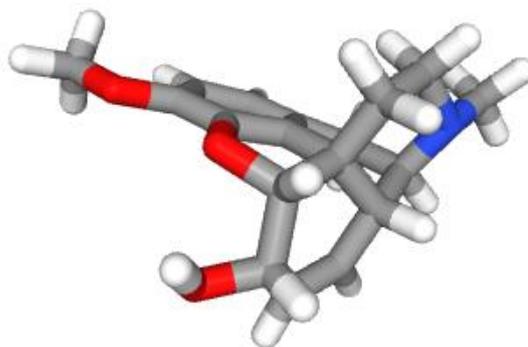
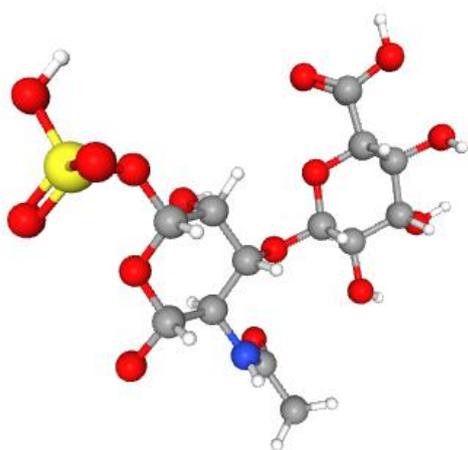


Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Л. С. Дышлюк

ПАРАФАРМАЦЕВТИКИ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Утверждено редакционно-издательским советом ФГБОУ ВО «КГТУ»
в качестве учебно-методического пособия по лабораторным работам
для студентов, обучающихся в магистратуре
по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология
(профиль Пищевая биотехнология)



Калининград
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»
2022

УДК 613.2 (075.8)

Рецензент

доктор технических наук, заведующая кафедрой пищевой биотехнологии
ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет»
О. Я. Мезенова

Дышлюк, Л. С.

Парафармацевтики в пищевой биотехнологии: учеб.-методич. пособие по лабораторным работам для студ. магистратуры по напр. подгот. 19.04.01 Биотехнология / Л. С. Дышлюк. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2022. – 71 с.

Учебно-методическое пособие является руководством по проведению цикла лабораторных работ по дисциплине «Парафармацевтики в пищевой биотехнологии» студентами, обучающимися по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология. Лабораторные работы предназначены для закрепления теоретического материала и приобретения навыков использования основных нормативно-технических документов, регламентирующих производство и контроль качества БАД – парафармацевтиков из сырья животного, растительного и микробного происхождения.

Табл. 6, рис. 18, список лит. – 22 наименования.

Учебно-методическое пособие по выполнению цикла лабораторных работ по дисциплине «Парафармацевтики в пищевой биотехнологии» рассмотрено и одобрено на заседании кафедры пищевой биотехнологии ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 23 сентября 2022 г., протокол № 2.

Учебно-методическое пособие по выполнению цикла лабораторных работ по дисциплине «Парафармацевтики в пищевой биотехнологии» рекомендовано к изданию на заседании методической комиссии института агроинженерии и пищевых систем ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 30 ноября 2022 г., протокол № 12.

УДК 613.2 (075.8)

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калининградский государственный технический университет», 2022 г.

© Дышлюк Л. С., 2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	4
Методические указания к лабораторным работам.....	5
Правила техники безопасности при работе в лаборатории.....	6
Лабораторная работа №1. Качественное и количественное определение пигментов в растительном сырье, перспективном для получения БАД – антиоксидантов.....	9
Лабораторная работа №2. Экстракция органических кислот из растительного материала и их количественное определение	16
Лабораторная работа №3. Выделение алкалоидов из растительного сырья. Качественные реакции и количественное определение алкалоидов..	26
Лабораторная работа №4. Выделение хромогенного комплекса из плодового тела <i>Inonotus obliquus</i>	31
Лабораторная работа №5. Выделение нуклеопротеидов из дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Гидролиз нуклеопротеидов и проведение качественных реакций на продукты гидролиза.....	33
Лабораторная работа №6. Определение суммарного содержания нуклеиновых кислот в животных тканях по фосфору.....	36
Лабораторная работа №7. Фосфопротеиды и гликопротеиды. Качественные реакции на углеводный компонент в яичном белке.....	40
Приложение. Теоретический (справочный) материал.....	43
Список литературы.....	69

ВВЕДЕНИЕ

Настоящее учебно-методическое пособие предназначено для студентов магистратуры, обучающихся по направлению подготовки «Биотехнология», выполняющих лабораторные работы по дисциплине «Парафармацевтики в пищевой биотехнологии», которая входит в вариативную часть образовательной программы магистратуры, формирующей у обучающихся готовность к научно-исследовательской деятельности.

Целью освоения дисциплины «Парафармацевтики в пищевой биотехнологии» является формирование у студентов знаний и навыков в области производства и применения минорных биологически активных компонентов пищи в практической деятельности, а также воспитание у студентов устойчивых навыков самостоятельной научно-исследовательской работы. Лабораторные работы способствуют закреплению и углублению теоретических знаний студентов, развивают практические умения в научной работе по созданию БАД – парафармацевтиков и прививают навыки контроля показателей качества парафармацевтиков и входящих в их состав компонентов.

В результате изучения дисциплины студент должен:

знать:

- классификацию парафармацевтиков, их роль в создании современных продуктов питания;
- характеристику основных групп минорных компонентов пищи и способы их применения;
- значение минорных компонентов пищи для организма человека;
- принципы оценки безопасности парафармацевтиков и их гигиеническую регламентацию;

уметь:

- правильно подбирать парафармацевтики, учитывая их биологические и функциональные свойства;
- рассчитывать концентрацию и дозу парафармацевтиков при изготовлении функциональных продуктов питания;
- рассчитывать степень сбалансированности продуктов питания при использовании парафармацевтиков;

владеть:

- основными навыками идентификации парафармацевтиков;
- основными принципами разработки продуктов питания, обогащенных парафармацевтиками.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ

Каждая лабораторная работа начинается с рассмотрения ее цели и теоретической части изучаемой темы. Затем дается перечень необходимого оборудования, приборов, материалов, приводятся задания и порядок выполнения лабораторной работы, краткое ее содержание, методы исследования и требования к оформлению. Список рекомендуемой литературы приведен в конце методических указаний.

К работам в лаборатории студентов допускают после их ознакомления с правилами безопасности (с общими – в начале семестра и с частными – перед каждым занятием). Допуск к выполнению лабораторной работы происходит при условии положительной оценки ответов студентов на устные вопросы, охватывающие тему лабораторной работы. Полнота ответов студентов оценивается в баллах. Студенты, не подготовившиеся к занятию, к выполнению задания не допускаются и выполняют его вне расписания после повторной проверки готовности.

Отчет по лабораторной работе представляется в рукописном виде.

Защита отчета проходит в форме доклада студента по выполненной работе и ответов на вопросы преподавателя. Студент получает максимальное количество баллов при оформлении отчета в соответствии с требованиями и правильных ответах на заданные вопросы. Основанием для снижения количества баллов является:

- небрежное выполнение отчета;
- низкое качество графического материала (отсутствие указания единиц измерения на графиках и т.д.).

Отчет не может быть принят и подлежит доработке в случае отсутствия:

- необходимых разделов;
- необходимого графического материала;
- выводов по результатам работы.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ

Общие правила поведения в лаборатории

1. Лабораторные работы выполняются учащимися во время, предусмотренное расписанием занятий.
2. В лаборатории следует работать в хлопчатобумажном халате, волосы должны быть убраны.
3. Каждый должен работать на закрепленном за ним рабочем месте, на столе во время работы не должно находиться посторонних предметов.
4. Нельзя работать одному в лаборатории, так как при несчастном случае некому будет оказать помощь пострадавшему.
5. В лаборатории необходимо соблюдать порядок и тишину, правила техники безопасности.
6. Недопустимо в лаборатории принимать пищу, пить воду из химической посуды.
7. Нельзя пробовать на вкус и вдыхать химические вещества.
8. Запрещается проводить какие-либо опыты, не предусмотренные программой практикума, выносить реактивы из лаборатории.
9. К выполнению лабораторной работы можно приступать после тщательного изучения методики и правил работы с приборами.
10. После окончания работы следует вымыть посуду, отключить электроприборы, выключить воду, привести в порядок рабочее место. После выполнения работы необходимо вымыть руки с мылом.

Правила работы с химическими реактивами

Выполнение лабораторной работы неразрывно связано с применением различных реактивов. При работе с химическими реактивами необходимо соблюдать ряд правил. Несоблюдение их может привести к отравлениям, ожогам, повреждениям глаз, дыхательных путей и другим нежелательным последствиям.

1. На всех склянках с реактивами всегда должны быть этикетки с указанием названия реактива и степени его чистоты. Если на банке нет этикетки или надписи, такой реактив применять нельзя.
2. Твердые химические реактивы брать только шпателем, пинцетом или ложечкой.
3. Реактивы необходимо предохранять от загрязнения.
4. Реактивы следует расходовать экономно.
5. Реактивы, изменяющиеся под действием света, следует хранить только в желтых или темных склянках.
6. Не следует брать реактивы с соседних столов.

Правила работы со стеклянной химической посудой

Работа со стеклянной посудой требует внимания, навыков и выполнения ряда правил. Основным травмирующим фактором являются острые осколки стекла, способные вызвать порезы рук, а также ожоги при неосторожном обращении с нагретыми до высокой температуры частями стеклянной посуды.

1. Для работы используют только чистую посуду без трещин и других повреждений.
2. В опытах с нагревом необходимо пользоваться посудой, которая имеет соответствующую маркировку.
3. При сборке приборов, при укреплении колб в штативе, пробирок в пробиркодержателе не следует применять больших усилий.

Правила техники безопасности при работе с нагревательными приборами

В лаборатории применяют различные нагревательные приборы: электрические плитки, бани, сушильные шкафы, муфельные печи и т. п.

1. Каждый работающий в лаборатории должен знать, где расположены средства пожаротушения, и уметь ими пользоваться.
2. Запрещено использовать неисправные нагревательные приборы.
3. Нельзя оставлять без присмотра работающие электронагревательные приборы.
4. При работе с водяной баней нельзя пробовать степень нагрева воды рукой.
5. После окончания работы необходимо выключить приборы, привести в порядок рабочее место.

Оказание первой помощи при ожогах и других несчастных случаях

Многие химические вещества обладают достаточной силой, чтобы разрушить ткани организма человека. Наибольшим разрушающим потенциалом обладают концентрированные кислоты и щелочи. При воздействии кислот и щелочей на организм человека образуются химические ожоги. Химический ожог – это повреждение тканей, возникающее под действием кислот, щелочей, солей тяжелых металлов, едких жидкостей и других химически активных веществ. Химическое отравление представляет собой ответ организма на вдыхание, проникновение через слизистые оболочки или кожу, проглатывание, химических веществ. Первая помощь при несчастных случаях:

1. При воспламенении горючей жидкости на одежде работающего необходимо немедленно погасить пламя на пострадавшем, завернув его в шерстяное или проасбестованное одеяло.
2. При ожогах концентрированными растворами кислот пораженное место следует промыть сильной струей холодной воды в течение нескольких ми-

нут, затем – 2-3 %-ным раствором соды, после чего наложить повязку, смоченную 1-2 %-ным раствором перманганата калия. При сильных ожогах следует после оказания первой помощи обратиться к врачу.

3. При ожогах концентрированными растворами щелочей пораженное место следует промыть большим количеством холодной воды до тех пор, пока кожа перестанет казаться скользкой, затем – 1-2 %-ным раствором борной или уксусной кислоты, после чего наложить повязку, смоченную спиртовым раствором танина или 1-2 %-ным раствором перманганата калия.

4. При термических ожогах пострадавшее место необходимо многократно смочить раствором перманганата калия и спиртом, затем смазать мазью от ожогов.

5. При попадании какого-либо химического реактива в глаза следует промыть их обильным количеством воды и немедленно обратиться к врачу.

6. При отравлении газообразными веществами следует немедленно вывести пострадавшего на свежий воздух, а затем направить к врачу.

7. При порезах подставьте рану под струю холодной воды. Обработайте рану перекисью водорода (3 %), а края раны йодом или зеленкой.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1. КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИГМЕНТОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ, ПЕРСПЕКТИВНОМ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БАД – АНТИОКСИДАНТОВ

1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по проведению количественного анализа каротиноидов, хлорофиллов и ликопина в растительном сырье, а также выделению антоцианов из растительного сырья.

2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- провести количественное определение каротиноидов и хлорофиллов в растительном сырье спектрофотометрическим методом (п. 3.1);
- провести количественное определение ликопина в растительном сырье спектрофотометрическим методом (п. 3.2);
- выделить антоцианы из растительного сырья; зафиксировать изменение цвета экстрактов под действием кислот и щелочей, сформулировать выводы относительно наблюдаемых изменений (п. 3.3);
- сформулировать рекомендации по применению каротиноидов и хлорофиллов при создании БАД к пище, определить направленность БАД.

3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

Материалы и реактивы: растительное сырье (ягоды черники, черноплодной рябины, калины, клюквы, черной смородины, плоды свеклы, красного сладкого перца, краснокочанной капусты); кварцевый песок, кальций углекислый, ацетон, этиловый спирт 70 %-ный, хлороформ, 1 %-ный раствор соляной кислоты, 6 %-ный раствор уксусной кислоты, 0,025 %-ный раствор лимонной кислоты, 0,001 %-ный раствор едкого натра, бумага индикаторная.

Оборудование, лабораторная посуда: колбы конические объемом 250 см³, колбы мерные объемом 100 см³ и 50 см³, цилиндры мерные, воронки стеклянные, пробирки стеклянные, фильтры бумажные (синяя лента), фарфоровая ступка с пестиком, центрифуга, спектрофотометр, УЗ-баня, спиртовка, пробиркодержатели, индикаторная бумага.

3.1 Количественное определение каротиноидов и хлорофиллов в растительном сырье

Навеску (0,5 г) растительного материала растереть в фарфоровой ступке. При растирании растительной ткани в фарфоровой ступке в среду внести кварцевый песок и 1–2 г углекислого кальция (CaCO_3). Растирание производить до получения однородной массы, к которой прилить 10 cm^3 экстрагента (ацетон, этиловый спирт 70 %, хлороформ). К растертому материалу прилить еще 20 cm^3 экстрагента. Дать экстракту отстояться и профильтровать через бумажный фильтр (синяя лента) в коническую колбу. После этого в ступку прилить еще 20 cm^3 экстрагента, растереть и профильтровать, собирая фильтрат в ту же колбу. Данную процедуру повторить еще раз. Зафиксировать объем получившихся (суммарных) экстрактов.

Концентрацию хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов определить спектрофотометрическим методом. Для этого полученные экстракты налить в кювету спектрофотометра. Во вторую кювету налить растворитель (ацетон, этиловый спирт 70 %, хлороформ) и использовать как контроль. Кюветы поместить в кюветную камеру спектрофотометра и определить оптическую плотность (*A*) вытяжки при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения хлорофиллов и каротиноидов: для хлорофилла *a* – 662 нм, для хлорофилла *b* – 644 нм, для каротиноидов – 440,5 нм. Показания занести в таблицу 1.1.

Таблица 1.1 – Результаты измерений оптической плотности экстрактов

Экстрагент	Масса навески, г	Объем экстракта, cm^3	Оптическая плотность		
			A_{662}	A_{644}	$A_{440,5}$
<i>растительный объект 1</i>					
Ацетон		
		
		*
70 % этанол					
Хлороформ					
<i>растительный объект 2</i>					
Ацетон					
70 % этанол					
Хлороформ					
<i>растительный объект 3</i>					
Ацетон					
70 % этанол					
Хлороформ					

*измерение оптической плотности проводить в трех повторностях

Концентрацию пигментов (мкг/см³) в экстрактах рассчитать по формулам (1.1) – (1.4):

$$C_a = 9,784 \cdot A_{662} - 0,99 \cdot A_{644} \quad (1.1)$$

$$C_b = 21,426 \cdot A_{644} - 4,65 \cdot A_{662} \quad (1.2)$$

$$C_{a+b} = 5,134 \cdot A_{662} + 20,436 \cdot A_{644} \quad (1.3)$$

$$C_k = 4,695 \cdot A_{440,5} - 0,268 \cdot (C_a + C_b) \quad (1.4)$$

где A_{662} – оптическая плотность экстракта при 662 нм;

A_{644} – оптическая плотность экстракта при 644 нм;

$A_{440,5}$ – оптическая плотность экстракта при 440,5 нм;

C_a – концентрация хлорофилла a , мкг/см³;

C_b – концентрация хлорофилла b , мкг/см³;

C_k – концентрация каротиноидов, мкг/см³.

Содержание пигментов в образцах растительного сырья (мкг/г) рассчитать по формуле (1.5):

$$X = \frac{C \cdot V}{m} \quad (1.5)$$

где C – концентрация пигмента в экстракте, мкг/см³;

V – объем экстракта, см³;

m – масса навески растительного сырья, г.

В случае разбавления экстракта содержание пигментов в образцах (мкг/г) рассчитать по формуле (1.6):

$$X_1 = \frac{C \cdot V \cdot V_2}{m \cdot V_1} \quad (1.6)$$

где C – концентрация пигмента, мкг/см³;

V – объем исходного экстракта, см³;

V_1 – объем экстракта, взятого для разбавления, см³;

V_2 – объем разбавленного экстракта, см³;

m – масса навески растительного образца, г.

Результаты расчетов занести в таблицу 1.2.

Таблица 1.2 – Результаты количественного определения пигментов в растительном сырье

Экстрагент	Содержание пигментов в экстракте, мкг/см ³			Содержание пигментов в образце, мкг/г		
	chl <i>a</i>	chl <i>b</i>	car	chl <i>a</i>	chl <i>b</i>	car*
<i>растительный объект 1</i>						
Ацетон						
70 % этанол						
Хлороформ						
<i>растительный объект 2</i>						
Ацетон						
70 % этанол						
Хлороформ						
<i>растительный объект 3</i>						
Ацетон						
70 % этанол						
Хлороформ						

* chl *a* – хлорофилл *a*, chl *b* – хлорофилл *b*, car – каротиноиды

Измерение оптической плотности экстрактов проводить в трехкратной повторности.

Среднее арифметическое значение содержания пигментов \bar{X} в исследуемых растительных объектах рассчитать по формуле (1.7):

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i, \quad (1.7)$$

где n – число измерений.

Среднее квадратическое отклонение результата измерения рассчитать по формуле (1.8):

$$S_{\bar{X}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n(n-1)}}, \quad (1.8)$$

Доверительный интервал при вероятности $\alpha=0,95$ рассчитать по формуле (1.9):

$$\Delta \bar{X} = t_{\alpha, n} \cdot S_{\bar{X}}, \quad (1.9)$$

где $t_{\alpha, n}$ – коэффициент Стьюдента (таблица 1.3).

Таблица 1.3 – Значения коэффициента Стьюдента

№	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$t_{\alpha,n}$	12,7	4,3	3,2	2,8	2,6	2,4	2,4	2,3	2,3

Относительную погрешность измерения (%) рассчитать по формуле (1.10):

$$\varepsilon_{\bar{X}} = \frac{\Delta\bar{X}}{\bar{X}} \cdot 100. \quad (1.10)$$

В таблицу 1.2 значения содержания пигментов внести в формате: $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$.

По итогам выполненных измерений рассчитать соотношения для каждого экстракта:

- содержание хлорофилла *a* / содержание хлорофилла *b*;
- содержание хлорофиллов / содержание каротиноидов.

Проанализировать полученные результаты и сделать вывод о наиболее предпочтительном экстрагенте для извлечения хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов из растительных объектов.

3.2 Количественное определение ликопина в растительном сырье

Сущность метода состоит в переводе ликопина из проб растительного сырья в раствор путем растворения навески пробы в воде и дальнейшей экстракции смесью воды и ацетона с последующим определением содержания ликопина спектрофотометрическим методом.

Навеску анализируемой пробы растительного сырья 1–2 г поместить в мерную колбу вместимостью 100 см³, прилить 10 см³ воды. Колбу поместить в ультразвуковую баню на 5 мин. Смесь нагреть в ультразвуковой бане до 60 °С в течение 3–5 мин. Раствор охладить, довести объем раствора до метки ацетоном. Перенести 1 см³ раствора в мерную колбу вместимостью 50 см³ и довести объем раствора до метки смесью вода:ацетон (1:9), отфильтровать.

Измерить оптическую плотность исследуемого раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 475 нм. В качестве раствора сравнения использовать смесь вода:ацетон (1:9).

Содержание ликопина (*X*, %) в процентах вычислить по формуле (1.11):

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50}{3220 \cdot 1 \cdot m}, \quad (1.11)$$

где *A* – оптическая плотность исследуемого раствора при длине волны 475 нм;

3220 – удельный показатель поглощения ликопина в смеси вода:ацетон (1:9);

m – масса навески, г;

100, 1, 50 – разведения, см³.

3.3 Выделение антоцианов из растительного сырья. Изменение цвета экстрактов под действием кислот и щелочей

0,5–1 г растительного сырья поместить в пробирку. Залить 5 см³ воды и довести до кипения над пламенем спиртовки. Нагревание выше 70 °С приводит к разрушению мембран клеток. Антоцианы свободно выходят из клеток, окрашивая воду в розовый, синий или зеленоватый цвет. Отфильтровать раствор в чистую пробирку через бумажный фильтр.

Вместо кипячения растительный материал можно измельчить в ступке с небольшим количеством песка, и, добавив около 5 см³ воды, отфильтровать. Цвет раствора убеждает в том, что антоцианы – водорастворимые пигменты.

В чистую пробирку отлить 2-3 см³ вытяжки пигментов, добавить каплю разбавленной кислоты (1 %-ной соляной, 6-9 %-ной уксусной, 0,025 %-ной лимонной). Если полученная вытяжка антоцианов имела первоначально буроватую окраску, то после добавления 1-2 капель кислоты она примет красивый розово-красный цвет. Изменения окраски связаны с перестройками в молекуле антоциана.

К окрасившемуся в розовый цвет раствору добавлять по каплям разбавленную щелочь (0,001 %-ный раствор едкого натра) или немного, на самом кончике ножа, порошка пищевой соды. Розовая окраска исчезает.

Контролируя с помощью индикаторной бумаги изменение рН раствора, происходящее в результате постепенного добавления кислоты или щелочи, можно установить более точную зависимость цвета антоцианов от кислотности среды. Например, у краснокочанной капусты исходная вытяжка имеет красно-фиолетовый цвет. В сильнокислой среде (рН 2-3) она приобретает красный, а при рН 4-5 – розовый цвет. В результате нейтрализации розово-красный цвет изменяется сначала на синий (нейтральная среда, рН 6-7), затем на зеленый (рН 8), желто-зеленый (рН 9-10) и в сильнощелочной среде – на желтый (рН выше 10).

К зеленоватому или синему раствору добавить еще несколько капель кислоты. Наблюдается повторное появление красного окрашивания. Можно повторить весь цикл изменения окраски антоциановых растворов под действием кислот и щелочей несколько раз.

Вытяжка пигментов синих лепестков и листьев многих растений при добавлении щелочи окрашивается в зеленый цвет. Только у некоторых видов, например, у фиолетовых анютиных глазок, гибискуса (китайская роза), красно-

кочанной капусты раствор антоциана приобретает под действием щелочи довольно устойчивую сине-фиолетовую окраску. У василька синего голубая окраска устойчива даже в кислой среде (рН 4-6). Причина этого явления в том, что голубой и синий цвета появляются только в том случае, если молекула пигмента входит в состав сложного комплексного соединения с металлами (Fe, Ca, Mg и др.), углеводами, белками. У многих видов в процессе выделения пигментов из листьев происходит разрушение этого комплекса и утрата способности к проявлению голубого и синего цветов.

4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение свободного радикала, активных форм кислорода и антиоксиданта.
2. В чем сущность свободнорадикальной теории старения?
3. Назовите ферменты антиоксидантной системы человека.
4. Какие пигменты относятся к каротиноидам?
5. В чем отличие хлорофилла *a* от хлорофилла *b*?
6. При каких длинах волн поглощают свет фотосинтетические пигменты?
7. Опишите закономерности изменения цвета антоциановых экстрактов в зависимости от рН среды. В чем химическая суть данных изменений?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2. ЭКСТРАКЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА И ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по экстрагированию органических кислот из растительного материала и количественному определению различных фракций кислот в экстрактах, а также по количественному анализу щавелевой, лимонной и аскорбиновой кислот в растительном материале.

2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- экстрагировать органические кислоты из растительного материала и определить содержание различных фракций кислот в экстракте (п. 3.1);
- провести количественное определение щавелевой кислоты в растительном материале (п. 3.2);
- провести количественное определение лимонной кислоты в растительном материале (п. 3.3);
- провести количественное определение аскорбиновой кислоты в растительном материале (п. 3.4);
- сформулировать рекомендации по применению органических кислот при создании БАД к пище, определить направленность БАД.

3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

Материалы и реактивы: растительное сырье: плоды калины, клюквы, облепихи, яблок, листья крапивы, щавеля, петрушки, стебли ревеня; 0,1 н. раствор гидроксида натрия, 0,1 н. раствор гидроксида бария, 0,1 %-ный раствор фенолфталеина, катионообменные смолы КУ-1 или КУ-2, 10 %-ный раствор серной кислоты, раствор аммиака, борная кислота, 0,1 н. и 4 %-ные растворы калия марганцовокислого, 1 %-ный и 0,01 н. растворы серебра азотнокислого, кальций хлористый, 50 %-ный раствор уксусной кислоты, натрий уксуснокислый, 12 %-ный раствор калия бромистого, 10 %-ный раствор натрия сернистокислого, 20 %-ный раствор аммония надсернистокислого, 4 %-ный раствор фосфорномолибденовой кислоты, натрий лимоннокислый, 0,1 М раствор соляной кислоты, 1 %-ный раствор феррицианида калия, 2 %-ный раствор натрия фтористого, 0,02 %-ный раствор аскорбиновой кислоты, 2 %-ный раствор железа хлорного, 20 %-ный раствор железа сернокислого (7-водного) или соли Мора, раствор эозина с метиленовой синью.

Приготовление 20 %-ного раствора $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ или соли Мора $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: к 50 г соли добавить 200 см³ воды, 5 см³ концентрированной серной кислоты и разбавить водой до 250 см³.

Приготовление 0,01 н. раствора AgNO_3 : приготовить 0,05 н. раствор – 4,25 г AgNO_3 , высушенного при 100 °С, растворить в дистиллированной воде и довести до 500 см³, хранить в темной склянке, перед употреблением развести в 5 раз.

Приготовление раствор эозина с метиленовой синью: 0,5 г натриевой соли эозина и 0,2 г метиленового синего растворить в воде и довести объем до 100 см³.

Оборудование, лабораторная посуда: колбы конические, колбы мерные, мерные цилиндры, фарфоровые чашки, фарфоровые ступки с пестиками, делительная воронка, колонка Самуэльсона/бюретка, колбы Эрленмейера, водяная баня, сушильный шкаф, центрифуга, фотоэлектрочелювач.

3.1 Экстракция органических кислот из растительного материала и определение содержания различных фракций кислот в экстракте

Перед использованием ионообменную смолу просеять через два сита с размером отверстий 1 мм и 0,5 мм. Собрать фракцию тех частиц, которые просеиваются через первое сито (размер отверстий 1 мм) и остаются на втором. Частицы крупнее 1 мм растереть в фарфоровой ступке и вновь просеять. 40 г сухой смолы отмыть в десятикратном объеме дистиллированной воды до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. Смолу залить новой порцией воды и оставить на 3 ч для набухания при периодическом помешивании. Набухшую смолу перенести в колонку Самуэльсона, на дно которой помещена стеклянная вата. После наполнения колонки смолу уплотнить стеклянной палочкой. На одну стандартную колонку расходуется около 20 г смолы. Для удаления низкомолекулярных примесей смолу обработать щелочью.

Через колонку пропустить 150-200 см³ 5 %-ного раствора гидроксида натрия со скоростью 1,5-2,5 см³ в минуту. Затем катионит отмыть водой до нейтральной реакции и перевести его в H^+ -форму пропусканием 7 %-ной соляной кислоты. Обработку кислотой прекратить, когда ее концентрация на выходе из колонки равна исходной. Далее колонку со смолой отмыть дистиллированной водой до нейтральной реакции промывной жидкостью. Достаточно пропустить через колонку две порции воды: 200 и 100 см³.

Определить титруемую кислотность водного экстракта, соответствующую содержанию свободных кислот. Две пробы по 50 см³ титровать 0,1 н. гидроксидом натрия с добавлением нескольких капель 0,1 %-ного фенолфталеина до появления розового окрашивания.

Содержание свободных органических кислот рассчитать по формулам (2.1) – (2.3):

$$C_1 = \frac{0,1 \cdot f \cdot a_1 \cdot V_0}{50}, \quad (2.1)$$

$$Q_1 = \frac{f \cdot a_1 \cdot V_0}{50} \cdot K, \quad (2.2)$$

$$X_1 = \frac{Q_1}{H} \cdot 100, \quad (2.3)$$

где f – поправка к титру у 0,1 н. щелочи; a_1 – объем 0,1 н. NaOH, пошедший на титрование 50 см³ экстракта; V_0 – исходный объем экстракта; H – навеска растительного материала (мг); K – пересчетный коэффициент яблочной кислоты – титр 0,1 н. щелочи по яблочной кислоте (он рассчитывается как произведение миллиграмм-эквивалента кислоты на нормальность щелочи и равен 6,7 мг); C_1 , Q_1 , X_1 – содержание свободных кислот, миллиграмм-эквиваленты, расчет на яблочную кислоту (мг), проценты от сухой массы, соответственно.

Нейтрализованные пробы объединить с остальным фильтратом. Большая часть кислот в тканях растений уравновешена (связана) одно- и двухвалентными катионами. Для получения из солей свободных кислот используют катионообменные смолы КУ-1 или КУ-2. Катионит КУ-2 позволяет удалить из раствора не только катионы, но и аминокислоты. Экстракт пропустить через колонку со смолой в H⁺-форме со скоростью 1,5-2,5 см³/мин. Затем колонку промыть тремя порциями воды по 70 см³. Элюат объединить с двумя порциями промывных вод. Третью порцию нейтрализовать щелочью, чтобы проконтролировать полноту выхода кислот. Из экстракта взять две пробы по 50 см³ и нейтрализовать 0,1 н. раствором гидроксида бария по фенолфталеину. По расчету нейтрализовать остальной объем элюата. Далее раствор довести до кипения и проверить pH по универсальному бумажному индикатору, если необходимо добавить барит. В осадок выпадают бариевые соли серной, фосфорной и щавелевой кислот. Вычислить общее содержание кислот в навеске ткани (формулы (2.4) – (2.6)):

$$C_0 = \frac{0,1 \cdot f \cdot \bar{a}_1 \cdot V_0}{V_1}, \quad (2.4)$$

$$Q_0 = \frac{f \cdot \bar{a}_1 \cdot V_0}{V_1} \cdot K = \frac{C_0 \cdot K}{0,1}, \quad (2.5)$$

$$X_0 = \frac{Q_0}{H} \cdot 100, \quad (2.6)$$

где f – поправка к титру у 0,1 н. Ва(ОН)₂; \bar{b}_1 – объем 0,1 н. Ва(ОН)₂, пошедший на титрование элюата; V_o – исходный объем водного экстракта; объем экстракта после фильтрования; C_o , Q_o , X_o – общее содержание кислот, миллиграмм-эквиваленты, пересчет на яблочную кислоту, проценты на сухую массу, соответственно.

Содержание кислот, находящихся в связанном состоянии, т.е. в форме солей, рассчитать как разницу между общим содержанием кислот и количеством свободных кислот, используя формулу (2.7):

$$C_2 = C_o - C_1 \quad (2.7)$$

После выпадения в осадок минеральных солей серной и фосфорной кислот определить содержание органических кислот. Осадок бариевых солей удалить центрифугированием всего охлажденного раствора в течение 15 мин при 1-2 тыс. г. Измерить объем центрифугата, содержащий в основном бариевые соли органических кислот. 50 см³ центрифугата пропустить через колонку с катионитом в Н⁺-форме. Колонку отмыть тремя порциями воды по 70 см³. Объединенный элюат нейтрализовать 0,1 н. баритом и отбросить. Рассчитать количество барита, которое пошло бы на титрование всего объема центрифугата, и определить содержание органических кислот в навеске исследуемого материала по формулам (2.8) – (2.10):

$$C_3 = \frac{0,1 \cdot f \cdot \bar{b}_2 \cdot V_o \cdot V_2}{50 \cdot V_1}, \quad (2.8)$$

$$Q_3 = \frac{C_3 \cdot K}{0,1}, \quad (2.9)$$

$$X_3 = \frac{Q_3}{H} \cdot 100, \quad (2.10)$$

где \bar{b}_2 – объем 0,1 н. Ва(ОН)₂, пошедший на титрование 50 см³ центрифугата; V_2 – объем центрифугата; C_3 , Q_3 , X_3 – содержание органических кислот, миллиграмм-эквиваленты, миллиграммы яблочной кислоты, проценты на сухую массу, соответственно.

По разности общего содержания кислот и количества органических кислот определить содержание минеральных кислот по формуле (2.11):

$$C_4 = C_o - C_3 \quad (2.11)$$

Далее бариевые соли органических кислот осадить этиловым спиртом. Оставшийся центрифугат сгустить выпариванием в фарфоровой чашке на водя-

ной бане до тех пор, пока объем не уменьшится до 25-30 см³. Раствор органических кислот перенести в мерный цилиндр с притертой пробкой, довести объем раствора до 37 см³ водой и добавить этиловый спирт до 100 см³ (конечная концентрация спирта 60 %). Раствор тщательно перемешать и оставить на ночь. Если на нейтрализацию всего экстракта пошло более 100 см³ Ва(ОН)₂, то раствор органических кислот сгустить, довести его объем до 74 см³ и добавить спирт до 200 см³. При этом осаждаются соли ди- и трикарбоновых кислот (на 95-98 %). Осадок отделить центрифугированием в течение 10 мин при 2-3 тыс. g. В растворе остаются бариевые соли азотной кислоты, полиоксикислот, некоторых других кислот, а также неэлектролиты. Осадок промыть 15 см³ 60 %-ного этанола и вновь центрифугировать. Промывку провести дважды.

Осадок перенести в колбу Эрленмейера на 500 см³ и прилить 250-300 см³ горячей воды для растворения осадка. Раствор нагреть до кипения, нерастворившуюся часть осадка отфильтровать. Охлажденный фильтрат пропустить через колонку с катионитом в Н⁺-форме. Колонку промыть тремя порциями и воды по 70 см³. Две первые порции присоединить к элюату, третью нейтрализовать щелочью для проверки полноты выхода кислот. Раствор кислот упарить под вакуумом или в фарфоровой чашке на водяной бане до тех пор, пока объем не уменьшится до 80-90 см³ и перенести в мерную колбу на 100 см³. Довести объем до метки и определить содержание ди- и трикарбоновых кислот. Отобрать две пробы по 10 см³ и титровать 0,1 н. NaOH. Вычислить содержание ди- и трикарбоновых кислот в исходной навеске по формулам (2.12) – (2.14):

$$C_5 = \frac{0,1 \cdot f \cdot n \cdot a_2 \cdot V_0 \cdot V_2}{V_1(V_2 - 50)}, \quad (2.12)$$

$$Q_5 = \frac{C_5 \cdot K}{0,1}, \quad (2.13)$$

$$X_5 = \frac{Q_5}{H} \cdot 100, \quad (2.14)$$

где a_2 – объем 0,1 н. NaOH, пошедший на титрование 10 см³ пробы; n – пересчет на весь объем раствора ди- и трикарбоновых кислот (здесь он равен 10); C_5 , Q_5 , X_5 – содержание ди- и трикарбоновых кислот, миллиграмм-эквиваленты, миллиграммы яблочной кислоты, проценты на сухую массу, соответственно.

По разности содержания органических кислот и количества ди- и трикарбоновых кислот вычислить содержание фракции кислот, бариевые соли которых не осаждаются 60 %-ным спиртом, по формуле (2.15):

$$C_6 = C_3 - C_5. \quad (2.15)$$

Полученные результаты внести в таблицу 2.1.

Таблица 2.1 – Результаты определения содержания различных фракций кислот в растительных экстрактах

Наименование растительного объекта	Содержание свободных органических кислот, % (формула (2.3))	Общее содержание кислот, % (формула (2.6))	Содержание кислот, находящихся в связанном состоянии, % (формула (2.7))	Содержание минеральных кислот, % (формула (2.11))	Содержание ди- и трикарбоновых кислот, % (формула (2.14))
<i>Объект 1</i>					
<i>Объект 2</i>					
....					
....					
<i>Объект n</i>					

3.2 Количественное определение щавелевой кислоты в растительном материале

Приготовить раствор для осаждения щавелевой кислоты следующим образом. 25 г хлористого кальция растворить в небольшом количестве воды в мерной колбе на 500 см³, объем раствора довести до метки 50 %-ной уксусной кислотой (раствор 1); 330 г уксуснокислого натрия растворить в 500 см³ воды (раствор 2). Два раствора хорошо перемешать и выдержать 48 ч в холодильнике, затем отфильтровать.

Для выделения щавелевой кислоты лучше использовать свежий растительный материал, так как высушивание при 120 °С приводит к потере оксалата. 40-50 г свежей измельченной растительной ткани гомогенизировать в 50 см³ воды, затем добавить серную кислоту. Если для анализа используют сухой материал, то навеску 5 г растереть со стеклянным песком в ступке с добавлением 5 см³ 10 %-ной серной кислоты и небольшого количества этанола. Затем перенести гомогенат (смывая его водой) в мерный цилиндр и довести объем смеси до 250 см³. Смесь встряхнуть и оставить на несколько часов. В раствор переходят свободная щавелевая кислота и ее соли. Если необходимо определить свободную щавелевую кислоту, экстракцию проводить нагретой до 60–80 °С дистиллированной водой без подкисления.

После отстаивания экстракт отфильтровать через бумажный фильтр или центрифугировать при 2-3 тыс.г 10 мин. 50 см³ экстракта перенести в колбу на 200 см³ и добавить по каплям 18 н. раствор аммиака до слабощелочной реакции

и 1-2 г борной кислоты (ее добавляют для предотвращения осаждения винной кислоты). Затем внести 10 см³ буферного раствора хлористого кальция и оставить на 48 ч в холодильнике.

Выпавший осадок оксалата кальция отделить фильтрованием или центрифугированием в течение 10 мин при 1-2 тыс.г. Осадок промыть двумя-тремя порциями воды по 10 см³ до отрицательной реакции на присутствие ионов серебра при добавлении капли 1 %-ного раствора азотнокислого серебра. Далее осадок растворить в 5 см³ 10 %-ной серной кислоты и нагреть на кипящей водяной бане. Щавелевую кислоту титровать перманганатом калия до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение минуты.

Процентное содержание щавелевой кислоты рассчитать по формуле (2.16):

$$X = \frac{4,5 \cdot f \cdot a \cdot V_0}{H \cdot V_1} \cdot 100, \quad (2.16)$$

где 4,5 – титр 0,1 н. перманганата калия по щавелевой кислоте (пересчитанный коэффициент щавелевой кислоты), f – поправка к титру KMnO_4 , a – объем KMnO_4 , израсходованный на титрование (см³), V_0 – общий объем экстракта (см³), V_1 – объем экстракта, взятый для анализа (см³), H – навеска сухого растительного материала (мг).

3.3 Количественное определение лимонной кислоты в растительном материале

1 г воздушно-сухого растительного материала растереть в ступке с 1 см³ раствора серной кислоты (1:9), добавить 5 см³ воды, снова растереть. Смесь перенести в мерную колбу на 25 см³ и добавить 2 см³ 4 %-ного раствора фосфорномолибденовой кислоты, объем довести до метки и оставить на ночь. Смесь отфильтровать через сухой складчатый фильтр. Для проведения реакции образования пентабромацетона из фильтрата отобрать 2-3 пробы по 5 см³. К ним добавить по 1 см³ серной кислоты (1:9) и 1 см³ 12 %-ного бромистого калия и перемешать. Затем добавить 2 см³ 4 %-ного перманганата калия, перемешать и оставить пробирки в вытяжном шкафу на 10 мин, периодически встряхивая. Образуется коричневый осадок оксида марганца (MnO_2). Если раствор бесцветный, добавить еще 0,5 см³ перманганата. К смеси прилить 2 см³ 20 %-ного раствора железа сернокислого или соли Мора до исчезновения осадка.

Пробирки поместить в воду со льдом или холодильник. Раствор становится мутным, образуется белый осадок пентабромацетона. Одну-две пробы использовать для определения пентабромацетона весовым способом. Смесь с осадком перенести в стаканчик с дном – стеклянным фильтром № 2. Осадок промыть водой до нейтральной реакции по метилоранжу. Стаканчик с осадком

высушить в эксикаторе над серной кислотой и взвесить. Зная массу пустого стаканчика, определить массу осадка. Содержание лимонной кислоты, проценты на сухую массу, вычислить по формуле (2.17):

$$X = \frac{0,483 \cdot p \cdot V_0}{H \cdot V_1} \cdot 100, \quad (2.17)$$

где 0,483 – масса лимонной кислоты, соответствующая 1 мг пентабромацетона (мг), p – масса осадка пентабромацетона (мг), H – навеска растительной ткани (мг), V_0 – исходный объем экстракта, V_1 – объем экстракта, взятый на анализ.

Из другой пробы фильтрата пентабромацетон извлечь хлороформом. Пробу перенести в делительную воронку на 100 см³ и прилить 5 см³ хлороформа. Воронку встряхнуть 1 мин и оставить на 2-3 мин. Отделившийся нижний слой хлороформа слить в колбу. К водной фракции добавить еще 5 см³ хлороформа, взболтать и слить нижний слой в ту же колбу. Делительную воронку освободить, промыть водой. В нее вновь налить хлороформный раствор, добавить 20 см³ воды, встряхнуть и слить нижний слой хлороформа в ту же колбу. Затем в колбу добавить 1 см³ 10 %-ного сернистокислового натрия и поместить ее в кипящую водяную баню в вытяжном шкафу для удаления хлороформа. Далее добавить 20 см³ воды и кипятить раствор на плитке. При этом пентабромацетон разлагается с выделением бромида. К пробе добавить 2 см³ 20 %-ного персульфата аммония для устранения влияния сульфата натрия, 2 капли эозина с метиленовой синью и титровать 0,01 н. раствором азотнокислого серебра до розово-фиолетовой окраски.

Содержание лимонной кислоты, проценты на сухую массу, вычислить по формуле (2.18):

$$X = \frac{38,42 \cdot a \cdot N \cdot V_0}{H \cdot V_1}, \quad (2.18)$$

где 38,42 – пересчетный коэффициент лимонной кислоты для 1 см³ 1 н. AgNO₃, соответствующий 1/5 молекулярной массы лимонной кислоты (из одного моля пентабромацетона выделяется 5 молей бромида), a – объем 0,01 н. AgNO₃, израсходованный на титрование, N – нормальность раствора AgNO₃.

3.4 Количественное определение аскорбиновой кислоты в растительном материале

Приготовить буферную смесь: 0,1 М раствор цитрата натрия смешать с 0,1 М раствором соляной кислоты (соотношение объемов 1:1, рН 3,69); свежес-

приготовленный 1 %-ный раствор феррицианида калия, 2 %-ный раствор натрия фтористого, 0,02 %-ный раствор аскорбиновой кислоты, 2 %-ный раствор железа хлорного.

10-20 г растительного материала (мякоть или цедра лимона, листья капусты, клубни картофеля и др.) грубо измельчить стальным ножом и затем быстро растереть в ступке с кварцевым песком в равном объеме буферного раствора. Растертую массу перенести в мерную колбу и объем смеси довести до 100 см³. Через 10 мин гомогенат отфильтровать через складчатый бумажный фильтр и центрифугировать 10 мин при 3000 г. 20 см³ фильтрата перенести в колбу на 100 см³, добавить 1 см³ 1 %-ного раствора феррицианида калия, 1 см³ 2 %-ного раствора фтористого натрия и дистиллированную воду до 80-90 см³. Затем внести 2 см³ 2 %-ного раствора хлорного железа, довести общий объем смеси до 100 см³ и тщательно перемешать. В контрольный раствор вместо фильтрата внести 20 см³ буфера. Через 5 мин определить оптическую плотность раствора на ФЭКе при красном светофильтре в кювете толщиной 1 см.

Для построения калибровочного графика приготовить серию растворов с концентрацией аскорбиновой кислоты от 2 до 12 мкг/см³: в мерные колбы на 100 см³ внести 1, 2, 3. .. 6 см³ 0,02 %-ного раствора аскорбиновой кислоты, 20 см³ буфера и все остальные компоненты реакционной смеси. Содержание аскорбиновой кислоты в растительном материале рассчитать по формуле (2.19):

$$C = \frac{K \cdot V_0 \cdot V_2}{H \cdot V_1 \cdot 10}, \quad (2.19)$$

где K – найденная по калибровочной кривой концентрация аскорбиновой кислоты (мкг/см³); V_0 – исходный объем экстракта (см³); V_1 – объем экстракта, использованный в анализе (см³), V_2 – объем реакционной смеси (см³); H – навеска растительного материала (г); C – содержание аскорбиновой кислоты (миллиграммы на 100 г растительного материала).

В ходе анализа не следует увеличивать содержание ионов фтора в реакционной смеси, так как это ведет к нарушению развития окраски. Нужно отметить, что в растительном экстракте обычно имеются и другие соединения, способные восстанавливать трехвалентное железо феррицианида, поэтому полученные данные о содержании аскорбиновой кислоты оказываются завышенными (на 10-20 %). Более точные результаты можно получить, определяя содержание аскорбиновой кислоты после хроматографического разделения растительного экстракта. Подходящей системой растворителей является смесь н-бутанол, ледяная уксусная кислота, вода (4:1:5).

Результаты количественного определения щавелевой, лимонной и аскорбиновой кислот в растительном материале внести в таблицу 2.2.

Таблица 2.2 – Результаты количественного определения щавелевой, лимонной и аскорбиновой кислот в растительном материале

Наименование растительного объекта	Содержание кислот, %		
	щавелевой (формула (2.16))	лимонной (формулы (2.17) – (2.18))	аскорбиновой (формула (2.19))
<i>Объект 1</i>			
<i>Объект 2</i>			
....			
....			
<i>Объект n</i>			

4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение органических кислот, приведите примеры.
2. В каком метаболическом процессе образуются органические кислоты?
3. В чем сущность метода выделения органических кислот из растительного материала?
4. Опишите принципы методов количественного определения щавелевой, лимонной и аскорбиновой кислот в растительном материале.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3. ВЫДЕЛЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ

1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по извлечению алкалоидов из растительного сырья, проведению качественных реакций и количественному анализу алкалоидов в разных видах растительного сырья.

2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- выделить сумму алкалоидов из растительного сырья (п. 3.1);
- выделить алкалоиды в форме солей из растительного сырья (п. 3.2);
- провести качественные реакции на выделенные алкалоиды (п. 3.3);
- провести количественное определение тропановых алкалоидов в растениях семейства Solanaceae (п. 3.4);
- сформулировать рекомендации по применению алкалоидов при создании БАД к пище, определить направленность БАД.

3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

Материалы и реактивы: растительное сырье на выбор из списка: чай черный листовой, перец стручковый, термопсис ланцетный (трава), чистотел большой (трава), барбарис обыкновенный (листья, корни), красавка обыкновенная (листья, трава, корни), паслен долчатый (трава); 0,05 %-ный раствор серной кислоты, концентрированный раствор аммиака, диэтиловый эфир, безводный натрия сульфат, сулема (HgCl_2), калий йодистый, нитрат висмута, уксусная кислота, йод кристаллический, йодид кадмия, натрия фосфат, азотная кислота, молибдат аммония, кремневольфрамовая кислота, фосфорновольфрамовая кислота, соляная кислота, пикриновая кислота, хлороформ, фенолфталеин, метиловый оранжевый, метиленовый синий, 0,02 М раствор натрия гидроксида.

Оборудование, лабораторная посуда: колбы конические, колбы круглодонные, воронки делительные на 50 см³, воронки стеклянные, бумага фильтровальная, часовое стекло, баня водяная, мерные цилиндры.

3.1 Выделение суммы алкалоидов из растительного сырья

1 г измельченного растительного сырья поместить в коническую колбу вместимостью 25 см³, добавить 10 см³ 0,05 %-ной кислоты серной, взболтать в течение 2 мин и отфильтровать в делительную воронку вместимостью 50 см³. Добавить 1 см³ концентрированного раствора аммиака и 5 см³ воды, тщательно взболтать с 15 см³ эфира, отделить эфирный слой и отфильтровать его через безводный натрия сульфат. Эфирное извлечение поместить в делительную воронку, алкалоиды извлечь 10 см³ 0,05 %-ного раствора кислоты серной для проведения реакций со специальными реактивами.

3.2 Выделение алкалоидов в форме солей из растительного сырья

1,0 г сырья, измельченного и просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, поместить в колбу со шлифом, залить 25 см³ 1 %-ного раствора кислоты хлористоводородной и нагреть на кипящей водяной бане в течение 30 мин, периодически помешивая. Охлажденное извлечение отфильтровать и использовать для проведения качественных реакций.

3.3 Проведение качественных реакций на выделенные алкалоиды

На предметное стекло поместить 2-3 капли кислого извлечения алкалоидов, полученного в заданиях 3.1–3.2, и добавить 1 каплю специального реактива. Наблюдать появление характерной окраски раствора.

1) Реакция с реактивом Майера (раствор дийодида ртути в йодиде калия: $\text{HgI}_2 + 2\text{KI} = \text{K}_2\text{HgI}_4$). Результат – белый или желтоватый осадок.

Приготовление реактива Майера: 1,358 г сулемы (HgCl_2) растворить в 60 мл воды, прилить раствор 5 г йодида калия в 10 см³ воды и разбавить водой до 100 см³.

2) Реакция с реактивом Драгендорфа (раствор йодида висмута в йодиде калия: $\text{BiI}_3 + \text{KI} = \text{KBiI}$). Результат – с большинством алкалоидов образуются оранжево-красные или кирпично-красные осадки.

Приготовление реактива Драгендорфа: вначале 0,85 г нитрата висмута основного растворить в 40 см³ воды и 10 см³ уксусной кислоты. Затем приготовить раствор йодида калия в воде, для чего 8 г йодида калия растворить в 20 см³ воды. Смешать равные объемы приготовленных растворов. К 10 см³ полученной смеси добавить 100 см³ воды и 20 см³ уксусной кислоты.

3) Реакция с реактивами Вагнера, Бушарда (раствор йода в растворе йодида калия в различных концентрациях). Результат – бурый осадок.

Приготовление реактива Вагнера: 1,27 г йода растворить в 100 см³ 2 %-ного водного раствора йодида калия.

Приготовление реактива Бушарда: 1 г йода растворить в 50 см³ 4 %-ного водного раствора йодида калия.

4) Реакция с реактивом Марме (раствор йодида кадмия в растворе йодида калия). Результат – беловатый или желтоватый осадок.

Приготовление реактива Марме: 10 г йодида кадмия растворить в 100 см³ 20 %-ного горячего водного раствора йодида калия.

5) Реакция с раствором фосфорно-молибденовой кислоты (реактивом Зонненштейна). Результат – желтоватые осадки, которые приобретают через некоторое время синее или зеленое окрашивание вследствие восстановления молибденовой кислоты.

Приготовление раствора фосфорно-молибденовой кислоты: к раствору фосфата натрия, подкисленному азотной кислотой, прилить подкисленный азотной кислотой раствор молибдата аммония до тех пор, пока не прекратится выделение осадка. Осадок промыть водой и растворить в небольшом количестве соды. Полученный раствор выпарить досуха и прокалить до удаления аммонийных солей. Остаток растворить в десятикратном количестве воды и прибавить азотную кислоту до растворения образующегося при этом осадка.

6) Реакция с раствором кремневольфрамовой кислоты. Результат – аморфные осадки белого, светло-желтого цвета.

Приготовление раствора кремневольфрамовой кислоты: 1 г кремневольфрамовой кислоты растворить в воде и довести водой до 100 см³.

7) Реакция с раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты (реактив Шейблера). Результат – аморфные осадки белого цвета.

Приготовление раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты: 0,3 г фосфорно-вольфрамовой кислоты растворить в 0,8 см³ 8 %-ной соляной кислоты и разбавить водой до 10 см³.

8) Реакция с 1 %-ным водным раствором пикриновой кислоты. Результат – желтый кристаллический осадок.

9) Реакция с 0,1 %-ным водным раствором танина. Результат – беловатый или желтоватый аморфный осадок.

Полученные результаты качественного определения алкалоидов в растительном сырье внести в таблицу 3.1.

Таблица 3.1 – Результаты качественного определения алкалоидов в растительном сырье

Наименование растительного объекта	Результат качественной реакции (п. 3.3)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Объект 1</i>	*								
<i>Объект 2</i>									
....									
....									
<i>Объект n</i>									

*результат записать в формате «+» или «-»

3.4 Количественное определение тропановых алкалоидов в растениях семейства Solanaceae

Около 10,0 г сырья просеять сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, взвесить с точностью до 0,015 г, поместить в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 см³, прилить 150 см³ эфира, 7 см³ концентрированного раствора аммиака и взболтать смесь в течение 1 ч. Эфирное извлечение отфильтровать через вату в колбу вместимостью 200 см³, закрывая воронку часовым стеклом.

К фильтрату прилить 5 см³ воды, энергично взболтать и оставить до осветления эфирного слоя, после чего отмерить мерным цилиндром 90 см³ эфирного извлечения в делительную воронку емкостью 200 см³. Цилиндр дважды ополоснуть эфиром по 10 см³ и прибавить к отмеренному эфирному извлечению. Из эфирного извлечения алкалоиды экстрагировать 1 %-ным раствором кислоты хлористоводородной последовательно 20, 15 и 10 см³ (проба с реактивом Майера), каждый раз фильтровать через фильтр, смоченный водой, в другую делительную воронку такой же емкости. Фильтр дважды промыть 1 %-ным раствором кислоты хлористоводородной по 5 см³, присоединяя промывные жидкости к общему кислотному извлечению. Кислотное извлечение довести до щелочной реакции раствором аммиака по фенолфталеину, и алкалоиды экстрагировать последовательно 20, 15 и 10 см³ хлороформа, взбалтывая по 3 мин. Хлороформное извлечение отфильтровать в круглодонную колбу вместимостью 100 см³ через бумажный фильтр, смоченный хлороформом, на который насыпано 4–5 г безводного натрия сульфата. Фильтр дважды промыть хлороформом по 5 см³. Хлороформ отогнать на водяной бане до 1–2 см³, а остаток сконцентрировать продуванием до полного исчезновения запаха хлороформа.

Сухой остаток растворить в 15 см³ раствора кислоты хлористоводородной 0,02 моль/дм³ при нагревании на водяной бане, прибавить 2 капли спиртового

раствора метилового оранжевого и 1 каплю метиленового синего и избыток кислоты хлористоводородной оттитровать раствором натрия гидроксида 0,02 моль/дм³ до желтого окрашивания.

Содержание алкалоидов в пересчете на гиосциамин X , %, вычислить по формуле (3.1):

$$X = \frac{(15-V) \cdot 0,005780 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100-w)}, \quad (3.1)$$

где 0,005780 – количество алкалоидов в пересчете на гиосциамин, соответствующее 1 см³ раствора кислоты хлористоводородной (0,02 моль/дм³), г;

V – объем раствора натрия гидроксида (0,02 моль/дм³), израсходованного на титрование, см³;

m – масса сырья, которая соответствует отмеренному объему эфирного извлечения, г;

w – влажность сырья, %.

4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение алкалоидов, приведите примеры.
2. В чем отличие истинных алкалоидов от псевдоалкалоидов?
3. На чем основана классификация истинных алкалоидов и псевдоалкалоидов?
4. Какими свойствами обладают алкалоиды? В чем заключается их физиологическое действие?
5. Опишите качественные реакции на алкалоиды.
6. Назовите методы количественного определения алкалоидов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4. ВЫДЕЛЕНИЕ ХРОМОГЕННОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ПЛОДОВОГО ТЕЛА *INONOTUS OBLIQUUS*

1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по получению экстракта березового гриба чаги и определению выхода хромогенного комплекса при экстракции.

2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- получить экстракты из порошка *Inonotus obliquus* (п. 3.1);
- определить массовую долю сухих веществ в экстрактах чаги (п. 3.2);
- определить выход хромогенного комплекса при экстракции чаги (п. 3.3);
- сформулировать рекомендации по применению меланинов при создании БАД к пище, определить направленность БАД.

3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

Материалы и реактивы: измельченный гриб (порошок) *Inonotus obliquus*, 25 %-ный раствор соляной кислоты.

Оборудование, лабораторная посуда: колбы конические, водяная баня, обратный холодильник, бюксы стеклянные, электроплитка, весы лабораторные, лабораторное перемешивающее устройство, сушильный шкаф, воронка Бюхнера, бумага фильтровальная, чашки Петри.

3.1 Получение экстрактов *Inonotus obliquus*

1) Экстракция при кипячении

Навеску 10 г измельчённого сырья в 300 см³ воды выдержать в течение 1 ч при комнатной температуре, затем экстрагируемую смесь поместить на кипящую водяную баню с обратным холодильником и выдержать, поддерживая слабое кипение, в течение 2 ч. Экстракт отделить, отфильтровать, сырьё промыть тёплой водой, экстракт и промывные воды объединить, охладить и довести объём экстракта до 500 см³.

2) Экстракция при механическом перемешивании

Навеску 10 г измельчённого сырья экстрагировать 100 см³ воды в течение 1 ч при 70 °С и постоянном перемешивании, полученный экстракт отделить и отфильтровать.

В результате получается два экстракта чаги.

3.2 Определение массовой доли сухих веществ в экстрактах чаги

Взвесить сухой, предварительно прокаленный стеклянный бюкс. Налить определенный объем экстракта (10 см³), в котором необходимо определить сухой остаток. Бюксы с образцами сушить в сушильном шкафу при 70 °С в течение 30 мин, охладить в эксикаторе и повторно взвесить. Рассчитать количество сухого остатка по формуле (4.1):

$$X = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100, \quad (4.1)$$

где m_1 – масса бюкса, доведенного до постоянной массы, г;

m_2 – масса бюкса с испытуемым образцом до высушивания, г;

m_3 – масса бюкса с испытуемым образцом после высушивания, г.

3.3 Определение выхода хромогенного комплекса при экстракции

100 см³ экстракта подкислить добавлением раствора 25 %-ной хлористоводородной кислоты, перемешать и оставить на 30 мин, осадок отделить на воронке Бюхнера с взвешенным фильтром, полученный осадок перенести в чашку Петри и высушить при комнатной температуре. Выход хромогенного комплекса определить по разнице масс фильтра и фильтра с высушенным хромогенным комплексом

Полученные результаты занести в таблицу 4.1.

Таблица 4.1 – Характеристики экстрактов чаги

Номер экстракта	Массовая доля сухих веществ, %	Масса хромогенного комплекса, г
1		
2		

На основании полученных результатов сделать вывод о наиболее предпочтительном способе экстракции хромогенного комплекса из березового гриба.

4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите свойства и химический состав березового гриба *Inonotus obliquus*.
2. Каким биологическим действием обладает меланин березового гриба *Inonotus obliquus*?
3. Назовите коммерческие препараты на основе БАВ березового гриба *Inonotus obliquus*, представленные на рынке.
4. Опишите методику определения выхода хромогенного комплекса при экстракции березового гриба *Inonotus obliquus*.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5. ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ ИЗ ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE*. ГИДРОЛИЗ НУКЛЕОПРОТЕИДОВ И ПРОВЕДЕНИЕ КАЧЕСТВЕННЫХ РЕАКЦИЙ НА ПРОДУКТЫ ГИДРОЛИЗА

1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по выделению нуклеопротеидов из хлебопекарных дрожжей, проведению гидролиза нуклеопротеидов и качественных реакций на пентозы и пуриновые основания.

2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- выделить нуклеопротеиды из хлебопекарных дрожжей (п. 3.1);
- провести гидролиз выделенных нуклеопротеидов (п. 3.2);
- провести качественные реакции на пентозы (п. 3.3);
- провести качественные реакции на пуриновые основания (п. 3.4);
- сформулировать рекомендации по применению нуклеопротеидов при создании БАД к пище, определить направленность БАД.

3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

Материалы и реактивы: дрожжи хлебопекарные *Saccharomyces cerevisiae* прессованные, 1 %-ный и 30 %-ный растворы гидроксида натрия, ацетат натрия, 70 %-ный раствор этилового спирта, речной песок, тщательно промытый и прокаленный, 5 %-ный раствор серной кислоты, 7 %-ный раствор сернокислой меди, 1 %-ный раствор тимола, концентрированная серная кислота, 1 %-ный раствор нитрата серебра, концентрированный раствор аммиака.

Оборудование, лабораторная посуда: ступка с пестиком, воронка для фильтрования, химические стаканы, стеклянная палочка, обратный холодильник, колбы круглодонные, фильтры бумажные, спиртовка, бумага индикаторная.

Принцип метода. Все нуклеопротеиды можно подвергнуть гидролитическому распаду, при котором происходит последовательный разрыв сначала эфирных, а затем гликозидных связей. Сначала нуклеопротеиды распадаются на простые белки и нуклеиновые кислоты. Затем белки могут подвергнуться гидролизу до пептидов и аминокислот. Нуклеиновые кислоты расщепляются с образованием нуклеотидов, которые затем подвергаются гидролизу с образованием пуриновых и пиримидиновых оснований, рибозы или дезоксирибозы и фосфорной кислоты. При мягком гидролизе происходит сравнительно неглубокий распад белка. Пиримидиновые нуклеотиды при таком гидролизе не распадаются, а пуриновые распадаются с образованием пуриновых оснований (аде-

нин и гуанин), рибозы и фосфорной кислоты. Проводя гидролиз при определенных условиях, можно последовательно выделить различные промежуточные продукты гидролитического распада нуклеопротеидов и определить их с помощью качественных реакций.

3.1 Выделение нуклеопротеидов из хлебопекарных дрожжей

К 6 г пекарских дрожжей добавить 2 см³ воды, немного песка и полученную смесь растереть в ступке с 1 %-ным раствором гидроксида натрия. Раствор щелочи добавлять небольшими порциями (по 2–3 см³), всего расходовать около 25 см³. Массу дрожжей растирать около 15–20 мин до получения гомогенной массы. Содержимое ступки профильтровать через складчатый фильтр и перелить в стакан. Затем в стакан добавить 5 г ацетата натрия и, перемешивая стеклянной палочкой, растворить его. По стенке стакана осторожно наложить 25 см³ 70 %-ного этанола. Медленно круговыми движениями перемешать жидкости. Образуются крупные хлопья нуклеопротеидов, которые постепенно осаждаются на дно стакана. Отделить осадок нуклеопротеидов фильтрацией на бумажном фильтре. Полученные нуклеопротеиды сохранить для следующих экспериментов.

3.2 Гидролиз нуклеопротеидов

Осадок нуклеопротеидов, полученный в предыдущем опыте (п. 3.1), растворить в 25 см³ 5 %-го раствора серной кислоты и перенести в круглодонную колбу. Колбу закрыть пробкой с обратным холодильником. Реакционную смесь нагреть на электрической плитке до кипения и кипятить в течение 1,5 ч.

Смесь охладить и профильтровать через бумажный фильтр. С фильтратом проделать качественные реакции.

3.3 Качественные реакции на пентозы

1) Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу.

К 5 каплям гидролизата, полученного по заданию 3.2, добавить 10 капель 30 %-ного раствора едкого натра и 1–3 капли 7 %-ного раствора сернокислой меди до появления стойкого осадка гидроксида меди. Жидкость перемешать и нагреть до кипения. В результате выпадает красный осадок закиси меди или желтый осадок гидрата окиси меди вследствие окисления рибозы и восстановления гидрата окиси меди в гидрат закиси меди.

2) К 1 см³ фильтрата (задание 3.2) добавить 2–3 капли 1 %-го раствора тимола и по стенке пробирки осторожно наслить 1 см³ концентрированной серной кислоты. Жидкость окрашивается в красный цвет.

3.4 Качественные реакции на пуриновые основания

К 5 каплям 1 %-го раствора нитрата серебра приливать концентрированный раствор аммиака до растворения образовавшегося вначале осадка. В другую пробирку влить 2 см³ фильтрата (задание 3.2) и приливать к нему концентрированный раствор аммиака до щелочной по индикаторной бумаге реакции. Во вторую пробирку влить содержимое первой пробирки. Через несколько минут выпадают хлопья солей пуриновых оснований.

4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите морфологически и физиологические свойства дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Дайте определение нуклеопротеидов.
3. Приведите примеры дезоксирибонуклеопротеидов и рибонуклеопротеидов.
4. На какие компоненты гидролизуются нуклеиновые кислоты?
5. Опишите методику гидролиза нуклеопротеидов.
6. Опишите методику качественного определения пентоз – продуктов гидролиза нуклеопротеидов.
7. Опишите методику качественного определения пуриновых оснований – продуктов гидролиза нуклеопротеидов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ЖИВОТНЫХ ТКАНЯХ ПО ФОСФОРУ

1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по определению суммарного содержания нуклеиновых кислот в животных тканях (куриная печень, печень рыбы) по фосфору.

2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- определить суммарное содержание нуклеиновых кислот в животных тканях по фосфору методом с хлорной кислотой (п. 3.1);
- определить суммарное содержание нуклеиновых кислот в животных тканях по фосфору колориметрическим методом по реакции фосфора с молибдатом аммония в присутствии восстановителя (п. 3.2);
- сформулировать рекомендации по применению нуклеиновых кислот при создании БАД к пище, определить направленность БАД.

3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

Материалы и реактивы: навеска печени курицы, рыбы, 0,2 н. и 0,5 н. растворы хлорной кислоты, 1 н. и 30 %-ный растворы гидроксида натрия, натрий хлористый, 20 %-ный раствор уксусной кислоты, спирт этиловый, 5 %-ный раствор трихлоруксусной кислоты, серная кислота концентрированная, 30 %-ный раствор перекиси водорода, 5 %-ный раствор молибдата аммония, 1 %-ный раствор гидрохинона, карбонат-сульфитная смесь, стандартные растворы KH_2PO_4 , содержащие 1, 2, 3, 4 мкг фосфора в 1 см³.

Оборудование, лабораторная посуда: спектрофотометр, кварцевые кюветы для фотометрирования, центрифуга, центрифужные пробирки 30-50 см³, весы для уравнивания центрифужных пробирок, водяная баня (96 °С), мерная посуда – цилиндры или пробирки на 25-50 см³, пробирки (мерные «пальчики»), стаканы, реторты, микропипетки на 100 и 1000 мм³, наконечники для пипеток, стеклянные палочки, маркер, бинт, фильтровальная бумага, штативы.

3.1 Методика с хлорной кислотой

10 и 500 мг печени (куриной, рыбьей) поместить в центрифужные пробирки. Добавить по 10 см³ 0,2 н. хлорной кислоты. Перемешать стеклянной па-

лочкой. Осадок отделить центрифугированием при 3000 об/мин. в течение 5 мин. Осадок повторно отмыть. К осадкам добавить по 10 см³ 0,5 н. раствора хлорной кислоты, закрыть пробирки ретортой (рисунок 6.2), нагревать в течение 30 мин в кипящей бане. Гидролизат охладить под струей холодной воды и центрифугировать при 3000 об/мин. в течение 5 мин.

Перелить надосадочную жидкость в чистые стеклянные пробирки и измерить поглощение растворов (A_{270} и A_{290}); контроль – 0,5 н. раствор хлорной кислоты.

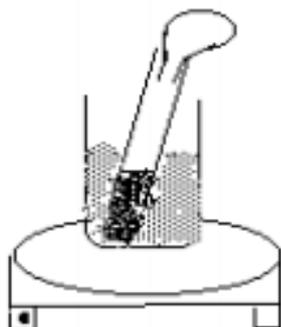


Рисунок 6.2 – Система для гидролиза ДНК нагреванием в кислой среде

Рассчитать концентрацию ДНК и РНК по формуле (6.3):

$$C = \frac{(A_{270} - A_{290}) \cdot k \cdot V}{190}, \quad (6.3)$$

где C – концентрация нуклеиновых кислот в мг/см³;

A – оптическая плотность при соответствующей длине волны;

k – коэффициент пересчета по фосфору нуклеиновой кислоты (для ДНК $k = 10,1$ для РНК $k = 10,5$);

V – объем исследуемой пробы;

190 – коэффициент поглощения 1 мг нуклеинового фосфора (Φ_n) в 1 см³ раствора.

3.2 Колориметрический метод по реакции фосфора с молибдатом аммония в присутствии восстановителя

Навеску ткани печени (куриной, рыбьей) в 100 мг поместить в центрифужную пробирку с 1 см³ 1 н. NaOH и поставить в кипящую водяную баню на 15 мин. Периодически содержимое пробирки перемешивать стеклянной палочкой. В течение этого времени ткань полностью растворяется (получившаяся жидкость представляет собой прозрачный или слегка опалесцирующий раствор).

Пробу охладить при комнатной температуре, а затем при 0°C (лед). К охлажденной пробе добавить 0,5 см³ насыщенного раствора хлорида натрия в

20 %-ной уксусной кислоте, при этом белки выпадают в осадок. Через 3-5 мин после добавления реактива пробу центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин.

Центрифугат слить в центрифужную пробирку, находящуюся во льду, в которую налито 6 см³ этилового спирта; при этом ДНК выпадает в осадок, а РНК и другие фосфорные соединения остаются в спиртовом растворе. Для более полного выделения ДНК осадок белка, полученный после центрифугирования, вновь растворить в 1 см³ 1 н. NaOH (на холоду) и сразу же осадить 0,5 см³ насыщенного раствора хлорида натрия в 20 %-ной уксусной кислоте. Пробу центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин, и полученный центрифугат присоединить к первому (находящемуся в спирте), а осадок отбросить. Содержимое пробирки (спирт + центрифугаты) тщательно перемешать стеклянной палочкой и оставить на холоду в течение 1 ч для полного осаждения ДНК.

Через 1 ч содержимое пробирок центрифугировать 10 мин при 3000 об/мин; центрифугат слить, а осадок ДНК дважды отмыть 5 см³ 5 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты.

Отмытый трихлоруксусной кислотой осадок ДНК количественно перенести в жаростойкую пробирку (колбу), добавить 1,5 см³ концентрированной серной кислоты и, укрепив пробирку слегка наклонно, осторожно нагреть раствор на плитке до тех пор, пока раствор в пробирке приобретет бурую окраску (если органического вещества в пробе мало, то побурения можно не заметить). После этого пробирку охладить, добавить 1 каплю 30 %-ного раствора перекиси водорода и раствор снова нагреть в течение 5-10 мин. Если раствор при этом побуреет, добавить новую порцию перекиси. При добавлении перекиси следить за тем, чтобы она попала не на стенки пробирки. Нагрев при минерализации не должен быть слишком сильным, нельзя допускать, чтобы тяжелые пары серной кислоты и оксида серы выходили из пробирки, так как вместе с ними может частично увлекаться фосфат. Минерализацию проводить в пробирках, прикрытых маленькими воронками, которые вставляют, когда вода почти испарится. Минерализацию проводить до полного просветления жидкости.

Одновременно с анализируемыми пробами минерализацию проводить в контрольной «слепой» пробе, содержащей вместо исследуемого раствора воду. Необходимость контроля обусловлена тем, что используемые при минерализации реактивы могут содержать следы фосфорной, а также кремневой кислот, присутствие которых может завязать результаты при определении общего фосфора.

После окончания минерализации жидкость из пробирки количественно перенести в мерную колбу на 50 см³, осторожно добавляя первые порции воды (происходит сильное разогревание!) и тщательно ополаскивая пробирку водой. Затем довести реакцию среды до нейтральной (по универсальному индикатору)

добавлением 30 %-ного раствора NaOH и довести объем жидкости дистиллированной водой до метки.

Из колбы отобрать 5 см³ жидкости, перенести в градуированную пробирку (мерный цилиндр) на 10 см³, добавить 0,5 см³ 5 %-ного раствора молибдата аммония и 0,5 см³ 1 %-ного раствора гидрохинона. Через 5 мин к содержимому пробирки добавить 2 см³ карбонат-сульфитной смеси и довести водой до 10 см³.

Через 10 мин определить оптическую плотность окрашенного раствора на фотоэлектроколориметре, используя красный светофильтр (625-650 нм). По величине оптической плотности установить количество фосфора в пробе, имея предварительно построенный график зависимости оптической плотности от концентрации фосфора.

Для построения калибровочной кривой использовать стандартные растворы КН₂РO₄, содержащие 1, 2, 3, 4 мкг фосфора в 1 см³. На оси абсцисс откладывают значение концентраций стандартных растворов, а на оси ординат – соответствующие им оптические плотности. Содержание ДНК выразить в миллиграмм-процентах фосфора.

Полученные по пп. 3.1–3.2 результаты внести в таблицу 6.1.

Таблица 6.1 – Результаты определения суммарного содержания нуклеиновых кислот в животных тканях по фосфору

Образец животной ткани	Суммарное содержание нуклеиновых кислот, мг/см ³	
	методика с хлорной кислотой	колориметрический метод по реакции с молибдатом аммония
Печень курицы		
Печень рыбы		

4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Опишите принцип метода определения суммарного содержания нуклеиновых кислот в животных тканях по фосфору.
2. Что такое эффект Тиндаля?
3. Опишите принцип спектрофотометрического метода анализа.
4. В чем заключается закон Бугера-Ламберта-Бера?
5. Опишите методики определения суммарного содержания нуклеиновых кислот в животных тканях по фосфору с использованием хлорной кислоты и по реакции фосфора с молибдатом аммония в присутствии восстановителя.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7. ФОСФОПРОТЕИДЫ И ГЛИКОПРОТЕИДЫ. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА УГЛЕВОДНЫЙ КОМПОНЕНТ В ЯИЧНОМ БЕЛКЕ

1 ЦЕЛЬ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

Сформировать умения и навыки по проведению качественных реакций на белок и фосфат в гидролизате казеина, на углеводы в яичном белке.

2 ЗАДАНИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

- выделить казеин из молока (п. 3.1);
- провести щелочной гидролиз казеина (п. 3.2);
- провести качественные реакции на белок и фосфат в полученном гидролизате (п. 3.3);
- провести качественную реакцию на углеводный компонент в яичном белке (п. 3.4);
- сформулировать рекомендации по применению фосфопротеидов и гликопротеидов при создании БАД к пище, определить направленность БАД.

3 МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЗАДАНИЯ

Материалы и реактивы: молоко коровье, яичный белок, 10 %-ный раствор уксусной кислоты, 10 %-ный раствор едкого натра, 1 %-ный раствор сернокислой меди, 10 %-ный раствор азотной кислоты, фенолфталеин, молибденовый реактив (готовится путем растворения 30 г молибденовокислого аммония в 200 см³ соляной кислоты (1: 1) и 400 см³ дистиллированной воды), концентрированная серная кислота, 1 %-ный раствор тимола, концентрированная уксусная кислота.

Оборудование, лабораторная посуда: пробирки стеклянные, воронки стеклянные, фильтры бумажные, стеклянные палочки, спиртовка, обратный холодильник, электроплитка.

3.1 Гидролиз фосфопротеидов казеина

К 2 см³ молока добавить 2 см³ дистиллированной воды и 2 капли 10 %-ной уксусной кислоты. Образуется осадок казеина, который отфильтровать. Фильтрат отбросить, а осадок казеина осторожно снять с фильтра стеклянной палочкой и поместить в чистые пробирки.

3.2 Гидролиз казеина

В пробирку поместить выделенный из молока казеин и прилить 2 см³ 10 %-ного раствора едкого натра. Кипятить 10–15 мин на асбестовой сетке с обратным холодильником, затем охладить пробирку и провести реакцию на продукты гидролиза.

3.3 Обнаружение белка и фосфата в казеиновом гидролизате

Белок обнаруживают биуретовой реакцией. В пробирку к трем каплям гидролизата добавить одну каплю 1 %-ного раствора серноокислой меди. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

Обнаружение фосфата. Оставшийся гидролизат подкислить несколькими каплями 10 %-ного раствора азотной кислоты в присутствии 1–2 капель фенолфталеина (до обесцвечивания) и отфильтровать в сухую пробирку. К 5 каплям фильтрата прилить 20 капель молибденового реактива и кипятить несколько минут. Жидкость окрашивается в желтый цвет, а затем при охлаждении выпадает желтый осадок фосфорно-молибденового аммония, указывающий на присутствие фосфата в гидролизате:



3.4 Открытие углеводного компонента в яичном белке

Принцип метода: При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз – оксиметилфурфурол. Они дают с тимолом или α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты продукты конденсации красного цвета.

К 10 каплям профильтрованного яичного белка добавить 2–3 капли 1 %-ного раствора тимола, перемешать и по стенке пробирки осторожно наслоить 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфуrolа с тимолом.

4 КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Дайте определение фосфопротеидов, приведите примеры.
2. Дайте определение гликопротеидов, приведите примеры.

3. Опишите методику гидролиза фосфопротеидов казеина и обнаружения белка и фосфата в полученном гидролизате.
4. Опишите методику обнаружения углеводного компонента в курином белке.

Приложение ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ (СПРАВОЧНЫЙ) МАТЕРИАЛ

Теоретический материал к лабораторной работе №1

Свободные радикалы – это частицы, которые содержат в своем строении один или несколько неспаренных электронов на внешней оболочке (рисунок П.1). Свободные радикалы образуются в процессе дыхания человека. Они необходимы в небольшом количестве для нормального функционирования мозга и памяти. Однако существует проблема, которая заключается в том, что свободных радикалов в организме человека образуется слишком много. Вследствие этого они начинают оказывать неблагоприятное влияние и ускорять процессы старения (рисунок П.1).

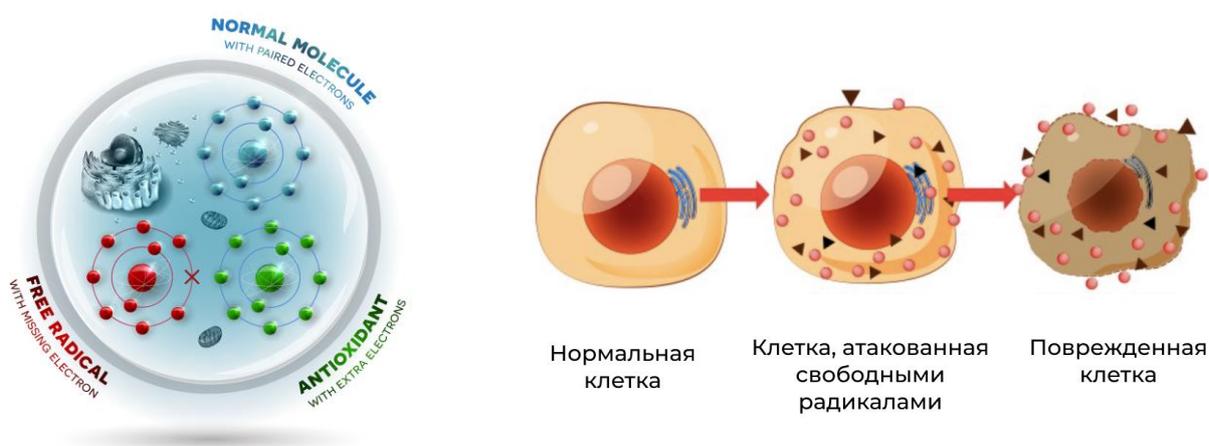


Рисунок П.1 – Свободнорадикальная теория старения

В реакции биологического окисления присутствует основной элемент, им является кислород. Активные формы кислорода (АФК) – это формы, которые образуются в ходе многочисленных химических реакций, которые проходит молекула кислорода. Высокая реакционная способность является очень важной для активных форм, ведь именно благодаря ей активные формы кислорода могут повреждать многие биологические структуры, например, белки или нуклеиновые кислоты. Было выявлено, что примерно за 70 лет в организме человека образуется около 1 т свободных радикалов кислорода. Однако активные формы принимают участие во многих процессах, связанных с регуляцией. Именно поэтому в живых системах природой предусмотрено некое равновесие между положительными и отрицательными свойствами окисления, в котором принимают участие свободные радикалы кислорода. Противоположностью окислителей являются антиоксиданты, но если нарушить равновесие между ними и допустить

увеличение концентрации оксидантов, то произойдет окислительный (оксидативный) стресс [1].

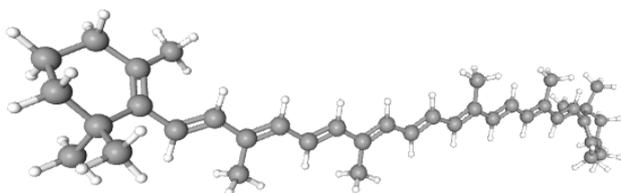
Основными компонентами антиоксидантной системы человека являются ферменты антиоксидантной защиты (АОЗ): супероксиддисмутаза (SOD), глутатионпероксидаза (GPX), каталаза (CAT) и параоксоназа (PON). При этом активность ферментов эволюционно и генетически запрограммирована для оптимизации баланса окислительных процессов и активности систем антиокислительной защиты.

Уже доказано, что антиоксидантный стресс провоцирует развитие многих серьезных заболеваний, таких как атеросклероз, сахарный диабет, артриты, болезни Паркинсона и Альцгеймера, хронический панкреатит, онкологические и сердечно-сосудистые заболевания.

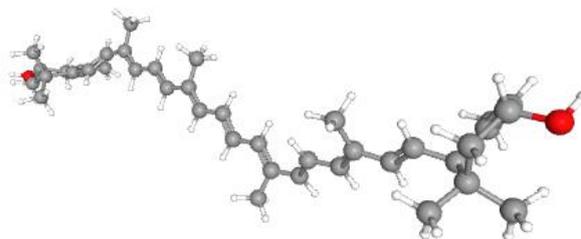
В случае если произошел окислительный стресс, естественная антиоксидантная система человека не в состоянии справиться самостоятельно. Именно поэтому употреблять продукты в пищу, которые богаты антиоксидантами, очень важно и полезно для здоровья.

Антиоксиданты – это вещества, ингибирующие свободнорадикальное окисление. Их также называют антиокислителями или консервантами. Другими словами, антиоксиданты – это вещества химической природы, которые содержатся в продуктах и поступают в организм человека с пищей, и обладают способностью нейтрализовать действие свободных радикалов. Наибольшее количество антиоксидантов содержится в растениях, к ним относятся пигменты: каротиноиды, хлорофиллы, антоцианы [2].

Каротиноиды – природные пигменты, которые придают фруктам и овощам желтый или оранжевый цвет и являются мощными природными антиоксидантами. Кроме того, каротиноиды являются предшественниками витамина А, который синтезируется непосредственно в организме человека. В настоящее время известно более 50 видов каротиноидов (рисунок П.2), но наиболее эффективным является β -каротин [3, 4].

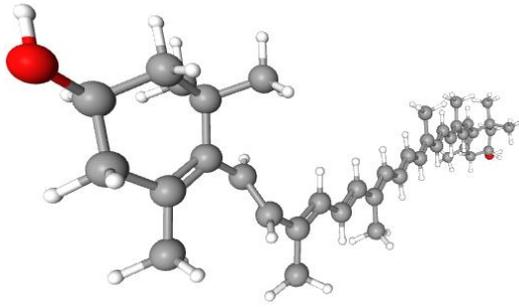


β -каротин

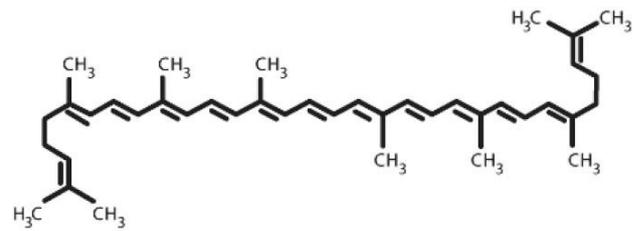


ЛЮТЕИН

Рисунок П.2. Окончание



зеаксантин



ЛИКОПИН



виолаксантин

Рисунок П.2 – Каротиноиды

β -каротин придает желтую или желто-оранжевую окраску цветам и плодам, а также осенним листьям. Растения и бактерии используют β -каротин, чтобы улавливать солнечный свет, но также он защищает сами растения от ультрафиолетового излучения солнца.

Растительная пища выступает основным источником β -каротина для человека. Примерно 30 % β -каротина усваивается в пищеварительном тракте. Вместе с этим около 50-60 % усвоенного β -каротина переходит в производные витамина А. Этот процесс происходит в тонком кишечнике. Кроме преобразования в витамин А, β -каротин участвует в таких важных функциях организма, как антиоксидантная и светозащитная.

β -каротин обладает очень полезной способностью к подавлению роста и образования злокачественных опухолей. Он способен рассасывать их, а также предупреждает образование новых метастазов. Эта способность объясняется тем, что β -каротин стимулирует иммунную систему. Под действием β -каротина образуются специальные клетки, которые распознают и уничтожают злокачественные клетки. Среднее содержание данного антиоксиданта в организме человека составляет примерно 100-200 мг. Как правило, он содержится в жировой ткани, в печени, плазме и в незначительном количестве в других органах.

Учеными был доказан факт, что даже при соблюдении полноценного рациона в организм человека поступает всего 1,0-1,5 мг β -каротина, хотя его суточная норма находится в пределах от 5 до 6 мг в сутки. Именно поэтому рекомендуется употреблять в пищу больше растительных продуктов, которые содержат в своем составе β -каротин [5, 6].

Ликопин – кристаллическое соединение, которое не обладает способностью к растворению в воде – пигмент красного цвета, который является мощным антиоксидантом и обладает антиканцерогенными свойствами. По своим антиоксидантным свойствам ликопин способен превосходить витамины С и Е. Ликопин является нециклическим изомером β -каротина. Кроме антиоксидантных свойств, полезных для человека, он способен защищать части растения от солнечного света и окислительного воздействия. В составе клеток растений ликопин является предшественником всех каротиноидов (β -каротин не исключение). Прочность молекулы ликопина настолько высока, что даже воздействие высоких температур не оказывает разрушительного воздействия на нее. Далее он переваривается и поглощается в желудочно-кишечном тракте. Ликопин оказывает множество положительных воздействий на организм человека, среди которых: снижение влияния свободных радикалов, замедление процессов старения кожи, предотвращение появления пигментных пятен, снижение риска заболеваний, связанных с сердечно-сосудистой системой и онкологией. Ликопин содержится в ярких красных овощах и фруктах. Наиболее богатым ликопином сырьём являются томаты. Суточная норма ликопина находится в пределах от 10 до 15 мг [7].

Хлорофилл – еще один природный антиоксидант, который содержится в зеленых частях растения, является красящим пигментом и участвует в процессе фотосинтеза. Он принимает участие в формировании иммунитета, регуляции артериального давления, очищении крови, также участвует в образовании соединительной ткани, обладает антибактериальным и противовоспалительным эффектом [8].

Существует несколько видов хлорофилла:

- хлорофилл *a* имеет желто-зеленую окраску и присутствует во всех растениях, он является основным пигментом, участвующем в фотосинтезе;
- хлорофилл *b* имеет сине-зеленое окрашивание и содержится в высших растениях и зеленых водорослях, является вспомогательным пигментом при фотосинтезе (пигментом – коллектором);
- хлорофилл *c* имеет зеленую окраску и содержится в бурых и одноклеточных водорослях;
- хлорофилл *d* содержится в красных водорослях.

Хлорофилл не обладает способностью к растворению в воде, однако хорошо растворяется в органических растворителях (спирт или эфир).

Хлорофиллы и каротиноиды имеют характерные максимумы поглощения. Так, максимум поглощения хлорофилла *a* приходится на 662 нм, хлорофилла *b* – на 644 нм, а каротиноидов – на 440,5 нм (рисунок П.3).

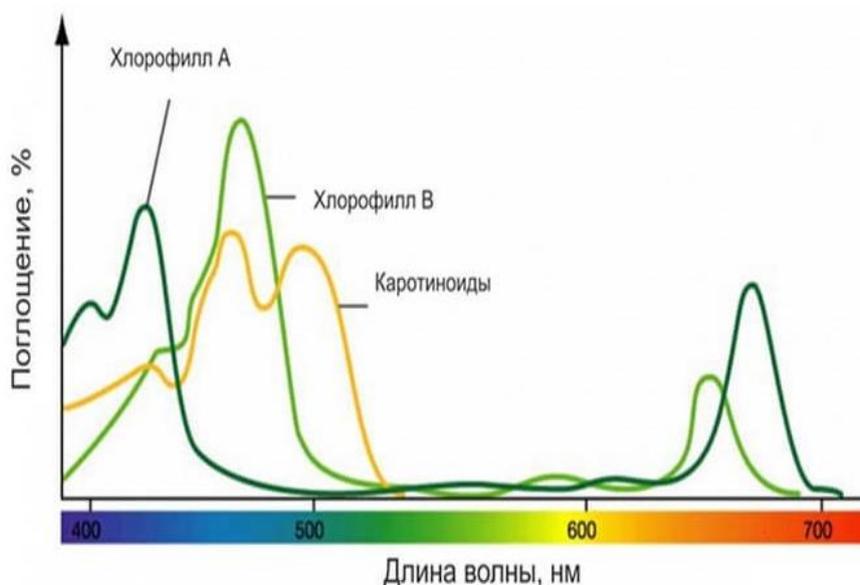


Рисунок П.3 – Спектры поглощения фотосинтетических пигментов

Антоцианы – природные антиоксиданты, которые также являются пигментами, они способны придавать цвет от темно-красного до синего. Антоцианы, как правило, синтезируются из агликонов и антоцианидов, к которым относятся: пеларгонидин, цианидин и дельфинидин. Именно такое многообразие и обуславливает различное окрашивание. Молекула антоциана включает в свой состав агликон и сахарные остатки (рисунок П.4). Такой тип строения молекулы относят к гликозидному. Антоцианы оказывают различное положительное воздействие на организм человека. Однако не все их свойства изучены полностью. Антоцианы, выделенные из растительного сырья, увеличивают ценность продукта, который был окрашен ими [9, 10].

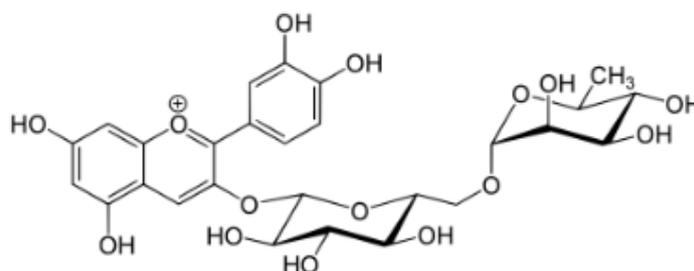


Рисунок П.4 – Структура керацианина – рутинозил-3-цианидина, антоциана, содержащегося в костянках вишен (*Cerasus*)

Они придают ему более насыщенный вкус и аромат. В настоящее время многие пищевые продукты подвергаются окрашиванию, но окрашивание происходит с помощью синтетических красителей. Уже доказано негативное влияние искусственных красителей на организм человека. Однако существует решение

данной проблемы. Для окрашивания пищевых продуктов есть натуральный краситель на основе антоцианов (E163). В настоящее время ведутся разработки по извлечению антоцианов не только из плодов и ягод, но и из коры деревьев, таких как береза, лиственница или пихта. В коре этих деревьев антоцианы находятся в бесцветном состоянии, однако, если подобрать правильные условия, то они способны приобрести множество различных окрасок (рисунок П.5).

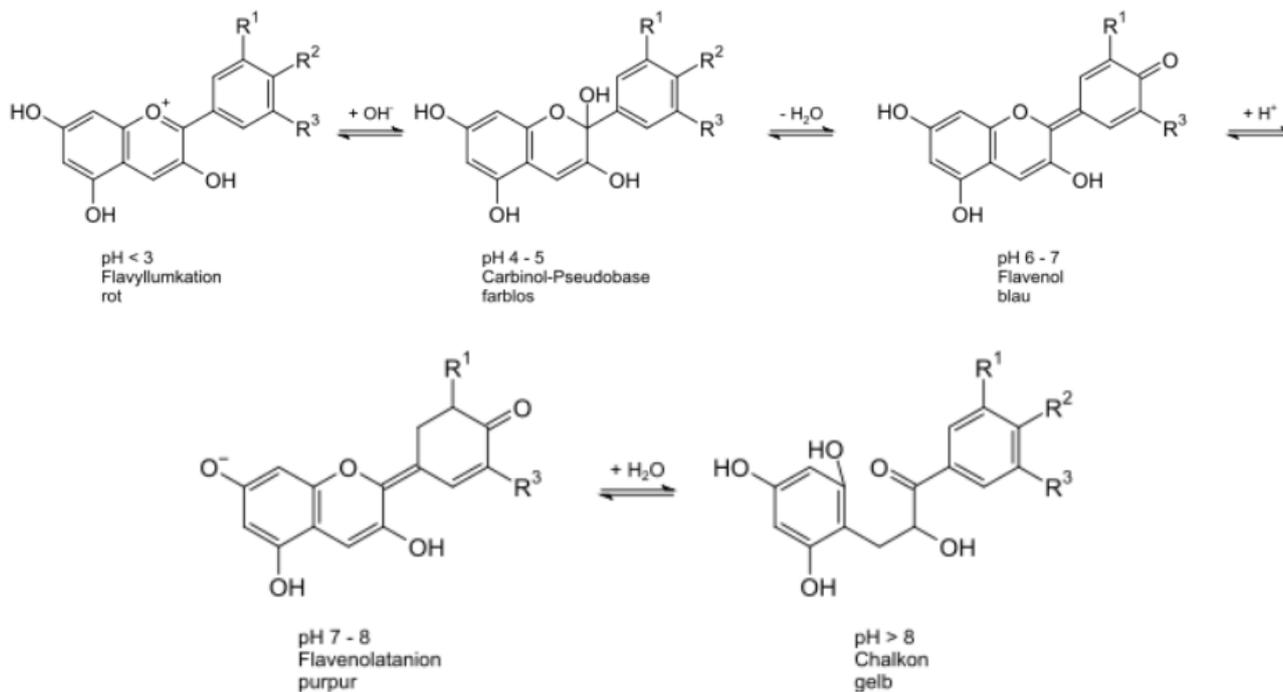


Рисунок П.5 – Зависимость структуры и цвета антоцианов от рН среды:

1 – красная пирилиевая соль; 2 – бесцветное псевдооснование; 3 – синяя хиноидная форма; 4 – пурпурный фенолят хиноидной формы; 5 – жёлтый халкон

Основными источниками антоцианов являются черноплодная рябина, свекла, черная смородина, калина и др. Антоцианы снижают риск возникновения онкологических заболеваний, благоприятно влияют на функции центральной нервной системы, а также обладают бактерицидным действием. Кроме всего, они снижают последствия сахарного диабета или используются для его профилактики.

Теоретический материал к лабораторной работе №2

Органические кислоты – это продукты неполного окисления углеводов – образуются, главным образом, в процессе дыхания (цикл Кребса, глиоксилатный цикл, рисунок П.6), являются предшественниками аминокислот и жиров. Они обуславливают буферные свойства клеточного сока, участвуют в переносе ионов, могут использоваться как источники энергии [11].



Рисунок П.6 – Схема цикла Кребса

Растения отличаются высоким содержанием органических кислот, они имеются во всех органах и тканях. В плодах особенно много органических кислот в свободной форме. В листьях содержатся нейтральные и кислые соли органических кислот. Свободные кислоты имеются в листьях щавеля, ревеня, суккулентов. Растения разных видов существенно отличаются по составу и количеству органических кислот, содержание которых варьирует от долей процента до 40 % на сухую массу. Наиболее часто встречаются яблочная, лимонная и щавелевая кислоты (рисунок П.7).



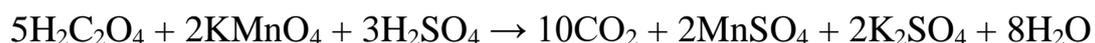
Рисунок П.7 – Формулы органических кислот

Содержание органических кислот изменяется с ростом и развитием растения и зависит от минерального питания, температуры, времени суток, степени зрелости плодов. Определение количества и состава органических кислот имеет большое практическое значение для селекционных исследований и совершенствования способов выращивания сельскохозяйственных культур.

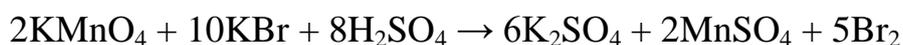
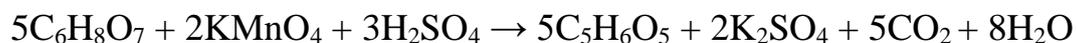
Выделение органических кислот из растительного материала. Органические кислоты можно экстрагировать водой и эфиром из свежих, замороженных и высушенных тканей. Экстракция эфиром длительна, требует предварительного подкисления материала минеральной кислотой для перевода органических кислот из солей в свободное состояние. Достоинством метода является то, что в эфирный экстракт не переходят сахара и минеральные кислоты. Однако некоторые органические кислоты с трудом растворяются в эфире, и их количество оказывается несколько заниженным. Для определения органических кислот растительный материал фиксируют в сушильном шкафу при 120 °С в течение 15-20 мин и затем досушивают при 60-70 °С до постоянного веса. Высушивание при комнатной температуре ведет к потере органических кислот при дыхании [12].

Количественное определение органических кислот. Содержание кислот определяют титрованием щелочью. Фракцию органических кислот выделяют, получая бариевые соли и осаждая их 60 %-ным этиловым спиртом. В свободное состояние кислоты переводят с помощью катионообменной смолы.

Принцип метода количественного определения щавелевой кислоты в растительном материале заключается в следующем. Щавелевую кислоту осаждают хлористым кальцием. Осадок оксалата кальция растворяют серной кислотой и перешедшую в раствор щавелевую кислоту титруют перманганатом калия:

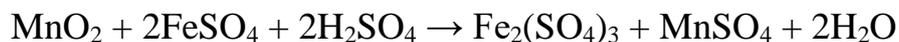


Принцип метода количественного определения лимонной кислоты в растительном материале заключается в следующем. Лимонную кислоту извлекают разбавленной серной кислотой и окисляют перманганатом калия в присутствии бромистого калия до образования пентабромацетона, который определяют весовым методом, извлекают хлороформом и затем разлагают сульфитом натрия. Выделившийся бромид определяют аргентометрическим способом. Перманганат окисляет лимонную кислоту до ацетондикарбоновой кислоты, а бромид – до свободного брома. Продукты реакции взаимодействуют с образованием пентабромацетона:

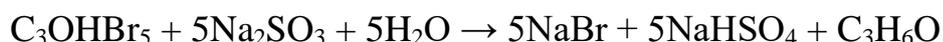




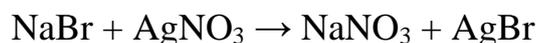
Избыток перманганата реагирует с бромидом с образованием бурого осадка диоксида марганца, который растворяется с помощью закисного железа:



Пентабромацетон разлагается при нагревании с сульфитом натрия:



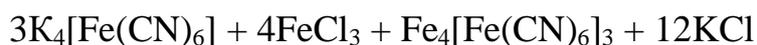
Бромид взаимодействует с азотнокислым серебром:



Принцип метода количественного определения аскорбиновой кислоты в растительном материале заключается в следующем. Аскорбиновая кислота восстанавливает феррицианид калия до ферроцианида:



Ферроцианид калия в присутствии ионов трехвалентного железа образует ферроцианид железа (берлинскую лазурь):



В растворе, содержащем ионы железа, берлинская лазурь не выпадает в осадок. Определяют оптическую плотность раствора [12].

Теоретический материал к лабораторной работе №3

Алкалоиды – это группа азотсодержащих органических соединений природного происхождения (чаще всего растительного), преимущественно гетероциклических, большинство из которых обладает свойствами слабого основания. Помимо углерода, водорода и азота в молекулы алкалоидов могут входить атомы серы, реже – хлора, брома или фосфора. Алкалоиды в растениях образуются из аминокислот (истинные и протоалкалоиды) или из кислоты мевалоновой по типу синтеза изопреноидов (псевдоалкалоиды). Многие алкалоиды в малых дозах оказывают лечебное действие, а в больших – ядовиты [11].

Название «алкалоиды» (нем. Alkaloide) введено в 1819 году немецким аптекарем Карлом Мейсснером и образовано от позднелат. *alkali* – «щёлочь» (который, в свою очередь, происходит от арабского *al qalja* – «пепел растений») и др.-греч. εἶδος – «похожий», «вид». В широкое употребление термин вошёл только после публикации обзорной статьи О. Якобсена в химическом словаре Альберта Ладенбурга.

Классификация алкалоидов. Протоалкалоиды содержат азот за пределами циклической части молекулы. В основу классификации истинных алкалоидов положена структура гетероцикла (рисунок П.8). Согласно данной классификации алкалоиды делятся на пирролидиновые, пирролизидиновые, тропановые, индольные, имидазольные, пуриновые, пиперидиновые, пиридиновые, хинолиновые, изохинолиновые, хинолизидиновые, акридиновые. Представители пирролидиновых алкалоидов – гигрин, гигролин, кускгигрин, стахидрин; пирролизидиновых алкалоидов – ретронецин, гелиотридин, лабурнин, индицин, линделофин, сарацин; тропановых алкалоидов – атропин, скополамин, гиосциамин, кокаин; индольных – серотонин, псилоцибин, диметилтриптамин (ДМТ), буфотенин, эзерамин, физовенин, эптастигмин; имидазольных – гистамин, пилокарпин, долихотелин, пилосин, стивенсин; пуриновых – кофеин, теобромин, теофиллин, сакситоксин; пиперидиновых – седамин, лобелин, анаферин, пиперин; пиридиновых – никотин, норникотин, анабазин, анатабин; хинолиновых – куспарин, эхинопсин, эвокарпин; изохинолиновых – папаверин, лауданозин, сендаверин, морфин, кодеин, тебаин, синоменин; хинолизидиновых – люпинин, нуфаридин, матрин, оксиматрин, алломатридин, софоранол; акридиновых – рутакридон, акроницин, эвоксантин [13].

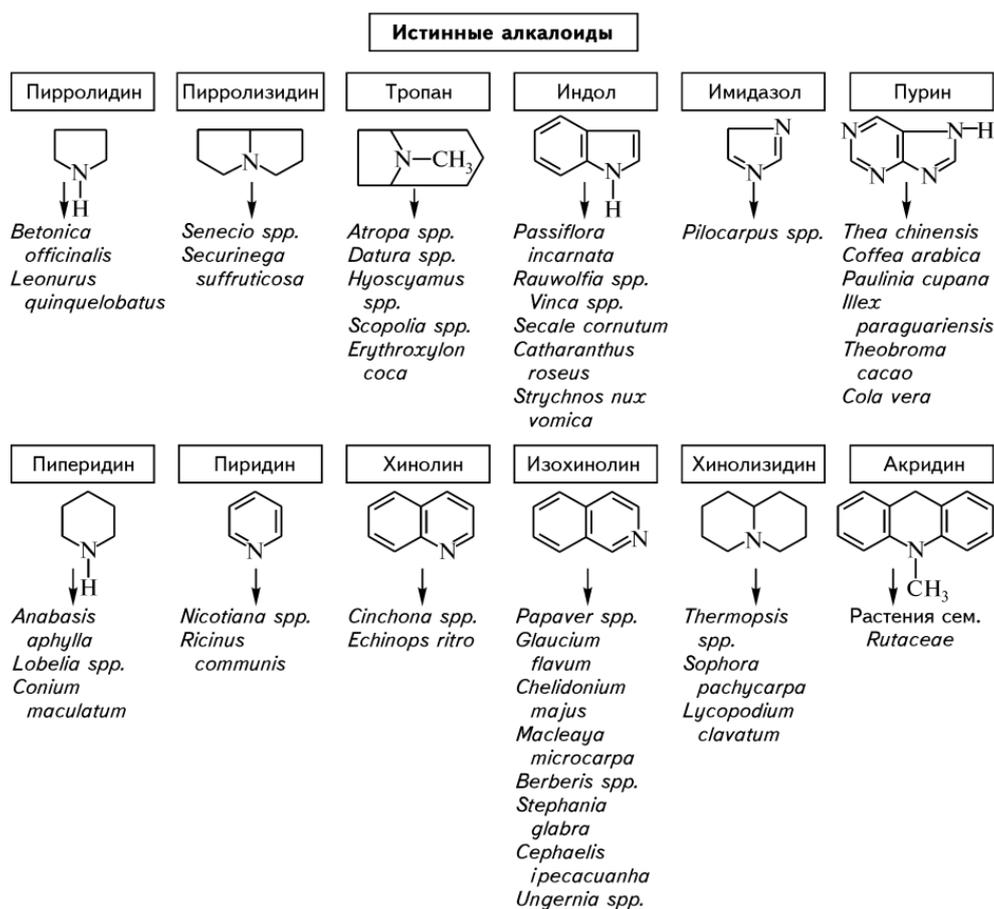


Рисунок П.8 – Схема классификации истинных алкалоидов

Псевдоалкалоиды классифицируют по принципу изопреноидов (рисунок П.9).

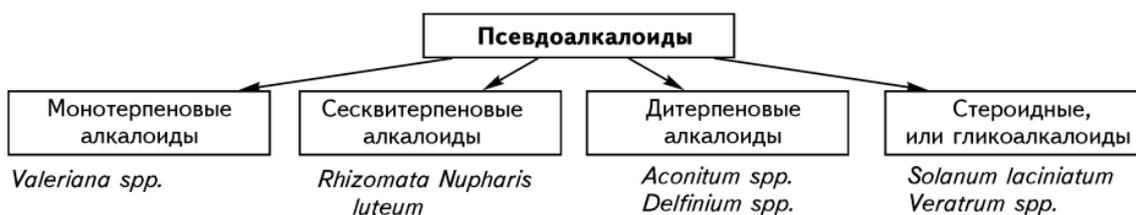
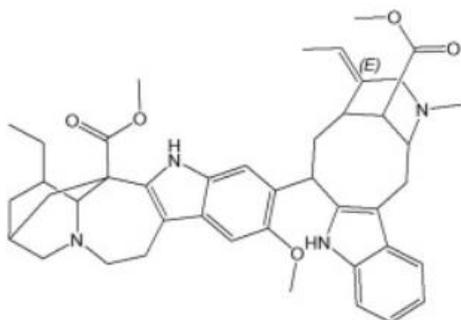


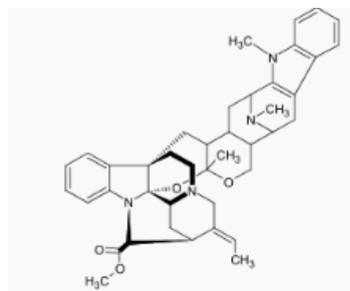
Рисунок П.9 – Схема классификации псевдоалкалоидов

Помимо описанных мономерных алкалоидов, существует также некоторое количество димерных (реже – тримерных, значительно реже – тетрамерных) алкалоидов, образующихся в процессе конденсации двух (трёх, четырёх) мономерных алкалоидов. Как правило, димерные алкалоиды являются результатом конденсации двух алкалоидов одинакового типа. Наиболее распространены бисиндольные алкалоиды и димерные изохинолиновые алкалоиды (рисунок П.10). Основные механизмы димеризации алкалоидов:

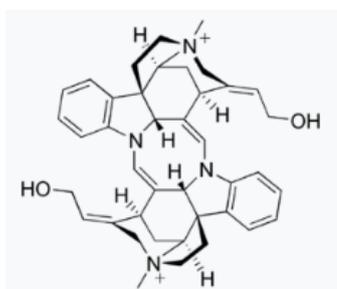
- реакция Манниха; примером является бисиндольный алкалоид воакамин;
- реакция Михаэля – виллальстонин;
- конденсация альдегидов с аминами – токсиферин;
- окислительное сочетание фенолов – даурицин, тубокуарин;
- лактонизация – карпаин.



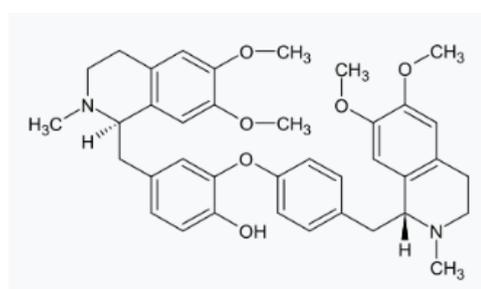
воакамин



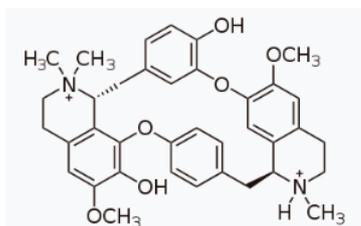
ВИЛЛАЛЬСТОНИН



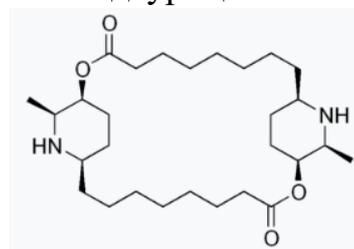
токсиферин



даурицин



тубокуарин



карпаин

Рисунок П.10 – Димерные алкалоиды

Свойства алкалоидов. Алкалоиды проявляют свойства аминов, поэтому существуют в двух формах: в форме солей и в форме оснований. Встречаются первичные амины (мескалин), вторичные амины (эфедрин), третичные амины (атропин) и производные четвертичных аммониевых оснований. Группа третичных аминов наиболее многочисленна. Алкалоиды, как правило, одноосновные соединения. В растениях находятся в виде солей органических или минеральных кислот: лимонной, щавелевой, янтарной, уксусной, серной, фосфорной и др. Лекарственные препараты создаются на основе хлоридов, сульфатов, нитратов, фосфатов, иногда тартратов или салицилатов алкалоидов [13].

Алкалоиды-основания растворимы в органических растворителях (спирте, хлороформе, эфире, бензоле и т. д.) и, как правило, не растворимы или мало растворимы в воде. Однако есть алкалоиды, растворимые в воде, например кофеин, эфедрин, кодеин.

Соли алкалоидов растворимы в воде, практически не растворимы или мало растворимы в органических растворителях (кроме спирта). Некоторые соли алкалоидов (например, папаверина гидрохлорид) растворимы в хлороформе. Алкалоиды образуют соли с кислотами подобно сочетанию аммиака с кислотой хлористоводородной в аммониевых солях. Раствор аммиака, карбонаты и магния оксид разлагают соли алкалоидов до свободных оснований, щелочи могут вызвать деструкцию соединений. Алкалоиды, которые содержат фенольный гидроксил, образуют со щелочами феноляты и вступают в реакцию с солями железа (III). Морфин выпадает в осадок под действием щелочей, а потом растворяется в их избытке, что дает возможность определить его среди других алкалоидов. Сложные эфиры (атропин, кокаин) омыляются щелочами.

Извлечение алкалоидов из растительного сырья. Алкалоиды могут содержаться в лекарственном растительном сырье от сотых долей процента до 10–15 %. Они находятся, как правило, группами до 20 и более алкалоидов, многие из которых сходны по химическому составу. Из растительного сырья алкалоиды могут быть извлечены в виде свободных оснований и в виде солей. Для выделения алкалоидов в виде солей растительное сырье обрабатывают водой или спиртом с добавлением 1–2 % кислоты (хлористоводородной, серной, винной, уксусной или др.). Для очистки от балластных гидрофильных веществ извлечение подщелачивают и образовавшиеся основания алкалоидов экстрагируют несмешивающимся с водой органическим растворителем (хлороформом, дихлорэтаном, бензолом и др.). Операцию очистки повторяют несколько раз. Органический растворитель отгоняют, остаток, содержащий сумму алкалоидов, при необходимости разделяют на отдельные соединения с помощью хроматографии.

Для выделения алкалоидов в виде оснований растительный материал обрабатывают раствором аммиака или натрия гидрокарбоната. Образовавшиеся основания алкалоидов экстрагируют органическим растворителем, в который переходят некоторые липофильные примеси. Далее очистку проводят переводом алкалоидов в соли, а затем снова в основания. Можно выделить алкалоиды и с помощью хроматографической адсорбции на таких сорбентах, как ионообменные смолы, уголь, природные глины и др. Используют как молекулярную, так и ионообменную адсорбцию. В первом случае происходит переход молекул растворенного вещества из подвижной фазы в неподвижную (твердую). Адсорбция осуществляется на поверхности твердого сорбента без химической реакции. Десорбцию (элюирование) проводят подходящим растворителем. Во втором случае происходит обмен

ионов растворенного вещества с ионами сорбента. Хроматографическая адсорбция широко используется в промышленности [13].

Качественные реакции на алкалоиды. Для обнаружения алкалоидов в растительных экстрактах используют общие (осадочные) реакции. Для идентификации проводят специфические (цветные) реакции, микрокристаллоскопические реакции и хроматографический анализ.

Общие реакции на алкалоиды, или реакции осаждения, позволяют предварительно установить наличие алкалоидов даже при незначительном их содержании. Алкалоиды осаждаются солями тяжелых металлов, комплексными йодидами, комплексными кислотами, дубильными веществами и некоторыми органическими соединениями кислотного характера. Однако следует учитывать, что с общими осадочными реактивами образуют осадки некоторые другие органические соединения, находящиеся в неочищенных извлечениях (холине, бетаине, протеине, белках, продуктах их разложения и др.). Поэтому для получения достоверных результатов реакции лучше проводить с очищенными экстрактами. Вследствие различной чувствительности алкалоидов к общеосадочным реактивам реакции обычно проводят с 5–7 различными реактивами. Наиболее часто используют реактивы Майера (раствор ртути дихлорида и калия йодида), Вагнера и Бушарда (растворы йода в растворе калия йодида), Драгендорфа (раствор висмута основного нитрат и калия йодида с добавлением кислоты уксусной), Марме (раствор кадмия йодида в растворе калия йодида), растворы кремневольфрамовой, фосфорно-молибденовой, фосфорновольфрамовой, пикриновой кислот, танина и др. (таблица П.1).

Специфические реакции на алкалоиды используют для установления присутствия определенного алкалоида или группы алкалоидов в растительном сырье. Их проводят с индивидуальными алкалоидами или с очищенной суммой алкалоидов. В качестве специфических реакций часто используют концентрированную серную или азотную кислоту, а также концентрированную серную кислоту, содержащую формальдегид (реактив Марки) или аммония молибдат (реактив Фреде) и др. Микрокристаллоскопические реакции проводят в основном в токсикологической химии. Изучают под микроскопом форму кристаллов после проведения реакций с пикриновой и пикроловой кислотами, с роданидными и йодидными комплексами металлов [13].

Количественное определение алкалоидов. Для каждого сырья разрабатывают индивидуальную методику определения содержания алкалоидов, которое включает стадии выделения, очистки и собственно количественное определение. Различают следующие методы собственно количественного определения:

– кислотно-основного титрования в неводных средах для всех форм алкалоидов (солей и оснований пахикарпина, тропановых алкалоидов, кокаина, платифиллина, сальсолина, морфина, резерпина, сферофизина, эфедрина и пр.);

– нейтрализации: а) прямое титрование алкалоидов-оснований раствором кислоты; б) обратное титрование избытка кислоты раствором щелочи; в) титрование солей алкалоидов в водно-спиртовой среде щелочью в присутствии фенолфталеина с добавлением или без добавления органического растворителя; г) прямое титрование алкалоидов раствором йода или другого комплексообразующего реактива, при взаимодействии с которым алкалоиды образуют нерастворимые соединения (кофеин, теобромин, теofilлин количественно можно определить по образованию нерастворимых солей, например полийодидов или нитратов);

– гравиметрии;

– методы, основанные на индивидуальных химических свойствах алкалоидов;

– физико-химические (фотометрия, полярография, полярометрия, спектрофотометрия, фотонейфелометрия и др.) [13].

Биологическое действие и применение алкалоидов. Значение алкалоидов для живых организмов, их синтезирующих, до сих пор изучено недостаточно. Первоначально предполагалось, что алкалоиды являются конечными продуктами метаболизма азота у растений, как мочевины у млекопитающих. Позднее было показано, что во многих растениях содержание алкалоидов может как увеличиваться, так и уменьшаться с течением времени; таким образом, эта гипотеза была опровергнута.

Большинство известных функций алкалоидов относятся к защите растений от внешних воздействий. Так, например, апорфиновый алкалоид лириоденин, вырабатываемый лириодендром тюльпановым, защищает растение от паразитических грибов. Кроме того, содержание алкалоидов в растении препятствует их поеданию насекомыми и растительноядными хордовыми, хотя животные, в свою очередь, выработали способы противодействия токсичному действию алкалоидов; некоторые из них даже используют алкалоиды в собственном метаболизме.

Алкалоиды имеют и эндогенное значение. Такие вещества, как серотонин, дофамин и гистамин, иногда также относимые к алкалоидам, являются важными нейромедиаторами у животных. Известна также роль алкалоидов в регулировке роста растений.

Алкалоиды находят применение в медицине благодаря наличию у них антиаритмических, противоопухолевых, сосудорасширяющих, антигипертензивных, противомаларийных, психостимулирующих свойств [14].

Таблица П.1 – Окраска продуктов взаимодействия алкалоидов с осадительными реактивами

Алкалоид	Реактив							
	Вагнера-Бушарда $K[I_3]$	Майера $K[HgI_4]$	Драгендорфа $K[BiI_4]$	Шейблера $H_3PO_4 \cdot 12WO_3 \cdot 2H_2O$	Бертрана $SiO_2 \cdot 12WO_3 \cdot 2H_2O$	Зонненштейна $H_3PO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot 2H_2O$	Кислота пикриновая	Раствор танина
Пахикарпина гидройодид	бурая	белая	бурая	желтоватая	желтоватая	желтоватая	желтая	белая
Атропина сульфат	бурая	белая	оранжевая	белая	белая	желтоватая	желтая	белая
Хинина гидрохлорид	красно-бурая	белая	темно-оранжевая	белая	белая	желтоватая	желтая	белая
Папаверина гидрохлорид	красно-бурая	белая	оранжевая	желтоватая	желтоватая	желтоватая	желтая	белая
Морфина гидрохлорид	бурая	желтоватая	красно-оранжевая	белая	белая	желтоватая	желтая	белая
Кодеин	бурая	белая	красно-оранжевая	белая	белая	желтоватая	желтая	белая
Кофеин	бурая	реакция отрицательная	оранжевая, переходящая в бурую	белая	белая (через 3-5 мин)	желтоватая	желтая	белая
Платифилина гидротартрат	бурая	реакция отрицательная	оранжевая, переходящая в бурую	белая	белая (через 3-5 мин)	желтоватая	желтая	белая

Теоретический материал к лабораторной работе №4

В настоящее время высшие грибы являются перспективным природным объектом для разработки на их основе лекарственных препаратов и БАД к пище. Актуальность исследования высших грибов обусловлена содержанием в них разнообразных биологически активных веществ, продуцируемых и накапливаемых ими в процессе жизнедеятельности.

Базидиальный гриб *Inonotus obliquus* (трутовик скошенный) принадлежит к семейству *Hymenochaetaceae* и классу *Agaricomycetes*, отдел *Basidiomycota*. Стерильная (бесплодная) форма гриба (склероций) имеет название чага, или берёзовый гриб. *Inonotus obliquus* представляет собой продукт бесплодной стадии жизнедеятельности дереворазрушающего гриба, паразитирующего на стволах деревьев, главным образом, березы. Гриб представляет собой твердые крупные 0,1-4,0 м в длину и 10-50 см в ширину наросты овальной или круглой формы темно-коричневого, почти черного цвета, около древесины немного светлее (рисунок П.11) [15].



Рисунок П.11 – Берёзовый гриб *Inonotus obliquus*

Когда дерево начинает погибать, вокруг нароста и даже на противоположной стороне ствола появляется собственно спороносное плодовое тело гриба, состоящее из трубочек. Оно развивается под корой, причём гифы распространяются на 0,5-1 м по длине ствола. По мере созревания спор образуются гребневидные выросты – так называемые «упорные пластинки». Они прорывают кору дерева, обнажая буро-коричневый гименофор. Споры сначала бесцветные, затем приобретают бледно-рыжеватую окраску; толстостенные, с одной или несколькими каплями масла внутри.

Чага химически изучена слабо. Действующими веществами считаются пигменты (меланины), образующие хромогенный полифенолкарбонный комплекс. Найдены также агаритиновая кислота, смолы, марганец (высокое содержание). Содержание меланина достигает 60 % от экстрактивных веществ и до 20 % от массы гриба. Поскольку меланин чаги содержит азот в следовых количествах, его относят к алломеланинам, черно-коричневым пигментам. Извест-

но, что он является активным действующим компонентом ряда лекарственных средств, в том числе бифунгина. Для меланина *Inonotus obliquus* доказаны антиоксидантные, противовирусные, противоопухолевые, антимуtagenные свойства.

Меланины чаги ассоциированы с белками и полисахаридами, кроме того, в них локализуются терпеноиды, стероиды, углеводороды, жирные кислоты, различные фенольные кислоты. Известно, что меланин чаги состоит из аморфных частиц, которые организованы из агрегатов и субагрегатов различной формы и размеров. В формировании этих частиц участвуют продукты ферментативного распада древесины и древесной коры, включающие полимерные (лигнин, полифенолы, белки, полисахариды) и мономерные (фенолкарбоновые кислоты, простые фенолы, зольные вещества) соединения. В меланине было показано наличие липофильных веществ, включающих высшие жирные кислоты и их эфиры, углеводороды, высшие алифатические спирты и альдегиды [16].

Кроме меланина, биологические и терапевтические свойства экстрактов обеспечивают углеводы чаги, в частности, полисахариды. Их содержание составляет 13-25 % от сухих веществ экстракта. Для углеводов чаги установлены противоопухолевые свойства, они замедляют всасывание глюкозы в пищеварительных органах, предотвращая гипергликемию после еды, а также проявляют противовирусные свойства в отношении вируса простого герпеса 2 типа и вируса лихорадки Западного Нила в концентрации 0,12 и 0,25 мг/мл по сухому веществу. Экстракты чаги показали высокую ингибирующую активность в отношении вируса SARS-CoV-2.

Тритерпеновые вещества гриба *Inonotus obliquus* представлены ланостеролом, пентациклическими тритерпенами лупанового ряда и их производными.

Природное сырье чаги входит в Государственную фармакопею РФ. В аптеках можно найти как измельченный гриб (кусочки должны проходить сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм), так и порошок тонкого помола (в фильтр-пакетах). Такая чага предназначена для использования в домашних условиях в виде отваров в качестве симптоматического средства при болезнях желудочно-кишечного тракта и онкологических заболеваниях [17].

В настоящее время на рынке востребованы препараты на основе биологически активных веществ березового гриба («Бифунгин», «Чаговит», «Мастодинон», «Ранинон»), основным действующим веществом которых является меланин [18].

Теоретический материал к лабораторной работе №5

Пекарские (хлебопекарные) дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* – вид одноклеточных микроскопических грибов (дрожжей) из класса сахаромицетов, широко используемый в производстве алкогольной и хлебопекарной продукции, а также в научных исследованиях. В 1996 году пекарские дрожжи стали

первыми эукариотами, чей геном был полностью секвенирован. *Saccharomyces cerevisiae* – один из наиболее изученных модельных организмов, на примере которого происходит исследование клеток эукариотов, они легко выращиваются и имеют низкую патогенность для человеческого организма. По сравнению с кишечной палочкой (*Escherichia coli*), клетка дрожжей содержит в несколько раз больше ДНК и имеет более сложную организацию, чем бактерии. Клетки сохраняют жизнеспособность даже с множественными генетическими маркерами в своем генотипе, что существенно с точки зрения генной инженерии.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются типичным представителем сумчатых грибов класса Ascomycetes. Размножаются почкованием, но имеют и половой процесс развития. Мицелия не образуют. Клетки дрожжей обычно сферической или круглой формы с диаметром от 7 до 10 мкм. Имеют оформленное ядро с диаметром около 2 мкм (рисунок П.12). Ядро окружено двухслойной ядерной оболочкой, соединенной с одной стороны с сетью эндоплазматического ретикулума, а с другой – с белками ядерного матрикса. Ядерная оболочка защищает и предохраняет ДНК от внешних неблагоприятных воздействий.

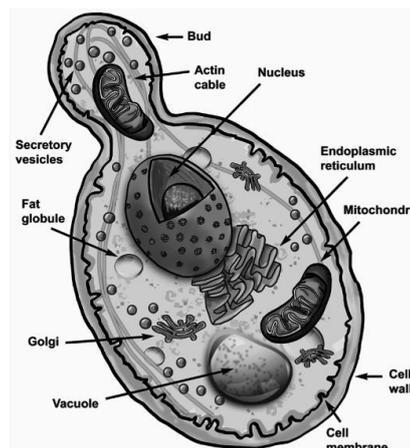


Рисунок П.12 – Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*

Связь между ДНК и цитоплазмой клетки осуществляется через ядерные мембранные белки – порины, через которые способны проникать молекулы РНК, регуляторные белки и гормоны стероидной природы. Число молекул ДНК (хромосом), приходящееся на одну клетку является важным таксономическим признаком организма. В интервале между двумя последующими делениями клетки не имеют четко выраженных хромосом. В этот период ДНК расплетена. Ядро заполняет гетерохроматин комплекс ДНК, РНК и ядерных белков.

Характерной особенностью дрожжей является отсутствие минорных оснований (6-метиладенина, 1-метилгуанина, 5-метилцитозина, 5-оксиметилцитозина), встречающихся в следовых количествах у высших эукариот в тРНК и рРНК.

При исследовании РНК было показано, что отношение суммарного количества пуриновых и пиримидиновых оснований также обнаруживает значительное постоянство. Эта величина дополнительно характеризует нуклеотидный состав микроорганизмов. Для дрожжей она в среднем колеблется в интервале 1,00 – 1,07. Первичная, вторичная и третичная структуры РНК и ДНК одинаковы для всех эукариотических организмов.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются удобным модельным организмом для изучения их генетического материала, в частности выделения нуклеопротеидов.

Нуклеопротеиды – это комплексные соединения нуклеиновых кислот и белков. По характеру нуклеиновой кислоты (НК), входящей в состав нуклеопротеида, различают дезоксирибонуклеопротеиды (ДНП) и рибонуклеопротеиды (РНП). ДНП содержатся в ядрах всех клеток (вещество хромосом), митохондриях и головках сперматозоидов. Из РНП состоят рибосомы, вирусы, информосомы (рисунки П.13–П.14). В каждой из таких структур содержится одна или несколько молекул РНК и десятки различных белков [19].

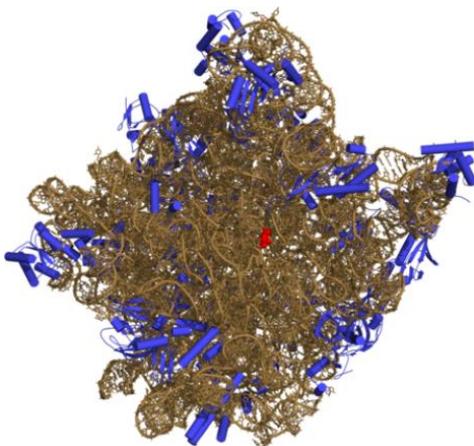


Рисунок П.13 – Нуклеопротеидный комплекс – субчастица 50S рибосом бактерий. Жёлтым показана рРНК, синим – белки

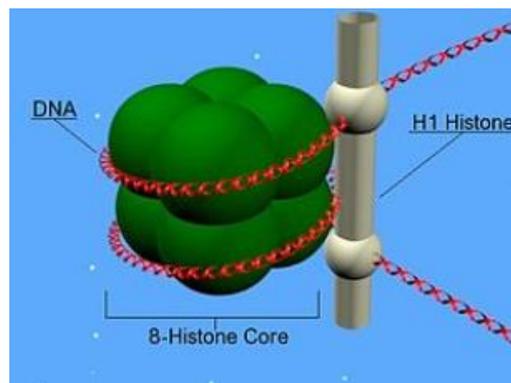


Рисунок П.14 – Комплекс нуклеосомы с гистоном

С физико-химической точки зрения нуклеиновые кислоты (НК) представляют собой линейные полиэлектролиты, состоящие из мономеров-моноклеотидов, которые включают азотистое основание (пуриновое или пиримидиновое), пентозу и остаток фосфорной кислоты. ДНК составляют дезоксирибоза и азотистые основания аденин (А), гуанин (Г), цитозин (Ц) и тимин (Т). В состав РНК входят рибоза и те же основания за исключением тимина, который заменен урацилом (У). Перечисленные азотистые основания относятся к главному ряду.

Нуклеиновые кислоты характеризуются определенным составом и распадаются:

– при неполном ферментативном гидролизе РНК и ДНК, щелочном гидролизе РНК (ДНК не гидролизуются под действием щелочей) до структурных единиц нуклеиновых кислот – мононуклеотидов;

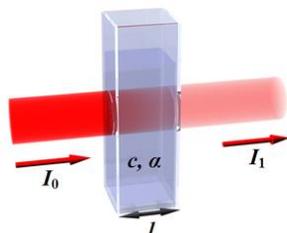
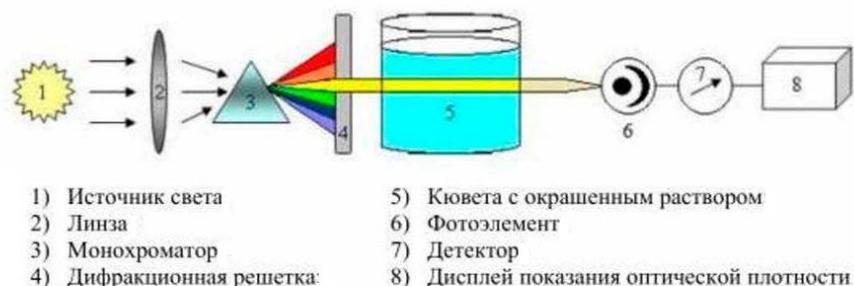
– при полном гидролизе мононуклеотидов до пуриновых (аденина, гуанина) и пиримидиновых (цитозина, тимина – только в ДНК, урацила – только в РНК) азотистых оснований, пентоз (рибозы – в РНК, дезоксирибозы – в ДНК) и фосфорной кислоты.

Продукты гидролиза нуклеопротеидов могут быть обнаружены в гидролизате специфическими для каждого соединения реакциями [20].

Теоретический материал к лабораторной работе №6

Принцип метода количественного определения ДНК в животных тканях по фосфору основан на том, что при добавлении к обработанной щелочью животной ткани насыщенного раствора поваренной соли в уксусной кислоте белки выпадают в осадок, а ДНК и другие фосфорные соединения остаются в растворе. ДНК отделяют от других фосфорных соединений путем осаждения ее спиртом и промывания осадка трихлоруксусной кислотой. Количество ДНК в тканях определяют по фосфору. Определение по фосфору считается надежным методом оценки количества нуклеиновых кислот, так как его процентное содержание в наименьшей степени зависит от нуклеотидного состава: для ДНК оно составляет 9,8-10,1 %, для РНК – 9,1-9,6 %. При определении фосфора нуклеиновых кислот в тканях необходимо также предварительно удалить свободные нуклеотиды, неорганический фосфат, а также все фосфорсодержащие соединения ненуклеотидной природы, в частности липиды [20].

Наиболее удобными и доступными для изучения белков и нуклеиновых кислот оказались их спектры, поскольку именно в последних отражаются структурные особенности молекул (оптические свойства). Например, такое свойство как опалесценция белкового раствора или раствора олигонуклеотидов. При боковом освещении таких растворов лучи света в них становятся видимыми и образуют светящийся конус – эффект Тиндаля. Объясняется этот светорассеивающий эффект дифракцией лучей частицами белка или олигонуклеотидов в растворе (рисунок П.15).



$$I = I_0 \cdot e^{-\epsilon \cdot C \cdot l}$$

или

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

Рисунок П.15 – Схема регистрации поглощения света молекулами в растворе на спектрофотометре

Многие молекулы способны поглощать свет в видимой или ультрафиолетовой области спектра. Это свойство можно использовать и для определения их концентраций. Как следует из уравнения (рисунок П.15), величина оптической плотности (A) пропорциональна концентрации поглощающего вещества (C), длине оптического пути луча в образце (l) и молярному коэффициенту экстинкции (ϵ -поглощения).

Поэтому применяют монохроматический свет, т.е. свет определенной длины волны, который можно выделить из белого света с помощью монохроматора (рисунок 6.1). Монохроматический свет интенсивности I_0 проходит через прямоугольную ячейку из стекла или кварца (кювету), в которой находится раствор поглощающего вещества. Интенсивность I выходящего света, ослабленного поглощением, измеряется с помощью детектора. Поглощение света раствором (обозначается буквой A) определяется как логарифм отношения I/I_0 .

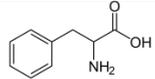
Закон Ламберта-Бера гласит, что A пропорциональна концентрации (C , моль/дм³) вещества и толщине (l , см) слоя раствора. Раствор с концентрацией 1 моль/дм³ в кювете с толщиной 1 см имеет оптическую плотность, равную ϵ , т.е. ϵ численно равен поглощению 1 М раствора при длине пути света 1 см.

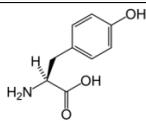
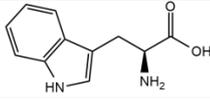
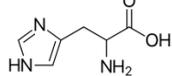
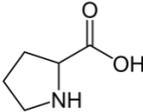
Молярный коэффициент ϵ уже не зависит от условий измерения C , l и характеризует способность молекул данного вещества поглощать свет той или другой длины волны. Размерность его – дм³/(моль·см). Измерив оптическую плотность раствора (A) в кювете с толщиной 1 см, по значению ϵ можно определить концентрацию вещества в растворе: $C = A/\epsilon$ (моль/дм³). Если толщина кюветы не равна 1 см, то C (моль/дм³) = $A / \epsilon \cdot l$.

Молярные коэффициенты многих веществ определены и приводятся в соответствующих справочных изданиях. Оптическая плотность раствора (A) за-

висит от длины волны измеряемого света. Кривую, выражающую эту зависимость, называют спектром поглощения. Характерными для нуклеиновых кислот полосами поглощения в УФ-области спектра являются полосы с λ_{\max} (длина волны, при которой наблюдается максимальное поглощение энергии света) при 200 ÷ 290 нм. Полоса поглощения с $\lambda_{\max} = 275$ нм обусловлена поглощением энергии света электронами ароматических аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин) (таблица П.2).

Таблица П.2 – Важнейшие протеиногенные α -аминокислоты

Аминокислота (*незаменимые α – АК)	Сокращенное название аминокислотного остатка в белках	Строение R
Алифатические		
Глицин	Gly	H–
Аланин	Ala	CH ₃ –
Валин*	Val	(CH ₃) ₂ CH–
Лейцин*	Leu	(CH ₃) ₂ CH–CH ₂ –
Изолейцин*	Ile	CH ₃ –CH ₂ –CH– I CH ₃
Содержащие OH– группу		
Серин	Ser	HO–CH ₂ –
Треонин*	Thr	CH ₃ –CH(OH)–
Содержащие COOH– группу		
Аспарагиновая	Asp	HOOC–CH ₂ –
Глутаминовая	Glu	HOOC–CH ₂ –CH ₂ –
Содержащие NH ₂ CO– группу		
Аспарагин	Asn	NH ₂ CO–CH ₂ –
Глутамин	Gln	NH ₂ CO–CH ₂ –CH ₂ –
Содержащие NH ₂ – группу		
Лизин*	Lys	NH ₂ –(CH ₂) ₃ –CH ₂ –
Аргинин	Arg	NH ₂ –C–NH–(CH ₂) ₂ –CH ₂ – II NH
Серосодержащие		
Цистеин	Cys	HS–CH ₂ –
Метионин*	Met	CH ₃ –S–CH ₂ –CH ₂ –
Ароматические		
Фенилаланин*	Phe	

Аминокислота (*незаменимые α – АК)	Сокращенное название аминокислотного остатка в белках	Строение R
Тирозин	Tyr	
Гетероциклические		
Триптофан*	Trp	
Гистидин	His	
Иминокислота		
Пролин	Pro	

Спектры поглощения нуклеиновых кислот, формирующиеся из спектров поглощения входящих в их состав азотистых оснований, характеризуются полосой поглощения в диапазоне 255-270 нм. Основными хромофорами нуклеиновых кислот являются пуриновые и пиримидиновые основания нуклеотидов.

В состав ДНК входят аденин, гуанин (пуриновые), цитозин и тимин (пиримидиновые азотистые основания); в РНК вместо тимина присутствует урацил. За светопоглощение ответственна, главным образом, система пуриновых и пиримидиновых колец. Полосы поглощения азотистых оснований с максимумами около 260 нм отличаются высокой интенсивностью.

При денатурации ДНК наблюдается сдвиг полосы поглощения ее образцов в более длинноволновую часть спектра с одновременным увеличением экстинкции (поглощения) [21].

Метод определения суммарного содержания нуклеиновых кислот по фосфору основан на экстракции нуклеиновых кислот (суммарного количества РНК и ДНК) горячей хлорной кислотой (HClO_4) при нагревании с последующим определением нуклеинового фосфора (Φ_n , мкг/см³) в растворе фотометрированием при длинах волн 270 и 290 нм:

$$C(\Phi_n) = \frac{(A_{270} - A_{290})}{0,19}, \quad (\text{П.1})$$

где коэффициент 0,19 – это значение ΔA , где гидролизат содержит 1 мкг НК в 1 см³ раствора.

По концентрации Φ_n вычисляют содержание нуклеиновых кислот:

$$C(\text{НК}) = C(\Phi_{\text{H}}) \cdot 10,3, \quad (\text{П.2})$$

где 10,3 – коэффициент пересчета на смесь НК.

Можно определять отдельно содержание ДНК и РНК, измеряя величину поглощения раствора при λ_{max} 270 и 290 нм и учитывая коэффициент пересчета для ДНК ($k = 10,1$) и РНК ($k = 10,5$). Расчет проводят по формуле:

$$C = \frac{(A_{270} - A_{290}) \cdot k \cdot V}{190}, \quad (\text{П.3})$$

где C – концентрация нуклеиновых кислот в мг/см³;

A – оптическая плотность при соответствующей длине волны;

k – коэффициент пересчета по фосфору нуклеиновой кислоты (для ДНК $k = 10,1$ для РНК $k = 10,5$);

V – объем исследуемой пробы;

190 – коэффициент поглощения 1 мг Φ_{H} в 1 см³ раствора.

Теоретический материал к лабораторной работе №7

Фосфопротеиды представляют собой сложные белки, состоящие из простого белка и небелковой части – фосфорной кислоты. Фосфорная кислота связана с белком через гидроксильную группу оксиаминокислот – серина и треонина (рисунок П.16).

К этой группе белков относятся казеиноген молока, вителлин яичного желтка, ихтулин икры и некоторые другие.

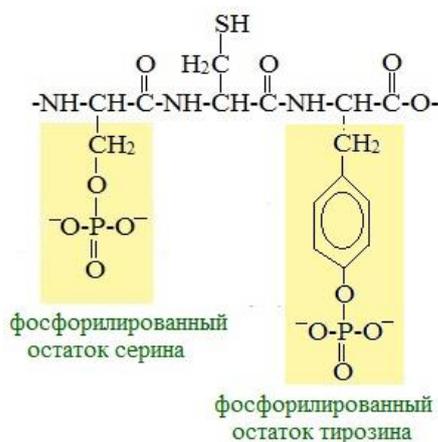


Рисунок П.16 – Способ присоединения фосфата к белку на примере серина и тирозина

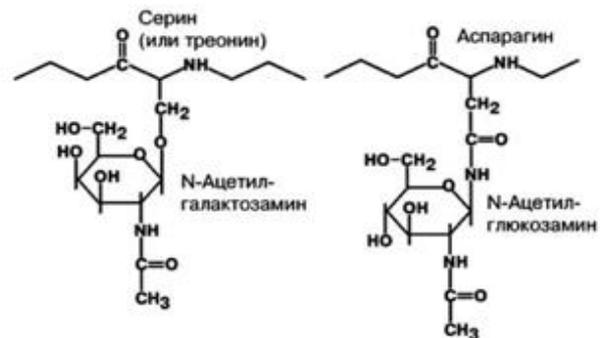


Рисунок П.17 – Способ присоединения углеводного остатка к белку на примере серина и аспарагина

Фосфопротеиды служат одним из питательных материалов для развития эмбрионов.

Гликопротеиды – сложные белки, в простетические группы которых входят углеводы и их производные (рисунок П.17). Гликопротеиды содержатся почти во всех тканях и жидкостях организма, носят общее название муцинов и мукоидов и выполняют опорную и защитную функции [20, 22].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антиоксиданты – Википедия [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Антиоксиданты>.
2. Шарова Е. И. Антиоксиданты растений / Е. И. Шарова. – СПб: Издательство СПбГУ, 2016. – 140 с.
3. Физиология и биохимия растений: учебное пособие / С. А. Гужвин, В. Д. Кумачева, Р. А. Каменев. – Персиановский: Донской ГАУ, 2019. – 172 с.
4. Каротиноиды: строение, биологические функции и перспективы применения / В. И. Дейнека, А. А. Шапошников, Л. А. Дейнека и др. // Научные ведомости. – 2006. – №8. – С. 19-25.
5. Беспалов В. Г. Питание и профилактика онкологических заболеваний / В. Г. Беспалов. – Великий Новгород: Позитив, 2015. – 242 с.
6. Каротиноиды. Биологическая активность / В. А. Дадали, Ю. В. Дадали, В. А. Тутелян и др. // Вопросы питания. – 2011. – №4. – С. 4-18.
7. Шамбазов Д. В. Определение ликопина в природном сырье / Д. В. Шамбазов, Г. Х. Абдулафарова, Р. Р. Газетдинова // Инновационная наука. – 2020. – №3. – С. 15-16.
8. Хлорофилл [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://vitamina.ru/goods/hlorofill-zhidkij-473-ml>.
9. Антоцианы [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Антоцианы>.
10. Frank, J. Effects of dietary anthocyanins on tocopherols and lipids in rats / J. Frank, A. Kamal-Eldin, T. Lundh // Agric Food Chem. – 2002. – №50(25). – P. 7226-7230.
11. Парафармацевтики: учебное пособие / Е. А. Илларионова, И. П. Сыроватский. – Иркутск: ИГМУ, 2014. – 29 с.
12. Практикум по биохимии растений / С. М. Шипарев, С. С. Медведев, Е. И. Шарова, О. В. Танкелюн. – СПб: Изд-во С.-Петербургского ун-та, 1996. – 200 с.
13. Фармакогнозия (характеристика основных групп биологически активных веществ лекарственных растений и сырья их содержащего: тесты, ситуационные задачи, практические навыки): учебное пособие / Под. общей редакцией профессора В. Л. Шелюто. – Витебск: ВГМУ, 2012. – 490 с.
14. Вторичные метаболиты растений: физиологические и биохимические аспекты. Часть 2. Алкалоиды: учебно-методическое пособие / Й. Р. Абдрахимова. – Казань: Каз. гос. ун-т, 2009. – 40 с.
15. Бухало А. С., Дудка И. А. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. – Киев: Наукова думка, 1988. – 144 с.

16. Сысоева М. А. Высокодисперсные коллоидные системы и меланин чаги: монография. Казань: Изд-во КНИТУ, 2013. – 226 с.
17. Wei Z.-H., Chen N., Li Y.-J., Fan Q.-L., Yu T.-F., Wang K.-X., et al. Glucose fed-batch integrated dissolved oxygen control strategy enhanced polysaccharide, total triterpenoids and inotodiol production in fermentation of a newly isolated *Inonotus obliquus* strain // Process Biochemistry. – 2018. – Vol. 66. – P. 1–6.
18. Шашкина М. Я., Шашкин П. Н., Сергеев А. В., Горяйнова Л. К. Чага, чаговит, чагалюкс в лечебной и профилактической практике. – М.: Холдинг ЭДАС, 2008. – 64 с.
19. Жеребцов Н. А. Биохимия: учебник для вузов / Н. А. Жеребцов, Т. Н. Попова, В. Г. Артюхов. – Воронеж: Изд-во Воронеж. гос. ун-та, 2002. – 696 с.
20. Исследование белков и нуклеиновых кислот: учебное пособие / З. И. Абрамова. – Казань: Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, 2006. – 157 с.
21. Комов В. П. Биохимия / В. П. Комов, В. Н. Шведова. – М.: Дрофа, 2004. – 640 с.
22. Шапиро Я. С. Биологическая химия / Я. С. Шапиро. – СПб.: ЭЛБИ-СПб., 2004. – 368 с.

Учебное издание

Любовь Сергеевна Дышлюк

ПАРАФАРМАЦЕВТИКИ В ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Редактор

Уч.-изд. л. 5,9. Печ. л. 5,2

Издательство федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образования
«Калининградский государственный технический университет».
236022, Калининград, Советский проспект, 1