (туберкулез, злокачественные опухоли, хронические нагноительные процессы и др.). При гипопротеинемии снижается в основном альбуминовая

фракция белков; содержание глобулинов уменьшается в меньшей степени.

Гиперпротеинемия — увеличение содержания белков в плазме крови — чаще бывает на почве сгущения крови, например при тяжелых ожогах и других процессах, сопровождающихся значительной потерей воды. В таких случаях равномерно увеличены все фракции белка.

Количество глобулинов в плазме крови увеличивается при голодании и инфекционных болезнях. При иммунизации в крови резко повышается содержание  $\gamma$ -глобулинов. Однако увеличение их содержания в крови не всегда связано с нарастанием уровня антител. В крови может возрастать содержание неспецифических  $\gamma$ -глобулинов, увеличение которых может происходить даже на фоне снижения уровня специфических антител.

**Сущность метода.** Рефрактометрия — это один из оптических методов анализа. Он основан на свойстве светового луча при прохождении через различные среды отклоняться от своего прямолинейного пути на больший или меньший угол, в зависимости от состава среды. Например, световой луч (1) при прохождении через слой раствора (2) преломляется и изменяет свое направление (3) (рис. 14).

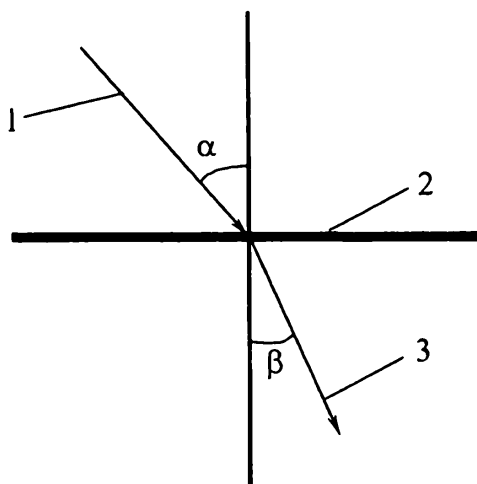


Рис. 14. Схема прохождения светового луча через слой раствора

Таким образом, по величине угла отклонения светового луча при прохождении через исследуемый раствор судят о концентрации растворенных веществ.

Изменение направления падающего луча называют *преломление*, или *рефракция*. Количественно это явление характеризуется показателем преломления раствора. Показателем преломления ( $n$ ) называется отношение синуса угла падения луча к синусу угла его преломления:

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$$

Показатель преломления — постоянная вещества при определенной температуре и определенной длине волны. Показатель преломления раствора складывается из показателей преломления всех входящих в раствор веществ. В частности, показатель преломления сыворотки крови состоит из показателей преломления воды, белков, минеральных веществ, углеводов, липидов и др. Однако концентрация белков в сыворотке крови превышает концентрации других составных частей, показателями преломления которых можно пренебречь. В таком случае по показателю преломления сыворотки крови можно судить о содержании в ней белков.

Приборы, служащие для измерения показателя преломления, называются *рефрактометрами*. Существует несколько систем рефрактометров. Их устройство и техника работы подробно описаны в приложениях к приборам.

В данной работе используется рефрактометр ИРФ-454. Он состоит из нескольких рабочих элементов. Снаружи находятся осветительная и измерительная призмы и окуляр. Система линз и компенсатор, предотвращающий образование спектра, встроены внутрь прибора.

Принципиальная схема рефрактометра (рис. 15) включает источник света (1), осветительную (2) и измерительную (3) призмы, линзы (4), компенсатор (5) и окуляр (6).

В окуляре наблюдают поле светотени, визирные линии и шкалу показателя преломления.

Рефрактометрический метод обладает достаточной точностью, прост и надежен, поэтому он широко применяется для определения концентрации белков в сыворотке крови, лимфе, молоке и других биологических жидкостях.

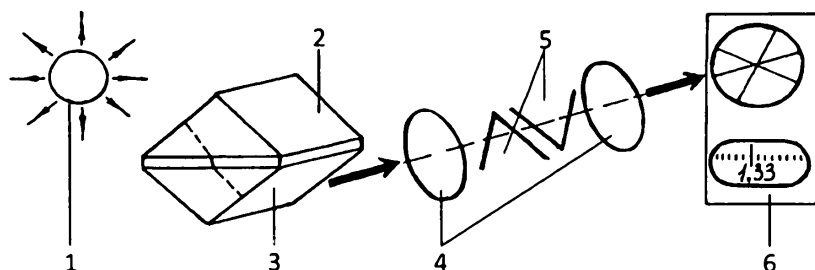


Рис. 15. Принципиальная схема рефрактометра

#### Оборудование и реактивы:

- рефрактометр, стакан химический вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>, палочки стеклянные, салфетки ватные или марлевые;
- сыворотка крови, вода дистиллированная.

**Ход работы.** Перед началом анализа проверяют настройку рефрактометра по воде. Для этого на нижнюю измерительную призму стеклянной палочкой наносят несколько капель дистиллированной воды, так чтобы была смочена вся поверхность. Верхнюю осветительную призму осторожно опускают на нижнюю. Окно осветительной призмы должно быть открыто, а окно измерительной призмы закрыто зеркалом, поскольку анализ прозрачных жидкостей проводят в проходящем свете.

Отклоняя и вращая боковое зеркало на левой панели рефрактометра, освещают поле зрения и шкалу. Вращая окуляр вокруг оси, устанавливают его «на резкость» так, чтобы отчетливо были видны светлое (вверху) и темное (внизу) поля, а также перекрестие визирных линий. С помощью дисперсионного винта убирают радужную границу, а с помощью регулировочного винта совмещают границу света и тени с точкой пересечения визирных линий. При совпадении границы светотени с перекрестием визирных линий отсчитывают показатель преломления на шкале.

Показатель преломления дистиллированной воды при правильной установке прибора при 22 °С составляет 1,3328. После настройки обе призмы вытирают насухо ватным или марлевым фильтром.

Далее с помощью стеклянной палочки на измерительную призму наносят несколько капель сыворотки крови и повторяют те же операции, что и при настройке рефрактометра по воде. Измерения

выполняют 3...5 раз и находят среднее арифметическое значение показателя преломления сыворотки крови, которое переводят в массовую долю белка по таблице:

<i>Показатель преломления сыворотки крови</i>	<i>Массовая доля белка в сыворотке крови, %</i>	<i>Показатель преломления сыворотки крови</i>	<i>Массовая доля белка в сыворотке крови, %</i>	<i>Показатель преломления сыворотки крови</i>	<i>Массовая доля белка в сыворотке крови, %</i>
1,3431	4,16	1,3472	6,55	1,3513	8,92
1,3435	4,38	1,3476	6,77	1,3517	9,14
1,3439	4,60	1,3480	6,98	1,3520	9,35
1,3443	4,81	1,3484	7,20	1,3524	9,57
1,3446	5,03	1,3487	7,42	1,3528	9,78
1,3450	5,25	1,3491	7,63	1,3532	9,99
1,3454	5,47	1,3495	7,85	1,3535	10,20
1,3457	5,68	1,3498	8,06	1,3539	10,41
1,3461	5,90	1,3502	8,28	1,3542	10,62
1,3465	6,12	1,3506	8,49	1,3546	10,83
1,3469	6,34	1,3509	8,71	1,3550	11,04

## 15.2. Определение массовой доли глюкозы в крови фотоколориметрическим методом

**Краткая теория к работе.** В крови находятся глюкоза, гликоген, молочная кислота и другие продукты обмена углеводов. У большинства видов животных, особенно у свиней, содержание глюкозы в эритроцитах меньше, чем в плазме. Гликоген находится преимущественно в лейкоцитах.

Гипергликемия — повышенное содержание глюкозы в крови — возникает при чрезмерном потреблении животными легкоусвояемых углеводов с кормом (алиментарная гипергликемия), расстройстве нервной и гормональной регуляции обмена углеводов. В основе гипергликемии могут лежать нарушения в эндокринной системе, например



гипофункция островкового аппарата поджелудочной железы. Гипергликемия может возникнуть вследствие воспалительных и дистрофических поражений печени.

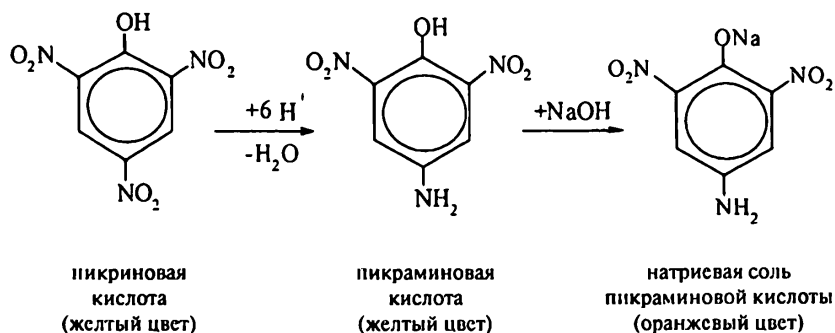
Гипогликемия — низкий уровень сахара в крови. Такое состояние наблюдают при хроническом недокармливании, избыточном поступлении в кровь или введении извне инсулина, гипофункции надпочечников, гипофиза, щитовидной железы.

Наиболее распространенный способ определения концентрации сахара крови по Хагедорну—Йенсену довольно громоздкий и трудоемкий.

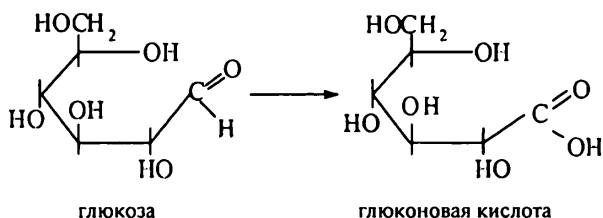
Предлагаемая методика с использованием фотоэлектроколориметра ускоряет исследование, уменьшает затраты реактивов, обеспечивает более точные результаты и может считаться экспресс-методом. Вот почему она находит широкое применение в зооинженерной, ветеринарной практике и других исследованиях.

**Сущность метода.** Один из методов определения сахара в крови — колориметрический. Он основан на определении оптической плотности окрашенного раствора.

В данной работе красящим агентом служит пикриновая кислота, имеющая желтый цвет. В присутствии восстанавливающих агентов пикриновая кислота переходит в пикраминовую, которая с гидроксидом натрия дает соль ярко-оранжевого цвета. Эти превращения можно описать следующей схемой:



Источником атомов водорода в данной реакции служит глюкоза, которая путем окислительного дегидрирования превращается в глюконовую кислоту:



Такое превращение глюкозы возможно только в присутствии акцептора водорода, роль которого выполняет пикриновая кислота.

Оптическую плотность исследуемых растворов определяют на фотоэлектроколориметре, принципиальная схема которого (рис. 16) включает источник света (1), диафрагму (2), светофильтр (3), кювету с анализируемым раствором (4), фотоэлемент (5) и микроамперметр (6).

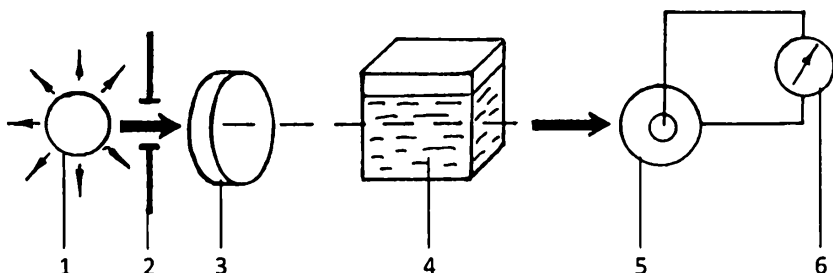


Рис. 16. Принципиальная схема фотоэлектроколориметра

#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, пипетки градуированные вместимостью 2 и 5 см<sup>3</sup>, воронка, фильтр бумажный, баня водяная закрытого типа, флаконы пенициллиновые вместимостью 10 см<sup>3</sup>, фотоэлектроколориметр, вода дистиллированная;
- раствор 1,2%-ной пикриновой кислоты, 10%-ный раствор гидроксида натрия.

**Ход работы.** В пробирку пипетками вносят 3,6 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, 0,4 см<sup>3</sup> сыворотки крови и 2 см<sup>3</sup> раствора 1,2%-ной пикриновой кислоты. Смесь встряхивают и фильтруют через складчатый фильтр в другую пробирку.

Пипеткой переносят 2 см<sup>3</sup> фильтрата в пенициллиновый флакон. К фильтрату добавляют из пипетки 0,4 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия. Флакон закрывают пробкой, несколько раз переворачивают для перемешивания жидкости и ставят в водяную баню. Баню доводят до кипения и кипятят в ней флакон в течение 5 минут. Затем флакон охлаждают вместе с баней и через 20 минут измеряют оптическую плотность на фотоэлектроколориметре.

Параллельно готовят холостую пробу, где вместо крови вносят 0,4 см<sup>3</sup> дистиллированной воды.

Перед началом работы фотоэлектроколориметр включают в электрическую сеть и выдерживают 30 минут при открытом кюветном отделении.

Колориметрирование проводят в кюветах длиной 5 мм. Оптическую плотность измеряют при длине волны 590 нм и чувствительности колориметра «2» или «3».

Раствор из контрольной пробы наливают в кювету и ставят ее в заднее гнездо кюветодержателя. Опытный раствор из пенициллинового флакона переливают в другую кювету и помещают ее в переднее гнездо. Пропускают световой поток через контрольную пробу и закрывают крышку кюветодержателя.

Переводят ручки «Установка 100 грубо» и «Точно» в крайнее левое положение. Ручками «Чувствительность», «Установка 100 грубо» и «Точно» устанавливают отсчет 100% по шкале коэффициентов пропускания «Т,%».

Поворотом ручки кюветодержателя перемещают кювету с опытным раствором в световой поток и снимают показания оптической плотности по шкале «Д» в единицах оптической плотности. Измерения проводят 2 раза и рассчитывают среднее арифметическое значение оптической плотности.

По величине оптической плотности находят соответствующую концентрацию сахара крови. Для этого пользуются градуировочным графиком, который строят на основании измерений оптической плотности колориметрируемой жидкости с различным содержанием сахара.

### **15.3. Определение массовой доли кальция в сыворотке крови трилонометрическим методом**

**Краткая теория к работе.** Физиологически активной является ионизированная часть кальция. Она составляет 45...55% содержания общего кальция крови. Неионизированный кальций связан с белками

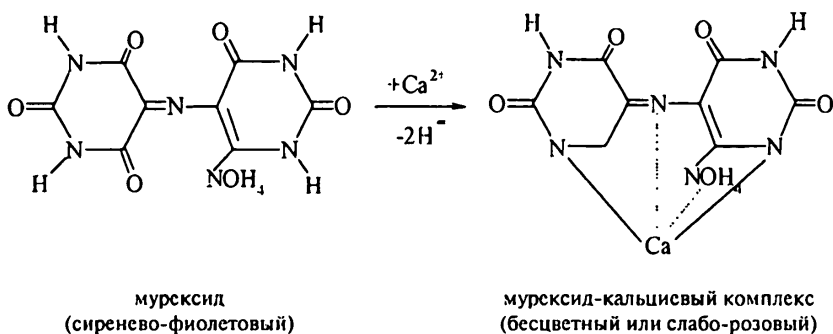
сыворотки крови. Соли кальция способствуют уплотнению клеточных и тканевых мембран.

Резкое понижение уровня кальция в крови происходит при недостаточной функции паращитовидных желез. Поскольку часть этого микроэлемента в крови связана с белками, уменьшение его содержания может быть следствием гипопроteinемии. Уровень кальция в крови снижается при нефритах, родильном парезе, анемиях, расстройствах всасывания его в кишечнике, например при хронических поносах. При недостаточности кальция увеличивается проницаемость кровеносных сосудов, повышается возбудимость центральных и периферических нервных аппаратов.

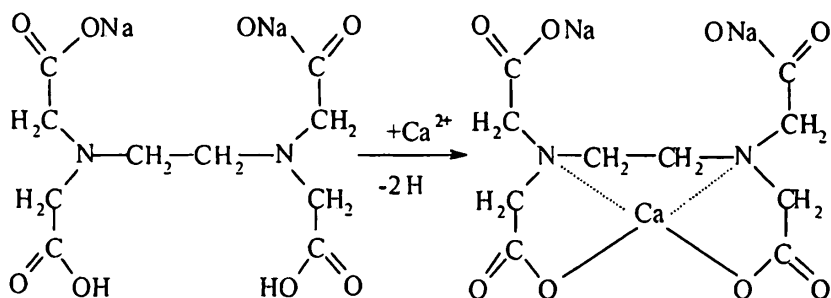
В норме содержание кальция в сыворотке крови составляет у коров 10...14 мг%, у овец — 10...14 мг%, у свиней — 11...13 мг%.

**Сущность метода.** Метод основан на способности кальция к образованию комплексов с различными соединениями. В данной работе используются два комплексообразователя: мурексид и трилон-Б.

Мурексид — это аммонийная соль пурпуровой кислоты (или пурпурат аммония). В свободном виде он окрашен в розовый цвет в кислой среде и в сиренево-фиолетовый — в щелочной. С кальцием мурексид образует бесцветный или слабо-розовый комплекс:



Трилон-Б — это динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты. С кальцием трилон-Б образует более прочные комплексы, чем мурексид. Вот почему при добавлении трилона-Б к мурексид-кальциевому комплексу последний распадается. В результате кальций образует бесцветное внутрикомплексное соединение с трилоном-Б, а свободный мурексид, окрашенный в сиренево-фиолетовый цвет, выполняет роль индикатора:



трилон-Б

трилон-Б-кальциевый комплекс

#### Оборудование и реактивы:

- конические колбы вместимостью 100 см<sup>3</sup>, цилиндр мерный вместимостью 50...100 см<sup>3</sup>, пипетки градуированные вместимостью 1 см<sup>3</sup>, микробюретка вместимостью 2 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,01 см<sup>3</sup>, вода дистиллированная;
- раствор гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 9 моль/дм<sup>3</sup>, мурексид, раствор трилона-Б с эквивалентной концентрацией 0,0036 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы.** В коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> цилиндром наливают 50 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, из пипетки вносят 0,4 см<sup>3</sup> гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 9 моль/дм<sup>3</sup> и на кончике шпателя несколько крупинок мурексида. Жидкость окрашивается в сиренево-фиолетовый цвет (в зависимости от количества внесенного мурексида).

Половину этой жидкости отливают в другую коническую колбу такой же вместимости. Раствор в первой колбе служит эталоном окраски (контроль). В раствор во второй колбе вносят из пипетки 1 см<sup>3</sup> сыворотки крови (опыт) и перемешивают жидкость осторожными круговыми движениями во избежание пенообразования. При этом жидкость в колбе окрашивается в бледно-розовый цвет в связи с образованием мурексид-кальциевого комплекса.

Далее содержимое опытной колбы титруют из микробюретки раствором трилона-Б с эквивалентной концентрацией 0,0036 моль/дм<sup>3</sup> до сиренево-фиолетового окрашивания как в эталоне.

Содержание кальция вычисляют по формуле:

$$W = \frac{V \cdot 0,072}{V_c} \cdot 100,$$

где  $W$  — содержание кальция, мг%;

$V$  — объем раствора трилона-Б, израсходованного на титрование, см<sup>3</sup>;

$V_c$  — объем сыворотки крови, взятой для исследования, см<sup>3</sup>;

0,072 — количество кальция, соответствующее 1 см<sup>3</sup> раствора трилона-Б с эквивалентной концентрацией 0,0036 моль/дм<sup>3</sup>, мг;

100 — коэффициент пересчета на 100 г сыворотки крови.

#### **15.4. Определение резервной щелочности крови по Раевскому**

**Краткая теория к работе.** Нормальное течение жизненных процессов возможно при постоянном показателе рН среды в крови и тканях. Даже незначительное изменение рН среды вызывает изменение активности ферментов и нарушение течения биохимических процессов. Известно, что смещение рН крови на 0,5 единицы приводит к агонии [1, 30]. Поэтому допустимые физиологические колебания рН крови не превышают 0,05...0,07 единицы.

В процессе жизнедеятельности постоянно образуются кислые и основные промежуточные продукты. Однако кислоты и основания, попадая в кровь, не изменяют рН крови благодаря наличию регуляторных механизмов — буферных систем.

Буферной называют систему, способную стойко удерживать рН среды при добавлении небольших количеств сильной кислоты или щелочи или при разведении (разбавлении).

Буферными свойствами обладают двухкомпонентные системы, состоящие из слабой кислоты и избытка сопряженного с ней основания (I тип) или из слабого основания и избытка сопряженной с ним кислоты (II тип).

В животных организмах есть несколько буферных систем, которые обеспечивают постоянство рН внутри клеток и во внеклеточных жидкостях. По локализации их подразделяют на плазменные и клеточные.

К плазменным буферным системам относятся гидрокарбонатная, фосфатная и белковая:

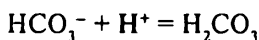
$\frac{\text{H}_2\text{CO}_3}{\text{NaHCO}_3}$	$\frac{\text{NaH}_2\text{PO}_4}{\text{Na}_2\text{HPO}_4}$	$\frac{\text{R-COOH}}{\text{R-COONa}}$
гидрокарбонатная	фосфатная	белковая

К клеточным (или эритроцитарным) буферным системам относятся гидрокарбонатная, гемоглобиновая и оксигемоглобиновая:

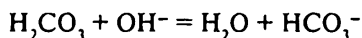
$\frac{\text{H}_2\text{CO}_3}{\text{KH}_2\text{CO}_3}$	$\frac{\text{HНб}}{\text{КНб}}$	$\frac{\text{HНбO}_2}{\text{КНбO}_2}$
гидрокарбонатная	гемоглобиновая	оксигемоглобиновая

Одна из главных буферных систем — гидрокарбонатная. Она состоит из угольной кислоты и ее натриевой соли. Физиологическое значение рН крови устанавливается при соотношении компонентов этой пары, равном 1/20.

Кислые реагенты, поступающие в кровь, связываются анионом, образуя слабо диссоциирующую угольную кислоту. В легких она распадается на воду и углекислый газ, удаляемый из организма с выдыхаемым воздухом:



Щелочные метаболиты нейтрализуются угольной кислотой гидрокарбонатной буферной системы:



В результате рН крови не изменяется ни в том, ни в другом случае.

Определенный запас гидрокарбонатов и других щелочнореагирующих веществ, необходимых для поддержания постоянства рН крови, называется *резервной щелочностью крови (РЩ)*.

Определение резервной щелочности имеет диагностическое значение, поскольку этот показатель изменяется при различных патологических состояниях животного.

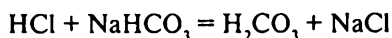
Понижение резервной щелочности называют *ацидозом*. При этом в организме накапливаются молочная, ацетоуксусная и β-оксимас-

ляная кислоты. Такие нарушения встречаются при нефритах, заболеваниях дыхательной и сердечно-сосудистой систем; неправильном кормлении высокомоложных коров в период раздоя, суягных овец с многоплодной беременностью, коз во время беременности; тяжелых интоксикациях, когда развивается кислородная недостаточность; при голодании и введении в рацион большого количества кислот и других состояниях.

Повышение резервной щелочности называют *алкалозом*. При этом в организме накапливаются щелочнореагирующие соединения. Алкалоз может возникнуть при гипофункции паращитовидных желез, когда у животных появляются тетанические судороги; при сильной рвоте из-за большой потери ионов хлора; при подъемах на большие высоты; при длительном действии ионизирующих излучений (рентгеновских, радиоактивных и др.). Однако в целом алкалоз выражен менее резко и встречается значительно реже, чем ацидоз. Объясняется это тем, что в процессе обмена веществ щелочных продуктов образуется гораздо меньше, чем кислот.

Понижение или повышение резервной щелочности, не сопровождающееся сдвигом pH, называется *компенсированным* ацидозом, или алкалозом, и свидетельствует об уменьшении резервных возможностей организма, его буферных систем противостоять поступлению кислот и щелочных продуктов обмена. Если кислотно-щелочное равновесие нарушается настолько, что организм не в состоянии сохранить pH в норме, то говорят о *некомпенсированном* ацидозе, или алкалозе.

**Сущность метода.** Метод основан на способности соляной кислоты выделять угольную кислоту из гидрокарбоната натрия:



В этом случае резервную щелочность выражают в единицах кислотной емкости, то есть количеством миллиграммов щелочи, идущей на нейтрализацию избытка кислоты, которую добавляют к крови. Расчет ведут на 100 см<sup>3</sup> крови, поэтому кислотная емкость выражается в мг% щелочи. В норме, рассчитанная в этих единицах резервная щелочность составляет для коров 540...600, для лошадей — 420...640, для овец — 440...540, для свиней — 450...660.

При использовании других методов резервная щелочность крови выражается в объемных процентах — количеством миллилитров выделяющейся двуокиси углерода на 100 см<sup>3</sup> плазмы.



### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, пипетка градуированная вместимостью 2 см<sup>3</sup>, микробюретка вместимостью 2 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,05 см<sup>3</sup>;
- 4%-ный раствор хлорида натрия, 1%-ный водный раствор индикатора ализаринового красного, раствор соляной кислоты с эквивалентной концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы.** Сначала готовят эталон окраски. Для этого в пробирку пипеткой вносят 2 см<sup>3</sup> 4%-ного раствора хлорида натрия и 1...2 капли 1%-ного водного раствора индикатора ализаринового красного. Затем добавляют в пробирку из микробюретки по каплям раствор соляной кислоты с эквивалентной концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup> до появления желтого окрашивания.

В рабочую пробирку пипетками вносят 2 см<sup>3</sup> 0,4%-ного раствора хлорида натрия, 0,2 см<sup>3</sup> сыворотки крови и 1...2 капли 1%-ного водного раствора индикатора ализаринового красного. Содержимое перемешивают и титруют из микробюретки по каплям раствором соляной кислоты с эквивалентной концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup> до перехода вишнево-красной окраски в желтую, как в эталоне.

Резервную щелочность вычисляют по формуле:

$$РЩ = \frac{V \cdot 0,4}{0,2} \cdot 100,$$

где *РЩ* — резервная щелочность крови, мг%;

*V* — объем раствора соляной кислоты, израсходованной на титрование рабочей пробы, см<sup>3</sup>;

0,2 — объем сыворотки крови, взятой для исследования, см<sup>3</sup>;

0,4 — масса гидроксида натрия, соответствующая 1 см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты с эквивалентной концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup>, мг.

### Вопросы для самоконтроля

1. Составные компоненты крови. СОЭ. Биохимические особенности форменных элементов крови.
2. Транспортная функция крови. Транспорт кислорода к тканям, кислородная емкость. Нарушение оксигенации.
3. Транспорт углекислого газа из тканей.
4. Осмотическое и онкотическое давление крови, регуляция. Изо-, гипо- и гипертонические растворы.

5. Понятие о буферных системах, буферной емкости.
6. Гидрокарбонатная буферная система крови.
7. Плазменные буферные системы крови.
8. Клеточные буферные системы крови.
9. Резервная щелочность крови. Ацидоз, алкалоз.
10. Защитная, иммунологическая и регуляторная функции крови.
11. Гемостатическая функция крови.
12. Обезвреживающая функция крови (пассивная и активная).
13. Белки плазмы крови и их биологическая роль.
14. Минеральные вещества плазмы крови и их биологические функции.
15. Небелковые азотистые и безазотистые вещества плазмы крови.

## ТЕМА 16. БИОХИМИЯ МОЧИ

### Цель занятия:

- освоить теоретический материал по физико-химическим свойствам и химическому составу мочи;
- знать классические методы определения составных частей мочи.

### Задачи занятия:

- изучить краткую теорию к работе, знать сущность и ход проведения опытов;
- определить плотность и наличие патологических компонентов в исследуемом образце мочи;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### 16.1. Определение плотности мочи

**Краткая теория к работе.** Плотность мочи складывается из плотности воды и плотностей составных частей мочи. С увеличением концентрации растворенных веществ плотность мочи возрастает.

В норме плотность мочи находится в тесной связи с количеством жидкости, отделяемой из организма. Плотность мочи изменяется при различных патологических состояниях. Резкое снижение плотности происходит при несахарном диабете и увеличение — при сахарном диабете.

У разных животных плотность мочи неодинакова и составляет: у крупного рогатого скота 1,025...1,050 г/см<sup>3</sup>, у коз — 1,015...1,065 г/см<sup>3</sup>, у овец — 1,055...1,070 г/см<sup>3</sup>, у лошадей — 1,025...1,055 г/см<sup>3</sup>, у свиней — 1,018...1,022 г/см<sup>3</sup>.

**Сущность метода.** Ареометрический метод определения плотности мочи является одним из самых простых и доступных. Он основан на законе Архимеда. В соответствии с этим законом на тело, погруженное в

жидкость, действует выталкивающая сила, равная весу вытесненной им жидкости.

Определение плотности мочи проводят с помощью специальных ареометров небольшого размера, называемых урометрами. Диапазон их измерения — от 1,010 до 1,075 г/см<sup>3</sup>.

#### **Оборудование и реактивы:**

- цилиндр вместимостью 100 см<sup>3</sup>, бумага фильтровальная, урометр с диапазоном измерения от 1,010 до 1,075 г/см<sup>3</sup>.

**Ход работы.** В сухой цилиндр вместимостью 100 см<sup>3</sup> наливают осторожно (во избежание образования пены) 80...85 см<sup>3</sup> исследуемой мочи. Если пена образуется, ее снимают фильтровальной бумагой. Затем в мочу опускают сухой и чистый урометр.

Производят отсчет по нижнему мениску жидкости, который должен находиться на уровне глаз. Показания плотности снимают с точностью до половины деления. Выполнив измерения, урометр достают из цилиндра, промывают дистиллированной водой, вытирают и убирают в пенал.

Определение плотности проводят при температуре, указанной на урометре. Если моча имеет другую температуру и привести ее к указанной почему-либо трудно, то на каждые 3 °С выше этой температуры нужно прибавить, а на каждые 3 °С ниже убавить по 0,001 от показания шкалы урометра.

## **16.2. Качественное определение белка в моче (проба Геллера)**

**Краткая теория к работе.** Белок в нормальной моче находится в виде ничтожно малых следов, которые не открываются обычными реакциями, применяемыми в клинической лаборатории.

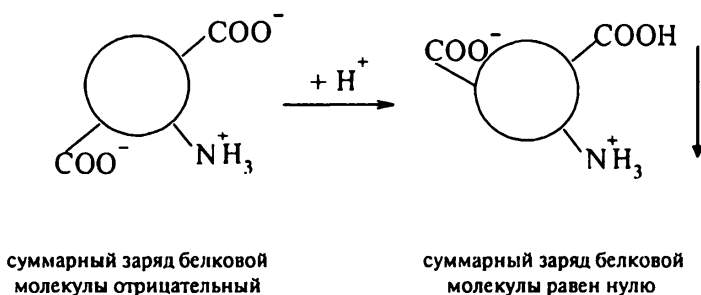
Появление белка в моче называют *протеинурия* или *альбуминурия*, поскольку моча содержит в основном сывороточный альбумин и лишь частично сывороточный глобулин.

Протеинурия может быть истинной или ложной. При истинной, или почечной, протеинурии белки сыворотки крови попадают в мочу через почки. Случайная, или ложная, протеинурия наблюдается при попадании в мочу слизи, крови, гноя и т. п. не из почек.

Белок появляется в моче при нефрите (воспалении сосудистых клубочков почек, когда увеличивается их проницаемость), при некоторых формах повышенного кровяного давления и иногда при беременности. Моча, содержащая белок, становится мутной.

**Сущность метода.** Для обнаружения белка в моче применяются реакции, основанные на его осаждении. Один из методов осаждения белков — действие неорганических кислот. Он основан на подавлении одноименного заряда белковых молекул и последующей их агрегации.

Альбумины — кислые белки. Их молекулы отрицательно заряжены. Погашение отрицательного заряда достигается добавлением протонов. В результате происходит подкисление среды до изоэлектрической точки (pH 4,6...4,7) по схеме:



#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, автомат вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания концентрированной азотной кислоты;
- концентрированная азотная кислота.

**Ход работы.** В пробе Геллера для осаждения белка используют концентрированную азотную кислоту, с которой надо работать очень осторожно.

В пробирку наливают с помощью автомата 1 см<sup>3</sup> концентрированной азотной кислоты и затем осторожно по стенке настилают примерно равный объем профильтрованной мочи так, чтобы жидкости не перемешивались.

При наличии белка на границе двух жидкостей появляется мутное, беловатое кольцо. Если содержание белка незначительное, то кольцо появляется не сразу, а спустя 2...3 минуты.

Проба с азотной кислотой высокочувствительна и позволяет обнаружить до 0,0033% белка.

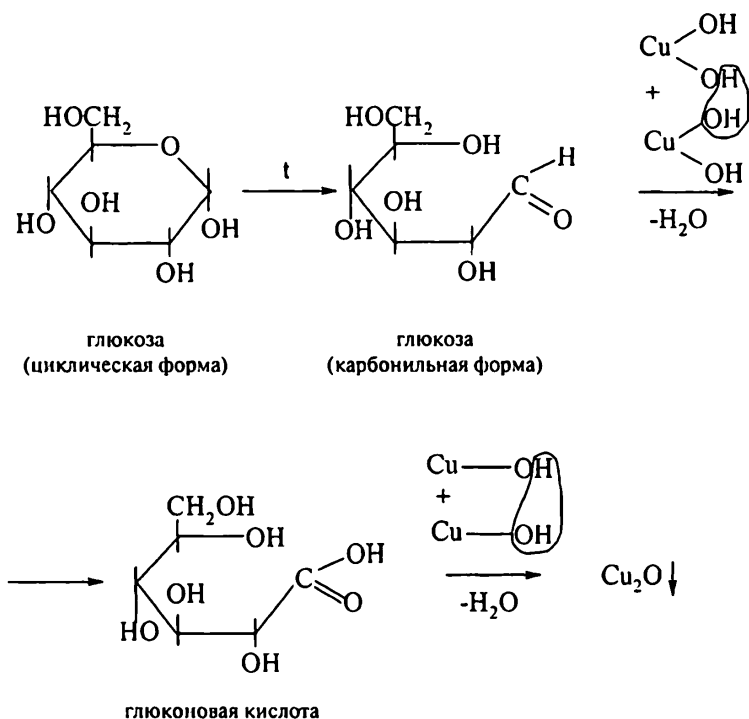
### 16.3. Качественное определение сахара в моче

**Краткая теория к работе.** В норме сахар с мочой выделяется в ничтожно малых количествах и обычными методами не открывается.

Появление сахара в моче в количествах, которые можно определять обычными клиническими методами, носит название *глюкозурия*. Моча содержит в основном глюкозу и реже фруктозу и галактозу.

Глюкозурия может быть временная (пищевая или эмоциональная) и патологическая. Патологическая глюкозурия наблюдается при сахарном диабете (в суточной моче может содержаться до 200...300 г глюкозы), заболевании почек и иногда при беременности.

**Сущность метода.** Для определения сахара в моче применяют качественные реакции на редуцирующие сахара, в частности пробу с реактивами Троммера или Фелинга. Эти методы основаны на окислении свободной альдегидной группы углеводов до кислотной за счет восстановления двухвалентной меди ( $\text{Cu}^{2+}$ ) до одновалентной ( $\text{Cu}^+$ ):



#### Оборудование и реактивы:

- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>, автоматы вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания гидроксида натрия, держатель для пробирок, спиртовка;
- 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди.

**Ход работы.** В пробирку наливают 2 см<sup>3</sup> исследуемой мочи, автоматом добавляют 1 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора гидроксида натрия и осторожно по каплям — 1%-ный раствор сульфата меди до появления голубого окрашивания.

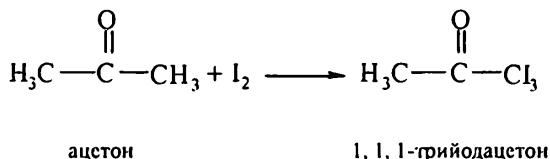
Закрепляют пробирку в держателе и на спиртовке нагревают верхний слой жидкости до начала кипения. При наличии сахара в моче появляется желто-красный осадок оксида меди (Cu<sup>+</sup>).

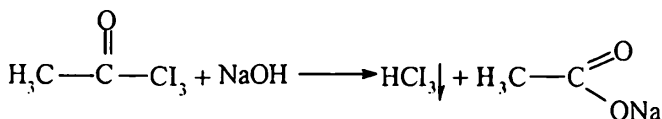
### 16.4. Качественное определение кетоновых тел в моче

**Краткая теория к работе.** Появление кетоновых тел в моче в большом количестве носит название кетонемии. К кетоновым телам относят ацетоуксусную, β-оксимасляную кислоты и ацетон. Ацетоуксусная и β-оксимасляная кислоты являются нормальными промежуточными продуктами окисления жирных кислот и быстро окисляются в мышцах и почках до углекислого газа и воды.

Нормальная моча содержит незначительные количества кетоновых тел, которые не выявляются обычными качественными пробами. Однако при недостатке углеводов, диабете и голодании идет усиленный распад жиров и белков. В организме возникает дефицит кофермента-А, который участвует в окислении жирных кислот до углекислого газа и воды. В результате происходит конденсация уксусной кислоты в ацетоуксусную, избыток которой приводит к образованию β-оксимасляной кислоты и ацетона.

**Сущность метода.** Ацетон составляет основную массу кетоновых тел. Обнаружить его можно йодоформной пробой, которая схематично протекает в два этапа:





1, 1, 1-трихлорэтанон

йодоформ

ацетат натрия

#### Оборудование и реактивы:

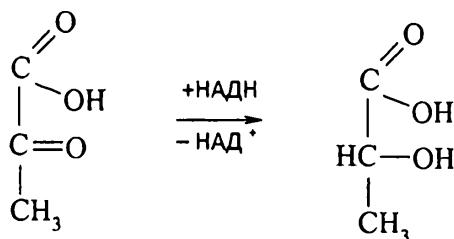
- штатив для пробирок, пробирки вместимостью 10 см<sup>3</sup>;
- реактив Люголя, 10%-ный раствор гидроксида натрия.

**Ход работы.** В пробирку наливают 2 см<sup>3</sup> исследуемой мочи. Затем добавляют 5 капель реактива Люголя, который содержит свободный йод, и 5 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия. При наличии ацетона в моче образуется йодоформ в виде желтого осадка с характерным запахом.

### 16.5. Количественное определение пировиноградной кислоты в моче

**Краткая теория к работе.** В организме человека пировиноградная кислота образуется в процессе обмена углеводов в качестве промежуточного продукта.

В анаэробных условиях пировиноградная кислота, превращаясь в молочную кислоту, способствует окислению восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (НАД-Н<sub>2</sub>).



пировиноградная кислота

молочная кислота



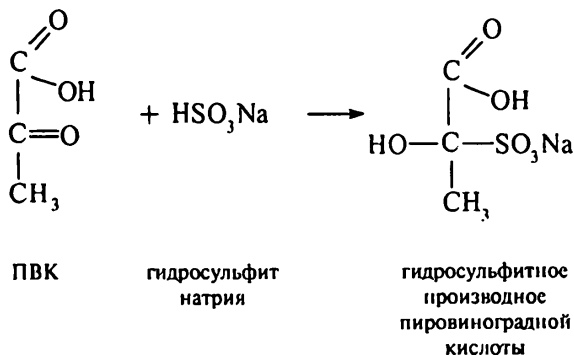
В аэробных условиях пировиноградная кислота окисляется до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Окисление пировиноградной кислоты в аэробных условиях сопряжено с накоплением энергии, в основном в составе аденозинтрифосфорной кислоты.

На первых этапах аэробного превращения пировиноградной кислоты принимают участие кофермент А, содержащий пантотеновую кислоту, кофермент тиаминпирофосфат, в состав которого входит витамин  $\text{B}_1$  и липоевая кислота.

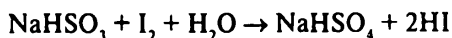
В норме в плазме крови содержится 0,8...1,5 мг% пировиноградной кислоты. У человека за сутки с мочой выделяется до 200 мг пировиноградной кислоты.

При авитаминозе и гиповитаминозе  $\text{B}_1$  в крови и других тканях, особенно в мозгу, пировиноградная кислота накапливается в большом количестве.

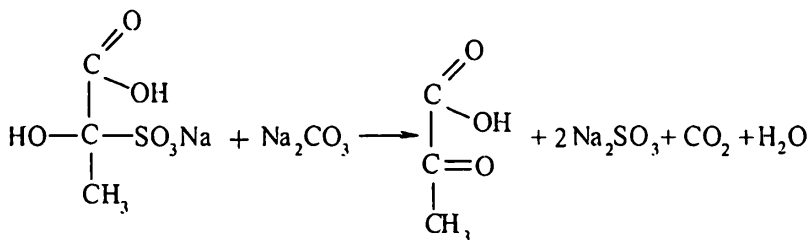
**Сущность метода.** Метод количественного определения пировиноградной кислоты основан на ее способности образовывать в кислой среде гидросульфитные соединения:



Избыток добавленного бисульфита затем связывают йодом, при этом одновременно окисляются органические соединения мочи:



После этого разрушают бисульфитное соединение пировиноградной кислоты, добавляя к раствору карбонат натрия (создание щелочной среды):

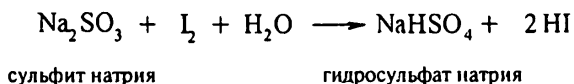


гидросульфитное производное  
пировиноградной кислоты

пировиноградная  
кислота

сульфит  
натрия

Количество освободившегося при этом сульфита натрия эквивалентно количеству пировиноградной кислоты. Сульфит натрия оттитровывают йодом:



сульфит натрия

гидросульфат натрия

По количеству йода, израсходованного на титрование, рассчитывают содержание пировиноградной кислоты.

#### Оборудование и реактивы:

- колба коническая вместимостью 100 см<sup>3</sup>, пипетки вместимостью 1 и 10 см<sup>3</sup>, бюретки вместимостью 10 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>, автоматы вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания крахмала;
- 1%-ный раствор гидросульфита натрия, раствор йода с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, раствор йода с эквивалентной концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup>, насыщенный раствор карбоната натрия, раствор тиосульфата натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, 1%-ный раствор крахмала на насыщенном растворе хлорида натрия, раствор щавелевой кислоты с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы.** В коническую колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> пипетками вносят 1 см<sup>3</sup> мочи, 1 см<sup>3</sup> раствора щавелевой кислоты с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> и 9 см<sup>3</sup> дистиллированной воды (для осаждения кальция мочи). Приливают 10 капель свежеприготовленного раствора бисульфита, перемешивают, оставляют стоять на

15 минут в темном месте. Избыток бисульфита удаляют, добавляя раствор йода с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> в присутствии крахмала до синего окрашивания. Избыток йода удаляют, приливая по каплям раствор гипосульфита с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> до обесцвечивания.

Избыток гипосульфита удаляют, добавляя из бюретки по каплям раствор йода с эквивалентной концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup> до появления синего окрашивания от одной избыточной капли раствора йода.

После того как избыток гипосульфита удален, приливают 10 капель насыщенного раствора карбоната натрия (синяя окраска при этом исчезает).

Содержимое колбочки титруют из бюретки раствором йода с эквивалентной концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup> до появления синего окрашивания, не исчезающего в течение 10...20 секунд.

Количество раствора йода с эквивалентной концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup>, пошедшее на титрование, эквивалентно количеству пировиноградной кислоты.

Расчет производят по формуле:

$$M_{\text{пвк}} = \frac{V_{\text{йода}} \cdot V_{\text{сут}} \cdot 1,12}{V_{\text{м}}},$$

где  $M_{\text{пвк}}$  — количество пировиноградной кислоты в моче, мг/сутки;  
 $V_{\text{йода}}$  — объем раствора йода, израсходованного на титрование бисульфита, см<sup>3</sup>;

$V_{\text{сут}}$  — суточное количество мочи;

$V_{\text{м}}$  — количество мочи, взятое для анализа, см<sup>3</sup>;

1,12 — масса пировиноградной кислоты, соответствующая 1 см<sup>3</sup> раствора йода с эквивалентной концентрацией 0,01 моль/дм<sup>3</sup>, г.

Суточное количество мочи у животных в среднем следующее: 6...12 л у крупного рогатого скота, 0,5...2 л у мелких жвачных, 3...6 л у лошадей, 2...4 л у свиней, 0,04...0,1 л у кроликов.

### Вопросы для самоконтроля

1. Физико-химические свойства мочи: количество, цвет, запах, плотность, осмотическое давление, реакция среды.
2. Химический состав мочи: неорганические вещества, органические вещества (азотистые и безазотистые).
3. Патологические составные компоненты мочи.

## **ТЕМА 17. ПАТОЛОГИЧЕСКОЕ МОЛОКО**

### **Цель занятия:**

- освоить теоретический материал по физико-химическим свойствам и химическому составу молока;
- знать методы выявления аномального молока.

### **Задачи занятия:**

- изучить сущность и ход проведения опытов;
- исследовать образец молока на наличие соматических клеток и редуцтазы, а также определить массовую долю лактозы, хлопидов и рассчитать хлор-сахарное число;
- сформулировать и занести в рабочую тетрадь выводы, полученные на основе результатов опытов.

### **17.1. Определение примеси аномального молока в сборном по пробе с мастоприимом**

**Краткая теория к работе.** В странах с развитым молочным животноводством достигнут высокий уровень механизации и автоматизации производства, который зачастую несовместим с жизненными функциями животных. Неправильная эксплуатация доильных машин, неудовлетворительные санитарные условия на фермах, несбалансированные корма, а также возможные отравления удобрениями, пестицидами, антибиотиками или другими химикатами вызывают различные заболевания коров.

Экономический ущерб, наносимый заболеваниями коров, складывается из потерь валового надоя, сокращения продуктивной жизни коров, затрат на лечение, снижения качества молока и вырабатываемых из него продуктов. Вот почему на практике большой интерес представляет своевременное распознавание аномального молока, а также обнаружение его примеси в сборном.

Любые патологические состояния лактирующих животных (мастит, лейкоз и др.) отражаются на синтезе молока. В последние десятилетия все чаще наблюдаются изменения традиционного состава и технологических свойств молока, которое называют аномальным (патологическим). В таком молоке повышено содержание соматических клеток (греч. *soma* — тело). Это клетки эпителия молочной железы, эритроциты, лейкоциты, лимфоциты и др.

Соматические клетки всегда присутствуют и в нормальном молоке, полученном от здоровых животных. Но содержание соматических клеток в нормальном молоке не превышает 100...300 тыс. в 1 см<sup>3</sup>. Из них 80...90% приходится на клетки эпителия и около 10% на лейкоциты, в то время как в аномальном молоке количество соматических клеток может достигать нескольких миллионов в 1 см<sup>3</sup>, из которых на долю лейкоцитов приходится до 95% [5].

Сборное молоко, поступающее на молочные заводы, часто имеет примесь от 6 до 15% и более аномального. Такое молоко содержит в 1 см<sup>3</sup> более 500 тыс. соматических клеток. Наибольшее количество соматических клеток в сборном молоке наблюдается с февраля по май, наименьшее — с июня по октябрь.

Для контроля аномального молока существует много разных методов. В лабораторных условиях часто применяют способ прямого подсчета соматических клеток под микроскопом или с помощью специальных счетчиков.

**Сущность метода.** Простым и надежным тестом для обнаружения аномального молока, который можно применять как в лабораторных, так и в стойловых исследованиях, является проба с «Мастопримом».

«Мастоприм» — это сложный комплексный препарат. Его активным веществом является сульфенол натрия. Сульфенол натрия обладает сильным водоотнимающим и высаливающим эффектом, под действием которого крупные белковые молекулы и соматические клетки аномального молока дегидратируются и собираются в видимые невооруженным глазом комки. Молоко при этом образует слизисто-студенистый продукт реакции. В молоке, полученном от здоровых животных, соматические клетки почти отсутствуют, а молекулы белка имеют меньшие размеры, и их дегидратация не приводит к образованию крупных агрегатов, способных выпадать в осадок.

Визуальный метод определения количества соматических клеток в молоке является стандартным в соответствии с ГОСТ 23453–90.

В этом методе используют специальные молочно-контрольные пластинки с четырьмя полушаровыми лунками. Дно лунок белой пластинки окрашено черным цветом для лучшего выявления хлопьев. Примесь крови обнаруживается на неокрашенной части пластинок. Между одной парой лунок есть стрелка (на белой пластинке) и отверстие (на прозрачной пластинке), которые направляют в сторону головы животного при взятии индивидуальной пробы. Это позволяет определить ту долю вымени, в которой есть воспаление.

**Оборудование и реактивы:**

- пластинка молочно-контрольная ПМК-1, пипетка Мора вместимостью 1 см<sup>3</sup>, автомат вместимостью 1 см<sup>3</sup> для отмеривания препарата «Мастоприм», стеклянная палочка, секундомер;
- 2,5%-ный раствор препарата «Мастоприм».

**Ход работы.** В углубление молочно-контрольной пластинки пипеткой вносят 1 см<sup>3</sup> исследуемого молока. Затем к молоку автоматом добавляют 1 см<sup>3</sup> 2,5%-ного раствора препарата «Мастоприм» и палочкой перемешивают смесь в течение 10 с.

Далее в течение 1 минуты наблюдают за изменением консистенции смеси, перемешивая и поднимая ее с помощью палочки на 50...70 мм.

О количестве соматических клеток в исследуемом молоке судят по таблице:

Характеристика консистенции молока	Количество соматических клеток в 1 см <sup>3</sup>
Однородная жидкость или слабый сгусток, который слегка тянется за палочкой в виде нити	До 500 тыс.
Выраженный сгусток, при перемешивании которого видна выемка на дне лунок. Сгусток не выбрасывается из лунок	От 500 тыс. до 1 млн
Плотный сгусток, который выбрасывается палочкой из лунок	Свыше 1 млн

## 17.2. Проба на редуктазу с метиленовым голубым

**Краткая теория к работе.** Высокая концентрация поголовья на ограниченной территории, интенсивное его использование, производственный ритм и поточность операций при доении сокращают до минимума время на индивидуальный контакт обслуживающего персонала с животным. Кроме объективных причин заболеваний животных большое значение имеют предрасполагающие условия: микроклимат помещения, конструкция стойл, антисанитарные условия содержания коров, гигиена доения, непригодность отдельных животных к машинному доению и др. [2]. Все это отражается на возникновении и количестве заболеваний (туберкулез, лейкоз, мастит и др.).

Молоко больных животных, как правило, содержит большие количества соматических клеток (клетки эпителия молочной железы, эритроциты, лейкоциты, лимфоциты и др.) и имеет высокую бактериальную обсемененность.

При правильной технике доения содержание бактерий в сыром молоке не должно быть более 5500 в 1 см<sup>3</sup>. В маститном молоке это количество может составлять около 10<sup>7</sup> КОЕ в 1 см<sup>3</sup> из больной четверти вымени [5]. Таким образом, резкое увеличение общего количества микроорганизмов в сборном молоке должно служить предупреждением о наличии примеси маститного молока.

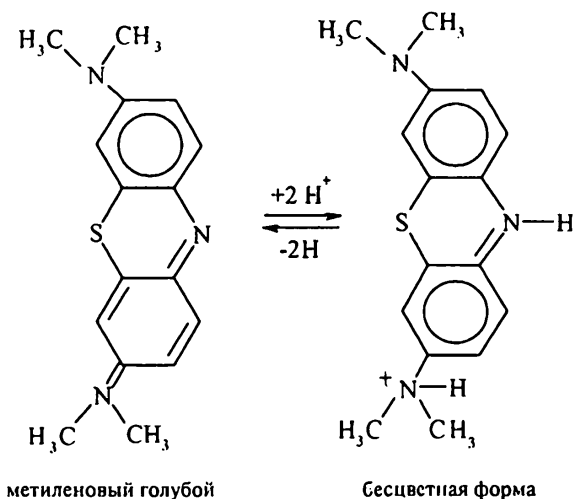
Из всех микроорганизмов, вызывающих мастит у коров, наиболее опасны стрептококки, которые могут выделяться в молоко и без видимых признаков заболевания животного. Часто маститы вызываются стафилококками, но эта форма заболевания легко распознается из-за ярко выраженной клинической картины. Вызывают мастит микроорганизмы из семейства кишечных и многие другие.

Мастит не передается человеку, но употребление в пищу молока больных животных может стать причиной отравлений бактериальными токсинами. Например, энтеротоксины стафилококков устойчивы к воздействию высоких температур и не разрушаются после кипячения в течение 1 часа. Отравление проявляется в виде острого желудочно-кишечного заболевания, которое возникает через 1...5 ч после приема пищи. Вот почему молоко коров, больных маститом, не разрешается направлять на пищевые цели.

**Сущность метода.** Микроорганизмы, развиваясь в молоке, вырабатывают различные ферменты. Одним из таких ферментов является редуктаза. Она относится к классу оксидоредуктаз и действует по схеме:



Наблюдать за ходом реакции можно в присутствии индикатора, меняющего цвет при окислительно-восстановительных превращениях. Таким индикатором в данном методе служит метиленовый голубой:



По количеству накопленной редуктазы можно косвенно судить о бактериальной обсемененности молока. Чем быстрее происходит обесцвечивание, тем больше в молоке редуктазы и выделяющих ее микроорганизмов.

#### Оборудование и реактивы:

- пробирка вместимостью 25 см<sup>3</sup>, пипетки Мора вместимостью 1 и 20 см<sup>3</sup>, термостат. Посуда должна быть стерильной;
- раствор метиленового голубого.

**Ход работы.** В пробирку вместимостью 25 см<sup>3</sup> пипетками вносят 1 см<sup>3</sup> раствора метиленового голубого и 20 см<sup>3</sup> исследуемого молока. Пробирку закрывают резиновой пробкой и трижды переворачивают для перемешивания.



Пробирку помещают в термостат при температуре 37 °С и замечают время начала опыта.

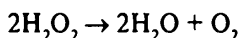
Через 40 минут, 2,5 часа, 3,5 часа наблюдают за окраской молока в пробирке. Окончанием анализа считают момент обесцвечивания метиленового голубого, о чем судят по средней части пробирки. Наличие окрашенного слоя в верхней и нижней частях пробирки в расчет не принимается.

Оценку качества молока проводят по таблице:

Класс молока	Продолжительность обесцвечивания	Ориентировочное количество бактерий в 1 см <sup>3</sup> молока, КОЕ
Высший	Более 3,5 ч	До 300 тыс.
I	3,5 ч	От 300 тыс. до 500 тыс.
II	2,5 ч	От 500 тыс. до 4 млн
III	40 мин	От 4 до 20 млн

### 17.3. Определение активности каталазы в молоке методом перманганатометрии

**Краткая теория к работе.** Один из методов обнаружения аномального молока — определение активности каталазы. Фермент каталаза относится к классу оксидоредуктаз. Каталаза обладает абсолютной специфичностью по отношению к пероксиду водорода, который является сильнейшим клеточным ядом. Под действием каталазы пероксид водорода разлагается на воду и молекулярный кислород:



При различных заболеваниях вымени и нарушении секреции у коров возрастает активность оксидаз, образующих пероксид водорода. Ответной защитной реакцией организма является увеличение концентрации каталазы.

В молоке различают каталазу нативную и бактериального происхождения. Нативная каталаза образуется в крови и паренхиме железы и выделяется при секреции молока. Увеличение содержания каталазы происходит при одновременном росте количества лейкоцитов в молоке. Это свидетельствует о нарушении секреции. Резкое увеличение

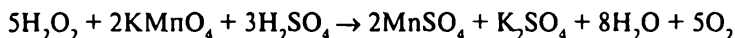
концентрации каталазы наблюдается также в молозиве и молоке, полученном в конце лактации.

Каталаза бактериального происхождения выделяется микроорганизмами, которые обсеменяли молочную железу либо попали в молоко после доения. Способность микроорганизмов к образованию каталазы различна. Например, молочнокислые бактерии каталазу не вырабатывают. Сильными каталазообразователями являются аэробные гнилостные бактерии (бактерии группы кишечной палочки) [26]. Вот почему определение активности каталазы можно использовать для контроля количества патогенных микроорганизмов в молоке.

Повышенная активность каталазы в аномальном молоке позволяет также выявлять его примесь в сборном молоке.

**Сущность метода.** Сущность перманганатометрического метода состоит в количественном определении пероксида водорода, который разлагается каталазой, содержащейся в 1 см<sup>3</sup> молока, за 1 мин при 25 °С.

Неразложившийся пероксид водорода оттитровывают раствором перманганата калия в кислой среде:



Количество разложившегося пероксида водорода находят по разнице между контрольным и опытным титрованием.

Активность каталазы выражают по-разному: в стандартных (Е) и международных (нкат) единицах или через объем кислорода, выделившегося из молока при определенных условиях.

В данной работе активность каталазы выражают в стандартных единицах. Стандартная единица (1 Е), соответствует количеству фермента, содержащегося в 1 г субстрата, которое катализирует превращение 1 микромоля (мкМ) субстрата в 1 мин при стандартных условиях (25 °С, оптимальные значения рН и концентрации субстрата).

Активность каталазы в свежесвыдоенном молоке, полученном от здоровых животных, составляет 4,0...16,0 Е, в молозиве — 50...94 Е, в стародойном молоке — 37...50 Е, в «маститном» — 62 Е и более [17].

#### **Оборудование и реактивы:**

- колбы конические вместимостью 100 и 200 см<sup>3</sup>; пипетки вместимостью 2, 20 и 25 см<sup>3</sup>; бюретки вместимостью 10 и 50 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>; цилиндр мерный вместимостью 100 см<sup>3</sup>; термометр ртутный с диапазоном измерений от 0 до 55 °С; электроплитка; баня водяная; термостат; секундомер, вода дистиллированная;

- 0,3%-ный раствор пероксида водорода, 10%-ный раствор серной кислоты, раствор перманганата калия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы.** Перед началом работы часть исследуемого молока кипятят для разрушения каталазы.

В две конические колбы вместимостью 200 см<sup>3</sup> пипетками вносят: в первую — 2 см<sup>3</sup> сырого молока (опытная проба), во вторую — 2 см<sup>3</sup> кипяченого молока (контрольная проба). Температура молока (20±1) °С. В обе колбы цилиндром добавляют по 98 см<sup>3</sup> дистиллированной воды с температурой (20±1) °С, содержимое колб перемешивают, колбы нагревают на водяной бане до температуры (25±1) °С. Затем в обе колбы пипеткой добавляют по 25 см<sup>3</sup> 0,3%-ного раствора пероксида водорода, колбы закрывают пробками, их содержимое тщательно перемешивают. Колбы помещают в термостат при температуре (25±1) °С и записывают время начала опыта.

Через 30 мин в обе колбы из бюретки вносят по 5 см<sup>3</sup> 10%-ного раствора серной кислоты и титруют из бюретки раствором перманганата калия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Активность каталазы в стандартных единицах рассчитывают по формуле:

$$A = \frac{(V_k \cdot V_o) \cdot 1,7}{V_m \cdot t \cdot 0,034},$$

где  $A$  — активность каталазы в стандартных единицах, Е;

$V_k$  — объем раствора перманганата калия, израсходованного на титрование контрольной пробы, см<sup>3</sup>;

$V_o$  — объем раствора перманганата калия, израсходованного на титрование опытной пробы, см<sup>3</sup>;

1,7 — масса пероксида водорода, соответствующего 1 см<sup>3</sup> раствора перманганата калия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, мг;

$V_m$  — объем молока, см<sup>3</sup>;

$t$  — продолжительность выдержки молока с раствором пероксида водорода, мин.

0,034 — масса 1 мкМ пероксида водорода, мг.

После подстановки известных значений (объем молока 2 см<sup>3</sup> и продолжительность выдержки 30 минут) формула принимает вид:

$$A = (V_k - V_o) \cdot 0,83.$$

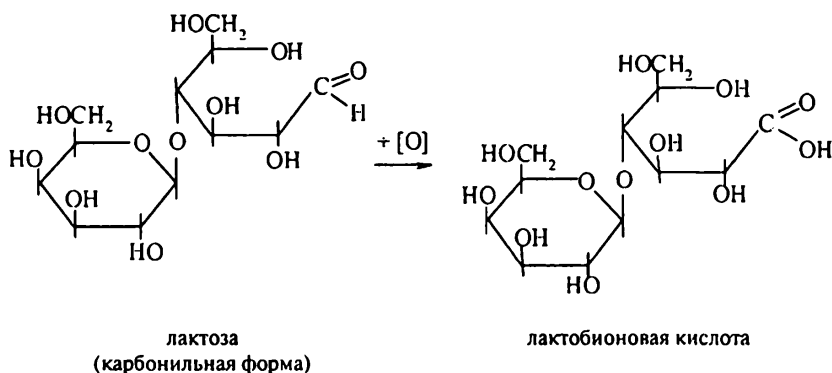
## 17.4. Определение массовой доли углеводов в молоке йодометрическим методом

**Краткая теория к работе.** Основной углевод молока — лактоза. Содержание лактозы в молоке колеблется от 4,5 до 5,2%. Эта составная часть молока наименее подвержена изменениям в продолжение периода лактации. Однако достоверно известно, что в аномальном молоке наблюдается снижение содержания молочного сахара. Например, у животных, больных маститом, содержание лактозы в молоке снижается на 10...20% от первоначального содержания [5, 26]. Та же тенденция наблюдается в молоке коров, больных туберкулезом легких и в молоке коров, подозрительных по заболеванию лейкозом.

Вот почему при диагностике скрытых форм мастита или других заболеваний, а также для выявления аномального молока в нем определяют содержание лактозы.

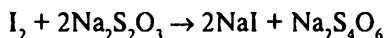
**Сущность метода.** Лактоза — это дисахарид, обладающий редуцирующими свойствами. Эта особенность лактозы и других моносахаридов используется в различных методах ее обнаружения.

В данной работе источником кислорода служит йод, который реагирует со щелочью с образованием ряда продуктов:



Непрореагировавший йод вытесняют, нейтрализуя щелочь в левой части уравнения добавлением соляной кислоты.

Выделившийся йод оттитровывают тиосульфатом натрия в присутствии крахмала:



По количеству йода, вступившего в реакцию окисления углеводов, рассчитывают их массовую долю.

При подготовке образца сначала осаждают белки, чтобы можно было исследовать только водную фракцию молока, в которой находятся углеводы.

Для устранения ошибки, связанной с изменением реактивов во время опыта, проводят контрольное определение.

#### **Оборудование и реактивы:**

- мерная колба вместимостью 200 см<sup>3</sup>, цилиндр мерный вместимостью 100 см<sup>3</sup>, пипетки градуированные вместимостью 2 и 5 см<sup>3</sup>, пипетки Мора вместимостью 10 см<sup>3</sup>, коническая колба вместимостью 250 см<sup>3</sup>, бюретка вместимостью 25 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>, воронка, фильтр бумажный, вода дистиллированная;
- реактив Фелинга 1, раствор гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>, 2%-ный раствор фторида натрия, раствор гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, водный раствор йода с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, раствор соляной кислоты с эквивалентной концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup>, раствор тиосульфата натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, 1%-ный раствор крахмала, метилоранж.

**Ход работы.** В мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup> пипеткой вносят 10 см<sup>3</sup> молока и добавляют из цилиндра 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. К содержимому колбы пипетками добавляют 4 см<sup>3</sup> реактива Фелинга 1, 1,5 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup> и 2 см<sup>3</sup> 2%-ного раствора фторида натрия. После внесения каждого реактива содержимое колбы перемешивают круговыми движениями. Объем колбы доводят до метки дистиллированной водой, закрывают колбу пробкой и несколько раз переворачивают для перемешивания раствора. Колбу оставляют в покое на 10...15 минут, предварительно убрав пробку, что способствует выравниванию давления и ускоряет осаждение белков. Затем ее содержимое фильтруют через сухой складчатый фильтр в коническую колбу вместимостью 200...250 см<sup>3</sup>. Первую порцию фильтрата объемом 20...30 см<sup>3</sup> отбрасывают. Все эти операции проводят при температуре (20±2) °С.

Далее берут две конические колбы вместимостью 200...250 см<sup>3</sup> с притертыми пробками и маркируют («контроль» и «опыт»). В опыт-

ную колбу пипеткой вносят 10 см<sup>3</sup> фильтрата, в контрольную — 10 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Затем в обе колбы из бюреток добавляют по 15 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> и, при непрерывном помешивании содержимого, 10 см<sup>3</sup> водного раствора йода с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>. Обе колбы закрывают пробками и помещают в темное место на 20 минут при комнатной температуре.

После выдержки в обе колбы из бюретки вносят по 5 см<sup>3</sup> раствора соляной кислоты с эквивалентной концентрацией 0,5 моль/дм<sup>3</sup> и титруют выделившийся йод раствором тиосульфата натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> в два этапа как можно быстрее, чтобы максимально связать избыток йода. Сначала — до желтого окрашивания, после чего добавляют 1 см<sup>3</sup> 1%-ного раствора крахмала и 2 капли метилоранжа, смесь приобретает буро-фиолетовое окрашивание. Затем титрование продолжают, добавляя тиосульфат по каплям до появления розового окрашивания, обусловленного метилоранжем.

Массовую долю углеводов в молоке рассчитывают по формуле, используя весь объем тиосульфата натрия, израсходованного на титрование каждой пробы:

$$W = \frac{(V_k - V_o) \cdot 0,01801 \cdot 0,997}{V_m \cdot \rho_m} \cdot 100,$$

где  $W$  — массовая доля углеводов в молоке, %;

$V_k$  — объем раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование йода в контрольной пробе, см<sup>3</sup>;

$V_o$  — объем раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование йода в опытной пробе, см<sup>3</sup>;

0,01801 — масса лактозы, соответствующая 1 см<sup>3</sup> раствора тиосульфата натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, г;

0,997 — коэффициент поправки на объем осадка;

$V_m$  — объем молока, соответствующий взятому фильтрату, в данном случае 0,5 см<sup>3</sup>;

$\rho_m$  — плотность молока, г/см<sup>3</sup> (при 20 °С  $\rho_m = 1,028...1,032$  г/см<sup>3</sup>);

100 — коэффициент пересчета на 100 г молока.

После подстановки известных значений в формулу она принимает вид:

$$W = (V_k - V_o) \cdot 3,95(\%).$$

## 17.5. Определение массовой доли хлоридов в молоке

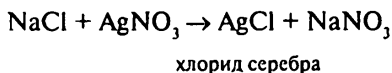
**Краткая теория к работе.** Одно из самых распространенных заболеваний коров — мастит. В ряде стран маститом переболевает ежегодно до 50% поголовья коров. При этом маститы бактериологической этиологии составляют до 35% [2].

Мастит — воспаление молочной железы, характеризующееся патологическими изменениями в ее тканях, в составе и свойствах получаемого молока. Диапазон изменений зависит от степени заболевания. По интенсивности воспаления вымени маститы делят на клинические, субклинические и латентные.

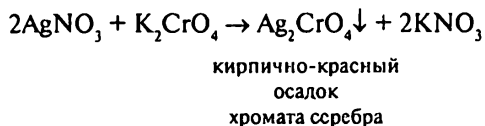
В острой форме мастита секрет вымени приближается к составу крови. При этом наблюдаются видимые изменения молока. В нем появляются хлопья казеина, частицы гноя, иногда кровь. При субклинических и латентных формах явные признаки заболевания отсутствуют и клинически диагностировать их невозможно. Но установить скрытые формы мастита можно по изменению некоторых свойств и состава молока. В частности, увеличение содержания хлоридов служит подтверждением заболевания. Известно, что количество хлоридов при маститах может возрасти на 20...35% по сравнению с первоначальным содержанием.

**Сущность метода.** Определение хлоридов основано на осаждении хлора раствором нитрата серебра в присутствии индикатора хромата калия.

Нитрат серебра осаждает хлориды с образованием белого творожистого хлорида серебра:



После осаждения всех хлоридов, присутствующих в молоке, в реакцию вступает хромат калия и образует с серебром осадок кирпично-красного цвета:



Из приведенных реакций видно, что количество нитрата серебра, пошедшего при титровании на образование осадка хлорида серебра, эквивалентно количеству хлора.

Определению хлоридов в молоке препятствуют белки, которые осаждают высаливанием. Для этого к молоку добавляют сульфат меди.

**Оборудование и реактивы:**

- мерная колба вместимостью 200 см<sup>3</sup>, цилиндр мерный вместимостью 100 см<sup>3</sup>, пипетки градуированные вместимостью 2 и 5 см<sup>3</sup>, пипетки Мора вместимостью 10 и 50 см<sup>3</sup>, коническая колба вместимостью 150 см<sup>3</sup>, бюретка вместимостью 25 см<sup>3</sup> с ценой деления 0,1 см<sup>3</sup>, воронка, фильтр бумажный, лакмусовая бумажка, вода дистиллированная;
- реактив Фелинга 1, раствор гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup>, 2%-ный раствор фторида натрия; раствор гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, 1%-ный раствор фенолфталеина; раствор гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup>, 10%-ный раствор хромата калия, раствор нитрата серебра с эквивалентной концентрацией 0,02817 моль/дм<sup>3</sup>.

**Ход работы.** В мерную колбу вместимостью 200 см<sup>3</sup> пипеткой вносят 10 см<sup>3</sup> молока и добавляют из цилиндра 100 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. К содержимому колбы пипетками добавляют 4 см<sup>3</sup> реактива Фелинга 1, 1,5 см<sup>3</sup> раствора гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 1 моль/дм<sup>3</sup> и 2 см<sup>3</sup> 2%-ного раствора фторида натрия. После внесения каждого реактива содержимое колбы перемешивают круговыми движениями. Объем колбы доводят до метки дистиллированной водой, закрывают колбу пробкой и несколько раз переворачивают для перемешивания раствора. Колбу оставляют в покое на 10...15 минут, предварительно убрав пробку, что способствует выравниванию давления и ускоряет осаждение белков. Затем ее содержимое фильтруют через сухой складчатый фильтр в коническую колбу вместимостью 200...250 см<sup>3</sup>. Первую порцию фильтрата объемом 20...30 см<sup>3</sup> отбрасывают. Все эти операции проводят при температуре (20±2) °С.

Полученный фильтрат проверяют на нейтральность с помощью лакмусовой бумажки. При кислой реакции среды фильтрат нейтрализуют добавлением раствора гидроксида натрия с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> в присутствии 1...2 капель 1%-ного раствора фенолфталеина.

Далее в коническую колбу вместимостью 150 см<sup>3</sup> пипеткой вносят 50 см<sup>3</sup> нейтрализованного фильтрата и приливают автоматом 1 см<sup>3</sup>



10%-ного раствора хромата калия. Содержимое колбы титруют раствором нитрата серебра с эквивалентной концентрацией 0,02817 моль/дм<sup>3</sup> до красно-кирпичного окрашивания.

Массовую долю хлоридов в молоке рассчитывают по формуле:

$$W_x = \frac{V \cdot l}{1000 \cdot V_m \cdot \rho_m} \cdot 100,$$

где  $W_x$  — массовая доля хлоридов в молоке, %;

$V$  — объем раствора нитрата серебра, израсходованного на титрование, см<sup>3</sup>;

$l$  — масса хлоридов, соответствующая 1 см<sup>3</sup> раствора нитрата серебра с эквивалентной концентрацией 0,02817 моль/дм<sup>3</sup>, мг;

$V_m$  — объем молока, соответствующий 50 филтрам,  $V_m = 2,5$  см<sup>3</sup>;

$\rho_m$  — плотность молока, г/см<sup>3</sup> (при 20 °С  $\rho_m = 1,028...1,032$  г/см<sup>3</sup>);

1000 — коэффициент пересчета миллиграммов в граммы;

100 — коэффициент пересчета на 100 г молока.

## 17.6. Расчет хлор-сахарного числа

**Краткая теория к работе.** Различные заболевания коров ведут к снижению молочной продуктивности и изменению синтеза молока. Наиболее заметные отличия в составе молока вызываются при мастите инфицированием вымени и связанными с этим нарушениями секреции. Возбудители проникают в паренхиму, а оттуда в альвеолы. В результате частично пораженная ткань становится проницаемой для сывороточных белков. Для поддержания осмотического давления ионы крови в большом количестве переходят в молоко, и с увеличением тяжести заболевания его состав приближается к составу крови.

Воспалительные процессы в вымени снижают способность молокообразующих клеток к синтезу казеина, лактозы и жира. Это проявляется в снижении общего содержания сухих веществ и в изменении количественного соотношения между составными частями молока. Наиболее заметным отклонением подвергаются хлориды и лактоза и, как следствие, их соотношение.

**Сущность метода.** При маститах массовая доля хлоридов в молоке возрастает на 20...35% по сравнению с первоначальным содержанием. Одновременно наблюдается снижение уровня лактозы на 10...20% по отношению к начальному. Подобная тенденция сохраняется и в сбор-

ном молоке, содержащем примесь молока коров, больных маститом.

На основании этих данных для выявления маститного молока Г. С. Иниховым предложено определение *хлор-сахарного числа*, то есть отношения массовой доли хлоридов к массовой доле лактозы.

Массовую долю хлоридов в молоке определяют осаждением хлора раствором нитрата серебра в присутствии индикатора дихромата калия.

Массовую долю углеводов в молоке определяют йодометрическим методом.

В молоке здоровых коров хлор-сахарное число не превышает 1,5...2,0 единиц. При его значении в пределах от 2,0 до 4,0 единиц подозревают мастит у коровы либо наличие примесей «маститного» молока в сборном. Если хлор-сахарное число больше четырех (до 6...15), то наличие мастита у коровы не вызывает сомнений.

**Ход работы.** Расчет хлор-сахарного числа проводят по формуле:

$$\text{Хлор - сахарное число} = \frac{W_{\text{х}}}{W_{\text{л}}} \cdot 100,$$

где  $W_{\text{х}}$  — массовая доля хлоридов, %;

$W_{\text{л}}$  — массовая доля лактозы, %;

100 — повышающий коэффициент.

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1. Общепринятые тривиальные названия некоторых соединений

Формула	Название
$\text{HCCl}_3$	хлороформ
$\text{CCl}_4$	четырёххлористый углерод
$\text{HCI}_3$	йодоформ
$\text{H} - \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{H} \end{array}$	формальдегид
$\text{CH}_3 - \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{H} \end{array}$	ацетальдегид
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{H} \end{array}$	пропионовый альдегид
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} \begin{array}{l} \text{=O} \\ \text{H} \end{array}$	масляный альдегид
$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{CH}_3$	ацетон

$\text{H} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$	муравьиная кислота
$\text{CH}_3 - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$	уксусная кислота
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$	пропионовая кислота
$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_2 - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$	масляная кислота
$\text{C}_{15}\text{H}_{31} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$	пальмитиновая кислота
$\text{C}_{17}\text{H}_{35} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$	стеариновая кислота
$\text{C}_{17}\text{H}_{33} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$	олеиновая кислота
$\text{C}_{17}\text{H}_{31} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$	линолевая кислота

$\text{C}_{17}\text{H}_{29} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$	линоленовая кислота
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{HO} - \text{C} - \text{C} - \text{OH} \end{array}$	шавелевая кислота
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{HO} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{OH} \end{array}$	малоновая кислота
$\begin{array}{c} \text{O} \quad \quad \text{O} \\ \parallel \quad \parallel \\ \text{HO} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{OH} \end{array}$	янтарная кислота
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \parallel \text{C} - \text{C} = \text{C} - \text{C} \parallel \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{HO} \quad \quad \text{OH} \end{array}$	малеиновая кислота
$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{O} \parallel \text{C} - \text{C} = \text{C} - \text{C} \parallel \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{HO} \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{OH} \end{array}$	фумаровая кислота
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 - \text{CH} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array} \\   \\ \text{OH} \end{array}$	молочная кислота

$  \begin{array}{ccccccc}  & \text{O} & & & \text{O} & & \\  & \parallel & & & \parallel & & \\  \text{HO} & - \text{C} & - & \text{CH} & - & \text{CH} & - \text{C} & - \text{OH} \\  & & &   & &   & & \\  & & & \text{OH} & & \text{OH} & &   \end{array}  $	<p>винная кислота</p>
$  \begin{array}{c}  \text{H}_2\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array} \\    \\  \text{HO} - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array} \\    \\  \text{H}_2\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}  \end{array}  $	<p>лимонная кислота</p>

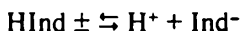
## Приложение 2. Кислотно-основные индикаторы

В большинстве случаев происходящие при титровании реакции не сопровождаются изменением окраски раствора при достижении *точки эквивалентности*, то есть в тот момент, когда взятые количества веществ точно соответствуют уравнению реакции. Поэтому, чтобы фиксировать окончание титрования, к раствору прибавляют индикаторы.

Индикаторы делятся на две группы: одноцветные и двухцветные. К первой группе относятся такие индикаторы, которые приобретают окраску только в кислой или щелочной среде. Например, фенолфталеин, который в кислой среде бесцветен, а в щелочной имеет малиновую окраску. Двухцветные индикаторы в кислой среде окрашены в один цвет, а в щелочной — в другой. Например, лакмус и метилоранж.

Индикаторы представляют собой слабые органические кислоты или слабые основания, у которых недиссоциированные молекулы имеют одну окраску, а образуемые ими ионы — другую. Например, у лакмуса красящими веществами являются индофенолы. В кислой среде они существуют в катионной форме и окрашены в красный цвет. В щелочной среде они существуют в анионной форме и имеют синий цвет.

Индикаторную кислоту можно обозначить HInd, а ее анионы — Ind<sup>-</sup>. Тогда диссоциация индикатора будет описываться уравнением:



При растворении лакмуса в воде система находится в равновесии, поэтому окраска промежуточная, то есть фиолетовая.

При добавлении кислоты равновесие сместится влево, так как введенные в раствор протоны свяжут анионы индикатора в недиссоциированные молекулы HInd, и раствор станет красным.

При добавлении щелочи ионы водорода будут выбывать из раствора и диссоциация индикатора увеличится, а появление аниона Ind<sup>-</sup> окрасит раствор в синий цвет.

Титрование должно быть закончено в эквивалентной точке. При этом выбор индикатора имеет очень большое значение. Титрование с индикатором прекращают в тот момент, когда глаз отчетливо замечает изменение его окраски. Та величина pH, при которой индикатор изменяет свою окраску, называется *показателем титрования*.

При неправильно выбранном индикаторе перемена его окраски происходит постепенно, а не скачком от одной капли титрующего

раствора, и трудно определить момент окончания реакции, когда следует прекратить титрование.

На точность установления момента эквивалентности влияет также количество индикатора. Его следует брать из расчета: две капли на 25 см<sup>3</sup> титруемого раствора.

Окраска индикатора изменяется в определенном интервале рН — области перехода. Область перехода окраски у различных индикаторов находится в разных значениях рН.

В наши дни известны сотни кислотно-основных индикаторов, искусственно синтезированных с середины XIX века. Основные данные о наиболее распространенных индикаторах приведены в таблице:

Индикатор	Область перехода (интервал рН)	Окраска		Способ приготовления
		кислотной формы	щелочной формы	
Ализариновый красный С с массовой долей 0,1%	10,0...12,1 3,7...5,2	фиолетовая желтая	желтая фиолетовая	0,1 ± 0,01 г индикатора растворяют в 100 см <sup>3</sup> дистиллированной воды
Ализариновый желтый 2Ж с массовой долей 0,1%	10,0...12,1	желтая	синяя	0,1 ± 0,01 г индикатора растворяют в 100 см <sup>3</sup> дистиллированной воды
Метиловый красный с массовой долей 0,1%	4,4...6,2	красная	желтая	0,1 ± 0,01 г индикатора растворяют в 100 см <sup>3</sup> 95°-ного этанола
Метиловый оранжевый с массовой долей 0,1%	3,1...4,4	розовая	оранжево-желтая	0,1 ± 0,01 г индикатора растворяют в 100 см <sup>3</sup> дистиллированной воды



1	2	3	4	5
Нейтральный красный с массовой долей 0,1%	6,8...8,8	красная	желто- коричневая	0,1 ± 0,01 г индикатора растворяют в 100 см <sup>3</sup> 95°-ного этанола
Фенолфта- леин с массовой долей 0,1%	8,0...9,6	отсутствует	красная	0,1 ± 0,01 г индикатора растворяют в 100 см <sup>3</sup> 95°-ного этанола

На основании теоретических расчетов установлено, что титрование растворов сильных кислот с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> растворами сильных оснований с эквивалентной концентрацией 0,1 моль/дм<sup>3</sup> (или наоборот) можно производить, пользуясь любым из вышеприведенных индикаторов.

При титровании слабых кислот сильными щелочами (или наоборот) единственным вполне пригодным в этом случае индикатором является фенолфталеин.

При титровании слабых щелочей сильными кислотами (или наоборот) наиболее пригодными индикаторами являются метилоранж, метиловый красный и нейтральный красный.

Титрование слабых кислот слабыми основаниями (или наоборот) на практике обычно не применяется, так как в этом случае не наблюдается скачка значений рН и нельзя обнаружить резкого изменения окраски индикатора.

Для более точного установления окончания титрования часто прибегают к помощи контрольного раствора или «свидетеля». В этом случае используют те же реактивы и такую же посуду, что и в опытной пробе, но вместо исследуемого раствора берут дистиллированную воду.

### Приложение 3. Меры предосторожности при работе в лаборатории

Основа безопасной работы в химической лаборатории — соблюдение мер предосторожности. К работе в лаборатории допускаются студенты, прошедшие инструктаж по охране труда и технике безопасности, о чем делается соответствующая запись в журнале.

Самые общие правила требуют выполнять работу в лаборатории в халате. Ни в коем случае нельзя приносить и тем более принимать пищу в лаборатории. Допускается проводить опыты, только предусмотренные преподавателем.

Большинство лабораторных работ связано с применением кислот и щелочей, которые оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки верхних дыхательных путей и вызывают ожоги при попадании на кожу. Такие последствия не возникнут, если соблюдать следующие правила.

На рабочих местах должны находиться реактивы, не представляющие опасности (разбавленные растворы кислот, солей, оснований). Концентрированные реактивы необходимо хранить в вытяжном шкафу, там же и выполнять работу с ними. Нельзя оставлять открытыми склянки с любыми реактивами.

Для опытов необходимо брать вещества в количествах, указанных преподавателем. При переливании растворов необходимо пользоваться воронками. Для работы с сухими реактивами служат щипцы, пинцеты, совочки, шпатели. Ядовитые и вредные жидкости набирают пипетками с резиновой грушей или специальными автоматическими пипетками.

Когда нужно смешать две жидкости, жидкость с большей плотностью приливают при перемешивании к жидкости с меньшей плотностью.

Если смешивание веществ сопровождается выделением тепла, можно пользоваться только тонкостенной химической посудой из стекла или фарфоровой посудой.

Разбавляя кислоты, их медленно небольшими порциями *приливают к воде*, а не наоборот.

В случае попадания кислот или щелочей на кожу пораженное место немедленно промывают большим объемом проточной воды, а затем протирают нейтрализующим раствором.

В опытах с нагреванием также существуют определенные правила.

Спиртовку зажигают спичкой или лучинкой, а гасят, накрывая пламя колпачком. В пробирке нагревают только небольшие количес-

тва веществ. Жидкость не должна занимать более 1/3 объема пробирки. Пробирку с веществом сначала прогревают всю, а затем, не вынимая из пламени спиртовки, нагревают в нужном месте (ниже уровня жидкости в пробирке). При этом нельзя наклоняться над нагреваемым сосудом и направлять его отверстие на себя или соседей.

Во избежание пожара нагревательные приборы не должны стоять непосредственно на деревянных столах; под них подкладывают листы асбеста, керамическую плитку, кирпичи.

Перед включением электроприборов необходимо убедиться в исправности заземления. Поскольку заземление может оказаться неисправным за пределами лаборатории, например вследствие обрыва заземляющего провода снаружи здания, перед каждым прибором на полу должен находиться резиновый коврик. Перед включением прибора на коврик становятся обеими ногами. Это особенно необходимо в лаборатории с цементными и плиточными полами. Лаборант обязан перед началом работы проверить корпуса всех электроприборов на отсутствие напряжения, пользуясь при этом специальным пробником.

К работе можно приступать только после изучения инструкции к прибору. Нельзя включать электроприборы мокрыми руками, поскольку влажная кожа обладает значительно большей электропроводностью, чем сухая.

Категорически запрещается оставлять действующие приборы без наблюдения.

При работе с огнеопасными веществами (эфир, лигроин и др.) не следует ставить сосуды с ними близко к пламени и нагревательным приборам. При возникновении пожара в первую очередь нужно вынести эти сосуды из лаборатории. Если легковоспламеняющаяся жидкость разлита, надо засыпать ее песком. Песок затем сгребают деревянной лопаткой; железными лопатками в этих случаях пользоваться нельзя, так как при трении железа о песчинки образуются искры, что может привести к взрыву. Нельзя также сгребать песок веником, щеткой; при трении они электризуются, что также приводит к взрыву.

Органические вещества, не растворяющиеся в воде, тушить водой нельзя. Кроме песка, можно пользоваться листами асбеста, которыми покрывают пламя.

В лаборатории обязательно должны быть огнетушители. Необходимо ознакомиться с правилами пользования ими.

#### **Приложение 4. Мытье и сушка химической посуды**

Химическая посуда, которой пользуются при проведении анализов, должна быть совершенно чистой. Для этого существует простой визуальный тест: после выливания воды на стенках посуды не должно оставаться отдельных капель, так как чистое стекло покрывается тончайшей равномерной пленкой.

Место для мытья посуды удобно располагать недалеко от дистиллятора, из холодильника которого непрерывно выходит теплая вода.

Первоначально посуду освобождают от остатков реактивов. Растворы и осадки, содержащие серебро, ртуть, йод, собирают в отдельные сосуды, поскольку соединения этих ценных элементов в дальнейшем регенерируют.

Остатки концентрированных нелетучих кислот и щелочей предварительно нейтрализуют (остатками же), затем сильно разбавляют водой и только после этого сбрасывают в раковину с большим током водопроводной воды.

Если посуда не загрязнена нерастворимыми органическими веществами, она в большинстве случаев может быть отмыта теплой водой. Приставший к стенкам налет солей очищают щетками-ершами разных размеров. Хорошо вымытую теплой водой посуду ополаскивают 2...3 раза дистиллированной водой.

Если водой посуда не отмывается, то применяют различные моющие средства, в первую очередь мыло, растворы соды различных концентраций.

После обработки моющими реактивами посуду ополаскивают сначала теплой водопроводной, а затем дистиллированной водой.

Сушат посуду обычно на сушильной доске, на колышках которой сосуды вешают отверстием вниз. Перед количественными определениями посуду сушат в сушильных шкафах.

## ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия животных. Под ред. проф. Четчикина А.В. — М.: Высшая школа, 1982. — 510 с.: ил.
2. Вышемирский Ф. А., Каранина А. Л. Влияние химизации и интенсификации сельского хозяйства на качество молока и молочных продуктов: Обзорная информация. — М.: АгроНИИТЭИММП, 1990. — 40 с.
3. Грандберг И. И. Органическая химия: Учеб. для студентов вузов, обучающихся по агроном. спец. — 4-е изд. перераб. и доп. — М.: Дрофа, 2001. — 672 с.: ил.
4. Грандберг И. И. Практические работы и семинарские занятия по органической химии: Пособие для студ. вузов. — 4-е изд. перераб. и доп. — М.: Дрофа, 2001. — 352 с.: ил.
5. Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов. — М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1984. — 336 с.
6. Заплишный В. А. Органическая химия: Учебник для сельскохозяйственных вузов / Министерство сельского хозяйства и продовольствия РФ. — Краснодар: ГУП «Печатный двор Кубани», 1999. — 368 с.
7. Збарский Б. Н., Иванов И. И., Мардашев С. Р. Биологическая химия. — М.: Медицина, 1972. — 582 с.: ил.
8. Инихов Г. С., Брио А. П. Химический анализ молока и молочных продуктов. — М.: Пищевая промышленность, 1971. — 416 с.: ил.
9. Кононский А. И. Биохимия животных. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Колос, 1992. — 526 с.: ил.
10. Коренман Я. И. Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов: Учеб. пособие / Я. И. Коренман, Р. П. Лисицкая. — Воронеж. гос. технол. акад. Воронеж, 2002. — 408 с.
11. Лабораторные работы по органической химии. Под ред. Гинзбурга О. В. и Петрова А. В.: Учеб. пособие для химико-технологических специальностей вузов. Изд. 3-е. — М.: Высшая школа, 1974. — 286 с.: ил.
12. Лебедев П. Т., Усович А. Т. Методы исследования кормов, органов и тканей животных. — М.: Россельхозиздат, 1969. — 476 с.
13. Малахов А. Г., Вишняков С. Н. Биохимия сельскохозяйственных животных. Учебник для студентов высших сельскохозяйственных учебных заведений по спец. «Зоотехния» и «Ветеринария». — М.: Колос, 1984. — 336 с.: ил.
14. Некрасов В. В. Руководство к малому практикуму по органической химии. — М.: Химия, 1975. — 328 с.
15. Новокшанова А.Л. Органическая, биологическая и физколлоидная химия: Учебно-методическое пособие. — Вологда — Молочное: ИЦ ВГМХА, 2004. — 111 с.
16. Основы биохимии: Учебник для студентов биологических специальностей университетов / Анисимов А. А., Леонтьева А. Н., Александрова И. Ф. и др. Под ред. Анисимова А. А. — М.: Высшая школа, 1986. — 551 с.: ил.

17. Охрименко О. В., Охрименко А. В. Исследование состава и свойств молока и молочных продуктов: Учебное пособие. — Вологда: ИЦ ВГМХА, 2000. — 161 с.
18. Петров А. А., Бальян Х. В., Трошченко А. Т. Органическая химия: Учебник для вузов / Под ред. Стадничука М. Д. — 5-е изд., перераб. и доп. — СПб.: «Иван Федоров», 2002. — 624 с.: ил.
19. Перекалин В. В., Зонис С. А. Органическая химия: Учеб. пособие для студентов пед. ин-тов по хим. и биол. спец. — 4-е изд., перераб. — М.: Просвещение, 1982. — 560 с.
20. Писаренко А. П., Хавин З. Я. Курс органической химии: Учебник для студентов нехимических специальностей вузов. — М.: Высшая школа, 1968. — 512 с.: ил.
21. Практикум по биохимии сельскохозяйственных животных: Учеб. пособие для зооинженерных и ветеринарных фак. с.-х. вузов / А. В. Четкин, В. И. Воронянский, Г. Г. Покусай и др. — М.: Высшая школа, 1980. — 303 с.: ил.
22. Практикум по общей биохимии: Учеб. пособие для студентов хим. спец. пед. ин-тов / Ю. Б. Филиппович, Т. А. Егорова, Г. А. Севастьянова. Под общ. ред. Ю. Б. Филипповича. — 2-е изд., перераб. — М.: Просвещение, 1982. — 311 с.: ил.
23. Пустовалова Л. М. Основы биохимии для медицинских колледжей (2-е изд.) / Серия «Медицина для вас». — Ростов н/Д.: Феникс, 2004. — 448 с.
24. Райлс А., Смит К., Уорд Р. Основы органической химии для студентов биологических и медицинских специальностей: Пер. с англ. — М.: Мир, 1983. — 352 с.: ил.
25. Строев Е. А. Биологическая химия. — М.: Высшая школа, 1986. — 479 с.
26. Тепел А. Химия и физика молока. — М.: Пищевая пром-сть, 1979. — 623 с.
27. Физер Л., Физер М. Органическая химия. Углубленный курс. Том 1: Пер. с англ. — М.: Химия, 1969 — 688 с.
28. Физер Л., Физер М. Органическая химия. Углубленный курс. Том 2: Пер. с англ. — М.: Химия, 1970. — 800 с.
29. Филиппович Ю. Б. Основы биохимии: Учеб. для хим. и биол. спец. пед. ун-тов и ин-тов. — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Изд-во «Агар», 1999. — 512 с.: ил.
30. Хазипов Н. З., Аскарова А. Н. Биохимия животных. — Казань, 2003. — 312 с.: ил.
31. Цитович И. К. Курс аналитической химии: Учеб. для с.-х. вузов. — М.: Высшая школа, 1994 — 495 с.
32. Энциклопедия для детей. Том 17. Химия / Глав. ред. В. Володин; вед. науч. ред. И. Лесенсон. — М.: Аванта, 2004. — 640 с.: ил.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Березин Б. Д., Березин Д. Б. Органическая химия: в 2 ч.: Учебник для академического бакалавриата. — 2-е изд. — М.: Издательство Юрайт, 2016.
2. Биоорганическая химия: Учебное пособие для вузов / Н. Н. Мочульская, Н. Е. Максимова, В. В. Емельянов; под науч. ред. В. Н. Чарушина. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
3. Бутлеров А. М. Введение к полному изучению органической химии. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
4. Вшивков А. А., Пестов А. В. Органическая химия. Задачи и упражнения: Учебное пособие для вузов. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
5. Гавронская Ю. Ю., Пак В. Н. Коллоидная химия: Учебник и практикум для академического бакалавриата. — М.: Издательство Юрайт, 2016.
6. Грандберг И. И., Нам Н. Л. Органическая химия: Учебник для академического бакалавриата. — 8-е изд. — М.: Издательство Юрайт, 2016.
7. Грандберг И. И., Нам Н. Л. Практические работы и семинарские занятия по органической химии: Учебное пособие для академического бакалавриата. — 6-е изд., перераб. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2015.
8. Ершов Ю. А., Зайцева Н. И. Биохимия: Учебник и практикум для академического бакалавриата / под ред. С. И. Щукина. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
9. Каминский В. А. Органическая химия: в 2 ч.: Учебник для академического бакалавриата / В. А. Каминский. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
10. Кудряшева Н. С. Физическая и коллоидная химия: Учебник и практикум для прикладного бакалавриата / Н. С. Кудряшева, Л. Г. Бондарева. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
11. Новокшанова А. Л. Биохимия для технологов: в 2 ч.: Учебник и практикум для академического бакалавриата / А. Л. Новокшанова. — 2-е изд., испр. — М.: Издательство Юрайт, 2016.
12. Тупикин Е. И. Химия. В 2 ч. Часть 2. Органическая химия: Учебник для прикладного бакалавриата / Е. И. Тупикин. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.

**Наши книги можно приобрести:**

**Учебным заведениям и библиотекам:**  
в отделе по работе с вузами  
тел.: (495) 744-00-12, e-mail: [vuz@urait.ru](mailto:vuz@urait.ru)

**Частным лицам:**  
список магазинов смотрите на сайте [urait.ru](http://urait.ru)  
в разделе «Частным лицам»

**Магазинам и корпоративным клиентам:**  
в отделе продаж  
тел.: (495) 744-00-12, e-mail: [sales@urait.ru](mailto:sales@urait.ru)

**Отзывы об издании присылайте в редакцию**  
e-mail: [red@urait.ru](mailto:red@urait.ru)

**Новые издания и дополнительные материалы доступны  
в электронной библиотечной системе «Юрайт»  
[biblio-online.ru](http://biblio-online.ru)**

*Учебное издание*

**Новокшанова Алла Львовна**

# **ОРГАНИЧЕСКАЯ, БИОЛОГИЧЕСКАЯ И ФИЗКОЛЛОИДНАЯ ХИМИЯ. ПРАКТИКУМ**

Учебное пособие для СПО

Формат 60×90<sup>1</sup>/<sub>16</sub>.  
Печать цифровая. Усл. печ. л. 13,88.

**ООО «Издательство Юрайт»**  
111123, г. Москва, ул. Плеханова, д. 4а.  
Тел.: (495) 744-00-12. E-mail: [izdat@urait.ru](mailto:izdat@urait.ru), [www.urait.ru](http://www.urait.ru)