

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Иркутский национальный исследовательский технический университет

Кафедра Химии и биотехнологии имени В.В. Тутуриной

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
по организации и проведению лабораторных работ
по дисциплине

ОРГАНИЗАЦИЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Направление подготовки:	19.04.01«Биотехнология»
Программа:	«Технология биологически активных веществ»
Квалификация	магистр
Составитель методических указаний:	С.Н. Евстафьев, д.х.н., профессор, Заведующий кафедрой Химии и биотехнологии имени В.В. Тутуриной

Иркутск
2026 г.

Организация научных исследований: методические указания по организации и проведению лабораторных работ для направления 19.04.01 «Биотехнология», магистерская программа «Технология биологически активных веществ», Составитель: Евстафьев С.Н. 2026, - 40 с. Электронный вариант

Представлены современные методы синтеза и методики выделения биологически активных веществ из природного сырья. Приведены физико-химические и химические методы анализа, а также идентификации химических соединений, которые позволяют обеспечить достоверность и сопоставимость результатов анализа.

Методические указания составлены в соответствии с учебным планом и рабочей программой дисциплины «Организация научных исследований» и предназначены для магистрантов очной формы обучения по направлению подготовки 19.04.01 – Биотехнология.

В последние десятилетия отрасль, связанная с поиском и исследованием биологически активных соединений, интенсивно развивается. Благодаря целенаправленным исследованиям в этой области знаний и технологий открыты новые подходы к скринингу биологически активных соединений, появились методы получения фармацевтических субстанций и лекарственных форм, основанных на применении нетрадиционных физических принципов, разработаны новые методы физико-химических методов анализа органических веществ.

Для того чтобы иметь современное представление о химико-фармацевтическом производстве биологически активных веществ, нужно уверенно владеть методами их получения и анализа, при этом учитывать, что данные процессы являются совокупностью большого числа химических и физико-химических явлений. Специалист в области производства БАВ должен обладать практическими знаниями в области органического синтеза и их аппаратного оформления и оценивать качество полученной субстанции.

Методические указания включают методики, предусмотренные учебной программой для практического освоения основных методов синтеза и выделения биологически активных веществ (белков, ферментов, липидов, углеводов и др.), а также их качественного и количественного анализа.

Каждая лабораторная работа содержит сведения об объекте исследования, необходимый перечень реактивов и оборудования, описание методики выполнения, вопросы для самоконтроля. Конкретным методикам в лабораторном практикуме предшествует изложение теоретических вопросов, относящихся к сущности и химизму методов анализа. Всё это способствует закреплению теоретических знаний и расширению практических навыков у будущих инженеров-технологов биотехнологической отрасли.

В результате усвоения материалов практикума магистранты должны:

Знать: методы проведения органического синтеза, принципы выделения продуктов реакции и методы контроля химических процессов;

Уметь: собирать и эксплуатировать лабораторную установку для проведения синтеза, готовить растворы, использовать вспомогательное оборудование (нагреватели, насосы, мерники и др.), интерпретировать результаты химического анализа;

Владеть: навыками подготовки рабочего места и оборудования к запуску органического синтеза, анализа хода проведения химического процесса, профессиональной аргументации при разборе стандартных ситуаций химической технологии в сфере предстоящей профессиональной деятельности, самостоятельного освоения новыми знаниями, используя современные образовательные технологии.

ПРАВИЛА РАБОТЫ И ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ

Общие правила выполнения лабораторных работ

При выполнении лабораторных работ необходимо строго соблюдать следующие правила:

1. Ключ к успеху в практической работе - думайте, прежде чем делать. Поэтому сначала познакомьтесь с ходом выполнения лабораторной работы, отчетливо уясните цели и задачи работы, обдумайте каждое действие.
2. Необходимо знать основные свойства используемых и получаемых веществ, их действие на организм, правила работы с ними, на основе этого принять все меры для безопасности проведения работ.
3. Запрещается проводить опыты в грязной посуде, а также пользоваться для проведения опытов веществами из склянок без этикеток или с неразборчивой надписью.
4. Нельзя выливать избыток реактива обратно в реактивную склянку. Сухие соли набирать чистым шпателем или ложечкой.
5. Не следует путать пробки от разных склянок. Чтобы внутренняя сторона пробки оставалась чистой, пробку кладут на стол внешней поверхностью.
6. Нельзя уносить реактивы общего пользования на свое рабочее место.
7. Дорогостоящие реактивы (например, остатки солей серебра) собирают в специально отведенную посуду. Нельзя выливать в раковину остатки растворов, горючих веществ, реакционные смеси, растворы кислот, щелочей и других вредных веществ. Они должны собираться в специальную посуду.
8. Все твердые отходы следует выбрасывать в урну.
9. Старайтесь бережно расходовать реактивы, электричество и воду. Нельзя оставлять без надобности включенные электроприборы и горящие спиртовки. По окончании работ нужно немедленно отключить электроприборы.
10. Выполнение лабораторной работы и каждого отдельного опыта требует строгого соблюдения всех указаний, содержащихся в описании работы. Опыт должен выполняться тщательно, аккуратно и без спешки.
11. Категорически запрещается без разрешения преподавателя проводить какие-либо опыты, не относящиеся к данной работе, или изменять порядок проведения опыта.
12. Если работа не может быть закончена в течение одного занятия, то необходимо заранее обсудить с преподавателем, на каком этапе работа должна быть прервана и когда можно будет ее закончить.
13. Перед уходом из лаборатории тщательно мойте руки.
14. По окончании работы полученный продукт сдать преподавателю.

Правила техники безопасности при работе в лаборатории

При работе в химической лаборатории следует помнить следующее:

1. Необходимо соблюдать правила техники безопасности, быть чистоплотным и аккуратным в работе:

а) не принимать пищу в лаборатории, не трогать руками лицо и глаза, не пробовать на вкус химические вещества, не наклоняться над реагирующей смесью;

б) работать только на лабораторном столе, все работы с ядовитыми и сильно пахнущими веществами, с концентрированными растворами кислот, щелочей, а также упаривание их растворов следует проводить только в вытяжном шкафу.

2. Измельчение твердых веществ, дающих едкую пыль (щелочей, извести, йода и др.), разбавление концентрированных кислот и щелочей, приготовление хромовой смеси и т.п. нужно проводить в фарфоровой посуде в вытяжном шкафу, защитив глаза очками, а руки перчатками.

3. Разбавляя концентрированные кислоты, особенно серную, осторожно вливать кислоту в воду.

4. С легковоспламеняющимися жидкостями нельзя работать вблизи нагревательных приборов. Запрещается нагревать летучие легковоспламеняющиеся жидкости, вещества (эфир, бензины, спирты, ацетон и т.д.) на открытом пламени. Для этого необходимо использовать водяную или масляную баню.

5. При смешивании двух жидкостей жидкость с большей плотностью приливается к жидкости с меньшей.

6. Не пользоваться неисправными приборами, неподписанными реагентами, а также реагентами, не использующимися в данной работе.

7. Запрещается набирать раствор при помощи пипетки или трубки любые вещества. Для этого следует пользоваться сифоном или резиновой грушей.

8. Особенно внимательно нужно проводить сборку установок из стекла. При этом нельзя зажимать стеклянные изделия в лапки штативов без соответствующей мягкой прокладки. Особенно осторожно обращайтесь с тонкостенной посудой, термометрами и холодильниками.

9. Нельзя нагревать закупоренные аппараты и сосуды, кроме тех, которые специально для этого предназначены. Нельзя нагревать жидкости в толстостенной и мерной посуде.

10. Нельзя работать на влажной поверхности с щелочными металлами.

11. При промывании посуды следует предварительно включить воду и разбавить остатки продукта реакции.

12. Категорически запрещается оставлять действующие приборы без присмотра.

13. Нельзя класть на лабораторные столы посторонние предметы (сумки, шапки и др.), а также вешать в лаборатории верхнюю одежду.

14. О любом происшествии в лаборатории, даже самом незначительном, необходимо сообщить преподавателю или инженеру.

15. Не стесняйтесь спрашивать обо всем, в чем у вас есть сомнения!

Правила противопожарной безопасности

1. Осторожно обращайтесь с нагревательными приборами. Запрещается работать с неисправным оборудованием и приборами. Категорически запрещается использовать для подключения электроприборы с оголенными проводами или с поврежденной изоляцией.

2. При проведении опытов, в которых может произойти самовозгорание, имейте под руками асбестовое одеяло, песок, совок и т.п.

3. В случае воспламенения горючих веществ быстро выключите вентиляцию вытяжного шкафа, обесточьте электронагревательные приборы, уберите сосуды с огнеопасными веществами и приступите к тушению пожара:

а) горящие жидкости прикройте асбестом, а затем, если нужно, засыпьте песком, но не заливайте водой;

б) в случае воспламенения щелочных металлов гасите пламя только сухим песком, но не водой;

в) в случае возгорания одежды на человеке накрывайте его асбестовым одеялом;

г) небольшие локальные пожары тушите при помощи углекислотного огнетушителя, при большом задымлении используйте противогаз.

4. В случае пожара в лаборатории немедленно вызывайте пожарную команду по телефону «01» (за исключением воспламенения щелочных металлов), и, не ожидая прибытия пожарников, принимайте все меры к ликвидации пожара собственными силами и имеющимися средствами. Студенты, не участвующие в тушении пожара, должны покинуть лабораторию.

Правила безопасной работы с легковоспламеняющимися жидкостями (ЛВЖ)

Органические растворители, особенно ЛВЖ – одни из главных источников опасности при работе в лаборатории, так как они легко воспламеняются, быстро горят и трудно гасятся. Пары многих органических жидкостей образуют с воздухом взрывоопасные смеси. В зависимости от температуры вспышки в открытом тигле ЛВЖ разделяются на три группы: особо опасные (температура вспышки до $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$), постоянно опасные (от -13 до $27\text{ }^{\circ}\text{C}$) и опасные при повышенной температуре (от 27 до $66\text{ }^{\circ}\text{C}$). К первой группе относятся ацетон, бензин, гексан, диэтиламин, диэтиловый эфир, петролейный эфир, тетрагидрофуран; ко второй – метиловый, этиловый, изопропиловый и трет-бутиловый спирты, гептан, диоксан, дихлорэтан, пиридин, толуол, триэтиламин, этилацетат; к третьей – бензилхлорид, бутиловый спирт, диметилсульфат, уксусный ангидрид, хлорбензол, циклогексанол.

Необходимо выполнять следующие правила:

1. Нельзя держать эти растворители вблизи огня, в тёплом месте или вблизи нагревательных приборов.

2. Нельзя нагревать такие вещества на открытом огне, на сетке, вблизи огня или в открытых сосудах; для этой цели следует пользоваться водяной баней с обратным водяным холодильником.

3. Нельзя хранить ЛВЖ в тонкостенной посуде с закрытой пробкой.
4. Нельзя выливать их в раковину.
5. Нельзя держать на рабочем месте большие количества таких веществ.

Первая помощь при несчастных случаях

В лаборатории бывают случаи, требующие неотложной медицинской помощи: порезы рук стеклом, ожоги горячими предметами, кислотами, щелочами. Для оказания первой помощи в лаборатории имеется аптечка. В серьезных случаях необходимо пострадавшего сопроводить к врачу.

Основные правила первой помощи сводятся к следующему:

1. При мелких порезах стеклом удалите осколки из раны, смойте кровь, продезинфицируйте раствором йода и перевяжите бинтом.
2. При ожоге рук или лица реактивом смойте реактив большим количеством воды, затем в случае ожога щелочью – 1%-ным раствором уксусной кислоты, в случае ожога кислотой – 3%-ным раствором гидрокарбоната натрия, а затем – опять водой. Одежду, соприкасавшуюся с реактивами, следует снять.
3. При ожоге горячей жидкостью или горячим предметом обожженное место промойте проточной холодной водой в течение 5-10 мин. Затем следует обратиться в ближайшее лечебное учреждение.
4. При попадании химического вещества в глаза их необходимо обильно промыть в течение 10-15 мин струей холодной воды так, чтобы она стекала от носа к виску. Веки пораженного глаза во время промывания должны быть осторожно развернуты. Контактные линзы перед промыванием следует снять. Затем в любом случае пострадавшего незамедлительно доставить в глазную клинику.
5. При попадании яда внутрь необходимо вызвать рвоту принятием теплого раствора поваренной соли (3-4 чайные ложки на стакан воды) и затем надавить пальцем на заднюю часть зева, давая пострадавшему пить большое количество теплой воды. Если пострадавший потерял сознание или же отравление вызвано проглатыванием растворителя, кислоты или щелочи, то рвоту вызывать нельзя. Необходимо пострадавшего перенести на свежий воздух и оставить в спокойном положении в тепле и немедленно вызвать бригаду неотложной помощи.
6. При поражении электрическим током необходимо быстро освободить пострадавшего от действия тока путем отключения электроэнергии общим рубильником, вынести пострадавшего на свежий воздух и при необходимости сделать искусственное дыхание и массаж сердца, немедленно вызвать скорую помощь.

Перечень лабораторных работ

Семестр №1

№ п/п	Наименование лабораторной работы	Кол-во акад. часов
1	Синтез нитробензола	25
2	Синтез о-, п-нитрохлорбензола	25
3	Синтез анилина	26
4	Выделение абиетиновой кислоты из талловой канифоли	26
5	Синтез 1,3- и 1,6-динитрокарбазола	24
	Итого	126

Семестр №2

№ п/п	Наименование лабораторной работы	Кол-во акад. часов
1	Синтез 1,3- и 1,6-диаминокарбазола	30
2	Дiazотирование диаминокарбазолов	36
3	Синтез бензилиденбисмочевина	30
4	Синтез аллантаина	30
	Итого	126

Семестр №3

№ п/п	Наименование лабораторной работы	Кол-во акад. часов
1	Выделение и количественное определение миозина	30
2	Определение АТФ-азной активности миозина	30
3	Методы выделения липидов из биологического материала	40
4	Выделение углеводов из растительного материала	30
	Итого	130

Семестр №4

№ п/п	Наименование лабораторной работы	Кол-во акад. часов

1	Выделение и идентификация кофеина из листьев зеленого чая	26
2	Анализ содержания витамина С в хвое ели	26
3	Поляриметрическое определение крахмала в рисе	29
	Итого	81

Лабораторная работа №1. СИНТЕЗ НИТРОБЕНЗОЛА

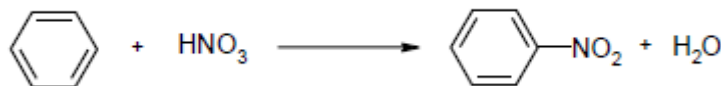
Цель работы: овладеть методикой нитрования ароматических соединений нитрующей смесью.

Задание на выполнение ЛР:

1. Провести нитрование бензола смесью азотной и серной кислот.
2. Определить температуру кипения и коэффициент преломления нитробензола.
3. Измерить УФ спектр нитробензола.
4. Рассчитать теоретический ЯМР ^1H и ^{13}C спектры для нитробензола с использованием пакета программ ACDLabs.
5. Предсказать с помощью пакета программ Pass online биологическую активность нитробензола.

Порядок выполнения работы

Нитробензол получается обработкой бензола нитрующей смесью:



Реактивы: бензол 3,9 г, серная кислота ($d=1,84$) 11,4 г, азотная кислота ($d=1,4$) 7,7 г, хлорид кальция безводный, сода

Приборы: колба круглодонная широкогорлая на 250 мл, стакан толстостенный на 1000 мл, холодильник обратный, трубка стеклянная (диаметр 8 мм, длина 50 см), воронка делительная на 100 мл, колба коническая на 100 мл, воронка, колба перегонная с низко припаянной отводной трубкой на 100 мл, баня водяная

В круглодонную колбу на 500 мл помещают 7,7 г концентрированной азотной кислоты, к которой при тщательном перемешивании добавляют 11,4 г концентрированной серной кислоты (*примечание 1*). Во время прибавления серной кислоты колбу охлаждают, погружая ее в баню с холодной водой. Колбу закрывают пробкой с термометром, доходящим почти до дна колбы, капельной воронкой емкостью 100 мл и стеклянной трубкой длиной 50 см и диаметром 8 мм, действующей как обратный холодильник. В капельную воронку помещают 3,9 г чистого бензола. Бензол прибавляют постепенно и очень медленно, порциями по 2-3 мл. После прибавления каждой порции бензола содержимое колбы тщательно встряхивают. Каждая прибавляемая порция вызывает

появление бурой окраски жидкости. Скорость прибавления бензола должна быть такой, чтобы из колбы не выделялись бурые пары оксидов азота.

Температуру смеси поддерживают около 55 °С, что достигается охлаждением колбы холодной водой (под краном или в бане). После добавления всего количества бензола колбу помещают на водяную баню, нагретую до 60 °С (но не выше) и выдерживают при этой температуре 45 мин, причем время от времени ее вынимают из бани и сильно встряхивают, не допуская расслоения реакционной смеси. Затем содержимое колбы выливают в толстостенный стакан с 100 мл холодной воды, и смесь сильно перемешивают для отделения продукта реакции от кислот. После отстаивания смесь кислот сливают как можно более тщательно, а нитробензол переносят в делительную воронку и несколько раз промывают, встряхивая с разбавленным раствором соды до прекращения выделения CO_2 (не закупоривать верхнее отверстие делительной воронки!). После промывки продукт тщательно отделяют и сушат над безводным хлористым кальцием, встряхивая время от времени колбу. Через 0,5 ч жидкость станет совсем прозрачной; ее фильтруют через маленький фильтр в перегонную колбу на 100 мл с низко припаянной отводной трубкой, снабженную термометром и соединенную с холодильником Либиха. Колбу нагревают на воздушной бане или сетке и собирают фракцию, кипящую при температуре 207-211 °С. Выход ~80 % от теоретического.

Нитробензол – желтоватая жидкость с т. кип. 210,9 °С, обладающая запахом горького миндаля, растворимая в спирте и эфире, в воде почти не растворимая. Нитробензол ядовит (в особенности его пары!) и вызывает ожоги кожи. При попадании нитробензола на кожу пораженное место нужно обмыть спиртом, а затем теплой водой с мылом.

Внимание!

1. Бензол нитруется легко, однако нежелательно применять для нитрования одну азотную кислоту, чтобы избежать образования большого количества побочных продуктов.

2. Во время нитрования следует тщательно выдерживать заданную температуру, чтобы не допустить образования *м*-динитробензола.

3. Так как пары нитробензола ядовиты, при перегонке следует обращать особенное внимание на герметичность прибора.

4. Нитробензол и другие нитросоединения никогда не следует отгонять «досуха», так как они могут содержать высшие продукты нитрования, которые при перегревании легко самовоспламеняются и даже взрываются. Перегонку нужно прекращать, когда в колбе останется немного жидкости или, когда температура кипения достигнет 214 °С.

Контрольные вопросы:

1. Привести основные области применения нитробензола.
2. Приведите механизм реакции нитрования.
3. Какую роль в процессах нитрования ароматических соединений играет концентрированная серная кислота.

4. Почему следует во время проведения процесса нитрования охлаждать реакционную смесь?
5. Опишите электронный спектр нитробензола. По закону Бугера-Ламберта-Бера рассчитайте десятичный логарифм коэффициента молярного поглощения $\lg \epsilon$.
6. Опишите теоретические спектры ЯМР ^1H и ^{13}C для нитробензола.
7. Опишите схему лабораторной установки.
8. Изложите порядок выполнения работы.

Лабораторная работа №2. СИНТЕЗ *o*-, *p*-НИТРОХЛОРБЕНЗОЛА

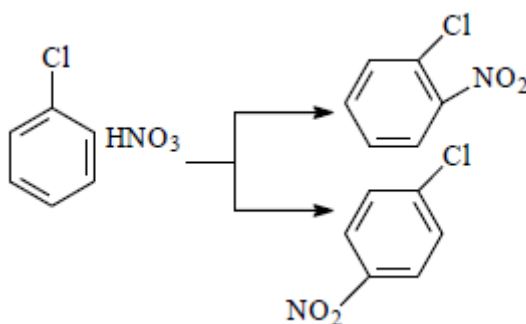
Цель работы: овладеть методикой нитрования галогенароматических соединений азотной кислотой.

Задание на выполнение ЛР:

1. Провести нитрование хлорбензола концентрированной азотной кислот.
2. Определить температуры плавления и кипения *o*- и *p*- нитрохлорбензола.
3. Измерить УФ спектр *o*- и *p*- нитрохлорбензола.
4. Рассчитать теоретический ЯМР ^1H и ^{13}C спектры для *o*- и *p*- нитрохлорбензола с использованием пакета программ ACDLabs.
5. Предсказать с помощью пакета программ Pass online биологическую активность *o*- и *p*-нитробензола.

Порядок выполнения работы

o- и *p*-Нитрохлорбензол получают при обработке хлорбензола концентрированной азотной кислотой



Реактивы: хлорбензол 22,5 г; азотная кислота ($d=1,5$) 15 г; этиловый спирт 75 мл; лед

Приборы: колба круглодонная на 50 мл; стакан химический на 200 мл; дефлегматор; воронка Бюхнера; колба Бюнзена; воздушный холодильник; прибор для фракционной перегонки

В стакан ёмкостью 200 мл, помещенный в вытяжном шкафу, наливают 22,5 г хлорбензола и осторожно, при перемешивании, медленно добавляют 15 г азотной кислоты (примечание). Смесь оставляют на 24 ч в холодном месте, затем выливают на лед, причем выделяются *p*-нитрохлорбензол в виде кристаллов и *o*-нитрохлорбензол в виде масла. Кристаллы отделяют декантацией,

тщательно фильтруют на воронке Бюхнера и перекристаллизовывают из горячего спирта. Для этого осадок растворяют в возможно малом количестве кипящего спирта; после охлаждения выпадают кристаллы достаточно чистого п-нитрохлорбензола.

Оставшееся масло охлаждают льдом до кристаллизации. Для получения чистого о-нитрохлорбензола его перегоняют из колбы с дефлегматором, собирая фракцию, кипящую при температуре 244-247 °С.

Выход п-нитрохлорбензола составляет 67 % от теоретического, а о-нитрохлорбензола 28 %. п-Нитрохлорбензол кристаллизуется в виде призм или пластинок с т. пл. 85 °С и т. кип. 242 °С. о-Нитрохлорбензол образует иглы с т. пл. 33 °С и т. кип. 245,7 °С. Оба вещества не растворяются в воде, растворяются в спирте и эфире, обладают запахом, напоминающим запах нитробензола, но более острым; они также ядовиты и раздражают кожу.

Примечание: нитрование хлорбензола дает смесь о- и п-нитро-хлорбензолов в отношении приблизительно 1:2.

Контрольные вопросы:

1. Привести основные области применения о- и п-нитрохлорбензола.
2. Приведите механизм реакции нитрования хлорбензола.
3. Почему следует во время проведения процесса нитрования охлаждать реакционную смесь?
4. Что понимают под термином «декантация»
5. Опишите электронные спектры о-и п-нитрохлорбензола: по закону Бугера-Ламберта-Бера рассчитайте десятичный логарифм коэффициента молярного поглощения $\lg \epsilon$.
6. Опишите теоретические спектры ЯМР ^1H и ^{13}C для о- и п-нитрохлорбензола.
7. Опишите схему лабораторной установки.
8. Изложите порядок выполнения работы.

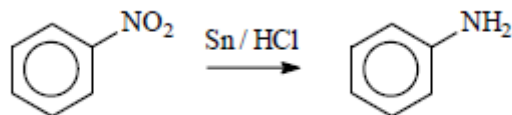
Лабораторная работа № 3. СИНТЕЗ АНИЛИНА

Цель работы: овладеть методикой восстановления нитробензола до анилина.

Задание на выполнение ЛР:

1. Провести восстановление нитробензола оловом в присутствии концентрированной соляной кислоты до анилина.
2. Определить температуру кипения анилина.
3. Измерить УФ спектр анилина.
4. Рассчитать теоретический ЯМР ^1H и ^{13}C спектры для анилина с использованием пакета программ ACDLabs..
5. Предсказать с помощью пакета программ Pass online биологическую активность анилина.

Порядок выполнения работы



Реактивы: нитробензол 15,4 г; олово 30 г; соляная кислота конц. 67,5 мл; едкий натр 37,5 г; дистиллированная вода 70 мл; хлорид натрия 25 г/100 мл; серный эфир 150 мл; едкое кали

Приборы: колба круглодонная на 500 мл; воздушный холодильник; стакан химический на 500 мл; холодильник либиха; насадка вюрца; аллонж; приемник; масляная баня; паровик

В круглодонной колбе емкостью 500 мл смешивают 30 г мелкогранулированного олова с 15,4 г нитробензола. К смеси постепенно прибавляют 67,5 мл концентрированной соляной кислоты следующим образом: сначала прибавляют одну десятую часть соляной кислоты, затем соединяют колбу с обратным воздушным холодильником и взбалтывают. Через короткое время смесь нагревается и вскипает. Колбу охлаждают холодной водой, но так, чтобы реакция не прекратилась совсем. Затем постепенно при постоянном взбалтывании прибавляют оставшуюся соляную кислоту, поддерживая довольно бурное течение реакции. Под конец нагревают смесь в течение часа на водяной бане. К горячему раствору прибавляют 20 мл воды и затем приливают раствор 37,5 г едкого натра в 50 мл воды до сильнощелочной реакции. Колбу соединяют с прямым холодильником и отгоняют анилин с водяным паром до тех пор, пока дистиллят не станет совершенно прозрачным. К полученному дистилляту прибавляют поваренную соль (из расчета 25 г на 100 мл жидкости), растворяют ее и извлекают анилин диэтиловым эфиром. Эфирный раствор высушивают гранулами твердого едкого кали, и после отгонки эфира перегоняют анилин. Температура кипения чистого анилина 184 °С. Выход 90-100 % от теоретического.

Контрольные вопросы:

1. Привести основные области применения анилина.
2. Почему для очистки анилина применяют перегонку с паром?
3. Опишите электронный спектр анилина: по закону Бугера-Ламберта-Бера рассчитайте десятичный логарифм коэффициента молярного поглощения $\lg \epsilon$.
4. Опишите теоретические спектры ЯМР ^1H и ^{13}C для анилина.
5. Опишите схему лабораторной установки.
6. Изложите порядок выполнения работы.

Лабораторная работа №4.
ВЫДЕЛЕНИЕ АБИЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ТАЛЛОВОЙ
КАНИФОЛИ

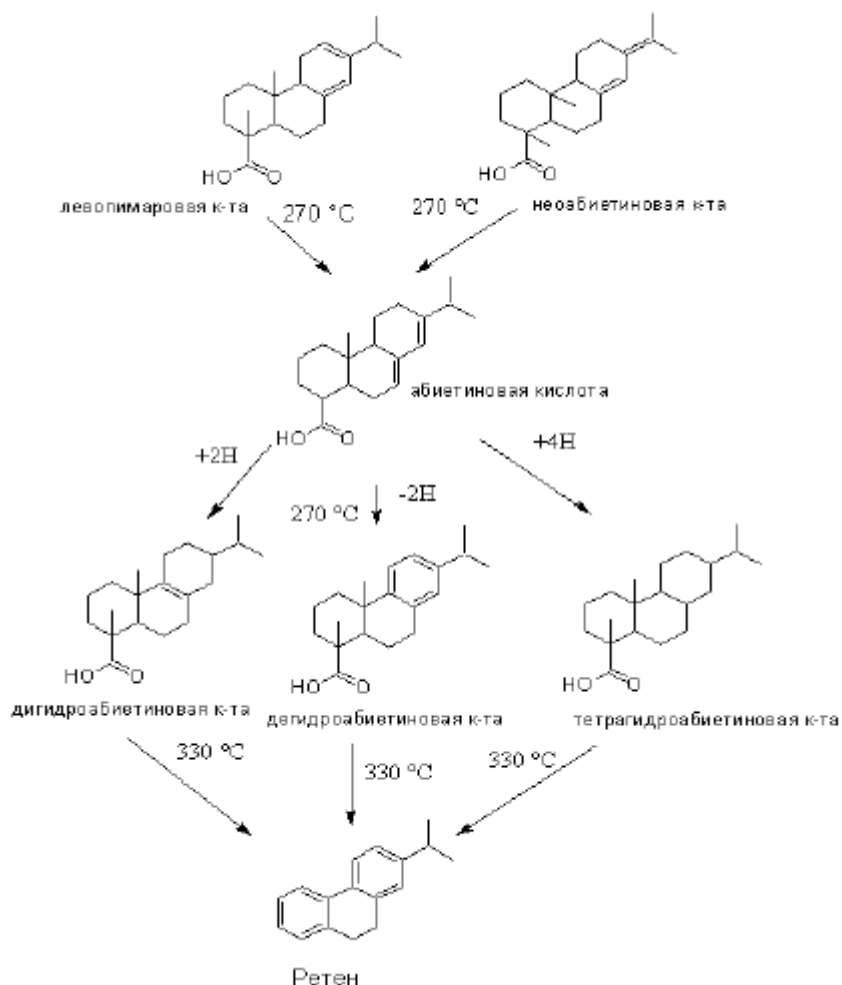
Цель работы: овладеть методикой выделения абиетиновой кислоты (АК) из канифоли.

Задание на выполнение ЛР:

1. Провести изомеризацию смоляных кислот, входящих в состав канифоли под действием концентрированной соляной кислоты; выделить из полученного изомеризата АК путем получения диэтиламмониевой соли с последующим разложением этой соли концентрированной уксусной кислотой.
2. Методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) подтвердить чистоту продуктов.
3. Определить температуру плавления АК.
4. Измерить УФ спектр АК и канифоли, рассчитать логарифмы коэффициента молярного поглощения $\lg \epsilon$.
5. Рассчитать теоретические ЯМР ^1H и ^{13}C спектры для АК и канифоли.
6. Предсказать с помощью пакета программ Pass online биологическую активность АК и диэтиламмониевой соли АК.

Порядок выполнения работы

Диспропорционирование абиетиновой кислоты



I стадия. Изомеризация канифоли

Реактивы: канифоль 25 г; этанол 75 мл; соляная кислота 5 мл; аргон

Приборы: колба круглодонная на 250 мл; обратный холодильник; термометр, 0÷100 °C; склянка Алифанова или Дрекслея; газоотводная трубка; электроплитка; водяная баня

В трехгорлую колбу, снабженную, термометром, обратным холодильником и газоотводной трубкой, помещают 25 г предварительно измельченной талловой канифоли, затем при интенсивном перемешивании добавляют 75 мл этанола и 5 мл концентрированной соляной кислоты под аргоновой подушкой (*примечание*). Реакционную смесь кипятят в течение 2 ч. По окончании процесса изомеризации реакционная масса становится прозрачной, причем цвет раствора изменяется от светло-желтого до темно-желтых оттенков.

Внимание!

Для контроля за скоростью потока газа используют склянку Алифанова, соединенную с системой через обратный холодильник.

II стадия. Отгонка смеси растворителей с водяным паром

Реактивы: Реакционная масса I стадии.

Приборы: колба круглодонная на 500 мл; холодильник либиха; аллонж; приемник на 250 мл; электроплитка; паровик

Горячий изомеризат переносят в круглодонную колбу на 500 мл и отгоняют с водяным паром смесь этанола соляной кислоты. По мере удаления из системы растворителя начинается выделение твердой фазы изомеризата в виде воскообразных комочков желтого цвета. По окончании отгонки установку разбирают, оставшийся растворитель декантируют.

III стадия. Промывка изомеризованной канифоли от остатков соляной кислоты и этилового спирта

Реактивы: изомеризованная канифоль; диэтиловый эфир 100 мл; дистиллированная вода 180 мл; сульфат магния прокаленный 3 г

Приборы: делительная воронка на 500 мл; химический стакан на 250 мл; колба Эрленмейера на 100 мл; стеклянная пробка

Отфильтрованную твердую фазу (канифоль) - продукт II стадии, переносят в делительную воронку, и добавляют 100 мл диэтилового эфира. Воронку осторожно встряхивают несколько раз до полного растворения изомеризата, после чего эфирный раствор промывают 60 мл дистиллированной воды. Когда эмульсия расслоится водную фазу (нижний слой) отделяют и повторяют операцию промывки свежей порцией воды еще 2 раза, затем промытый эфирный раствор изомеризованной канифоли переносят в колбу Эрленмейера, засыпают сульфат магния и сушат.

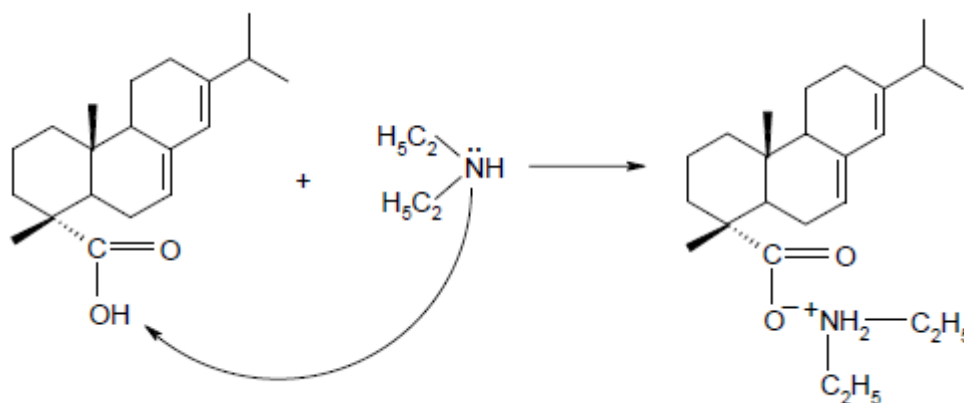
IV стадия. Очистка диэтиламина методом простой перегонки

Реактивы: диэтиламин 50 м.

Приборы: колба круглодонная на 100 мл; термометр, 0-150 °C; холодильник Либиха; насадка Вюрца; аллонж; приемник на 100 мл; электроплитка; водяная баня

В круглодонную колбу на 100 мл помещают 50 мл диэтиламина и проводят простую перегонку. Диметиламин – бесцветная жидкость с резким запахом, т. кип. 55,5 °C, n_{D20} 1,3860.

V стадия. *Получение абиетата диэтиламмония*



Реагенты: высушенная канифоль; диэтиламин 8 мл.

Приборы: колба Эрленмейера на 100 мл; коническая воронка; стеклянная палочка

После высушивания эфирный раствор изомеризованной канифоли (продукт III стадии) отделяют от сульфата магния, затем к раствору осторожно добавляют 8 мл свежеперегнанного диэтиламина и перемешивают стеклянной палочкой, после чего колбу закрывают пробкой и охлаждают. Через несколько часов из раствора начинают выпадать игольчатые кристаллы абиетата диэтиламмония.

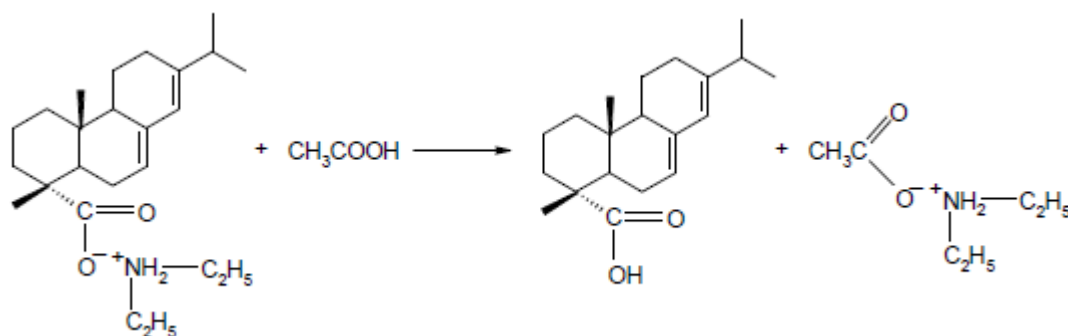
VI стадия. *Выделение и очистка абиетата диэтиламина*

Реактивы: абиеатат диэтиламмония; гексан охлажденный 150 мл; петролейный эфир (фр. 70 ÷ 100 °C)

Приборы: колба плоскодонная коническая на 250 мл; химический стакан на 250 мл; воронка Бюхнера; колба Бунзена; фильтр Шотта; электроплитка

Выпавшие кристаллы абиетата диэтиламмония (продукт V стадии) отфильтровывают на воронки Бюхнера и промывают небольшими порциями охлажденного гексана до исчезновения запаха диэтиламина. Затем промытую соль переносят в плоскодонную коническую колбу и перекристаллизовывают из горячего петролейного эфира не менее 3-х раз, после чего очищенный абиеатат диэтиламмония отделяют от маточного раствора на фильтре Шотта, промывают охлажденным гексаном и сушат в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 .

VII стадия. *Получение абиетиновой кислоты путем разложения абиетата диэтиламмония*



Реактивы: высушенный абиеат диэтиламмония; дистиллированная вода 700 мл; ледяная уксусная кислота

Приборы: химический стакан на 750 мл; мерный стакан на 500 мл; цилиндр на 50 мл; воронка Бюхнера; колба Бунзена; механическая мешалка

Высушенную соль абиеата диэтиламмония (продукт VI стадии) взвешивают и рассчитывают по уравнению реакции необходимое количество ледяной уксусной кислоты. Затем соль переносят в химический стакан и перемешивают механической мешалкой до полного ее растворения, после чего медленно небольшими порциями добавляют ледяную уксусную кислоту. Выпадает белый творожистый осадок абиеиновой кислоты, которую отфильтровывают на воронке Бюхнера, промывают дистиллированной водой и сушат с начала на воздухе, затем в вакуум- эксикаторе над P_2O_5 .

VIII стадия. Перекристаллизация абиеиновой кислоты

Реактивы: сырец абиеиновой кислоты; этанол.

Приборы: колба плоскодонная коническая на 100 мл; обратный холодильник; химический стакан на 250 мл; мерный стакан на 100 мл; коническая воронка; фильтр Шотта; электроплитка; водяная баня

Высушенную абиеиновую кислоту (продукт VII стадии) переносят в плоскодонную коническую колбу на 100 мл, снабженную холодильником, добавляют небольшое количество этанола и начинают нагревать на водяной бане, постепенно добавляя этанол через обратный холодильник до полного растворения всей кислоты. Затем горячий раствор фильтруют через складчатый фильтр в химический стакан. Выпадают белые кристаллы абиеиновой кислоты, которую отфильтровывают на фильтре Шотта, промывают дистиллированной водой и сушат с начала на воздухе, затем в вакуум-эксикаторе над P_2O_5 .

Контрольные вопросы:

1. Привести основные области применения канифоли и ее производных.
2. Приведите схему диспропорционирования смоляных кислот ряда абиеана в АК при нагревании в присутствии кислоты.
3. Для чего при изомеризации канифоли применяется аргон?
4. Опишите электронный спектр АК, по закону Бугера-Ламберта-Бера рассчитайте десятичный логарифм коэффициента молярного поглощения $lg\epsilon$.
5. Опишите теоретические спектры ЯМР ^1H и ^{13}C для АК и канифоли.
6. Опишите процедуру выделения АК из канифоли.

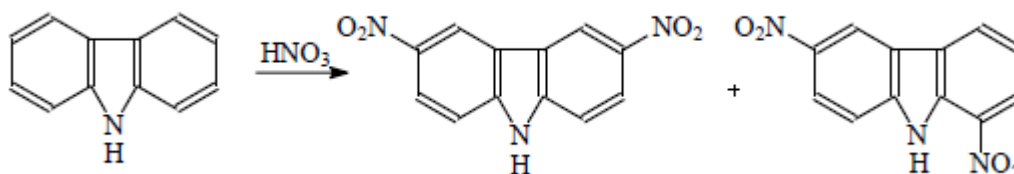
Лабораторная работа №5. **СИНТЕЗ 1,3- и 1,6-ДИНИТРОКАРБАЗОЛА**

Цель работы: овладеть методикой нитрования конденсированных циклически соединений на примере карбазола.

Задание на выполнение ЛР:

1. Провести нитрование карбазола в среде уксусной кислоты с помощью HNO_3 .
2. Разделить смесь нитрокарбазолов на 1,3- и 1,6-изомеры методом дробной кристаллизации.
3. Методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) подтвердить чистоту продуктов.
4. Определить температуры плавления изомерных нитрокарбазолов.
5. Измерить УФ спектр нитрокарбазолов, рассчитать логарифмы коэффициента молярного поглощения $\lg \epsilon$.
6. Рассчитать теоретические ЯМР ^1H и ^{13}C спектры для нитрокарбазолов с использованием пакета программ ACDLabs.
7. Предсказать с помощью пакета программ Pass online биологическую активность нитрокарбазолов.

Порядок выполнения работы



Реактивы: карбазол 20 г; ледяная уксусная кислота 250 мл; азотная кислота 70 %- я 17 мл; 1,4-диоксан 310 мл; дистиллированная вода 200 мл; 3,6-динитрокарбазол.

Приборы: колба круглодонная на 500 мл; обратный холодильник; капельная воронка на 25 мл; термометр 0-150°C; колба Бунзена; воронка Бюхнера; механическая мешалка; электроплитка; масляная баня

К 20 г карбазола в 100 мл ледяной уксусной кислоты при 85 °С прикапывают 17 мл 70 %-й азотной кислоты с такой скоростью, чтобы температура реакционной массы держалась в интервале 85-87 °С. После введения всей кислоты температуру в колбе поднимают до 95°C и выдерживают 4 ч. Полученную смесь 1,6- и 3,6-динитрокарбазолов отфильтровывают под вакуумом, промывают 150 мл ледяной уксусной кислоты, затем водой до нейтральной реакции и сушат на воздухе. Полученную смесь изомеров кипятят в 200 мл 1,4-диоксана 1 ч. Не растворившийся в 1,4-диоксане продукт отфильтровывают, промывают 1,4-диоксаном, смешивают со 100 мл 1,4-диоксана и повторяют описанную операцию. Остаток, не растворимый в 1,4-диоксане после двойной

обработки, представляет собой 3,6-динитрокарбазол. Выход 3,6-динитрокарбазола составляет 51 %, т.пл. 379-381 °С, Rf 0,42. По литературным данным т. пл. 386-387°С.

Смесь изомерных 3,6- и 1,6-динитрокарбазолов разделяют способом, основанном на их различной растворимости в 1,4-диоксане. Так, 1,6-динитрокарбазол переходит в раствор, из которого его упаривают в вакууме. Выход 3,6-динитрокарбазола составляет 51 %, а 1,6-динитро-карбазола – 40 %, чистота полученных соединений подтверждают методом ТСХ.

1,6-Динитрокарбазол получают путем отгонки 1,4-диоксана в виде желто-оранжевых кристаллов. Выход 1,6-динитрокарбазола составляет 40 %, т.пл. 342-344 °С. Rf = 0,51. По литературным данным т. пл. 344-346 °С (испр. из нитробензола).

Контрольные вопросы:

1. Привести основные области применения карбазола и его производных.
2. Почему при нитровании температура реакционной массы не должна превышать 85-87 °С?
3. Опишите электронные спектры 1,3- и 1,6-динитрокарбазолов, по закону Бугера-Ламберта-Бера рассчитайте десятичные логарифмы коэффициентов молярного поглощения lgε.
4. Опишите теоретические спектры ЯМР ¹H и ¹³C для 1,3- и 1,6-динитрокарбазолов
5. Описать процедуру дробной кристаллизации 1,3- и 1,6-динитрокарбазолов.
6. Изложите порядок выполнения работы.

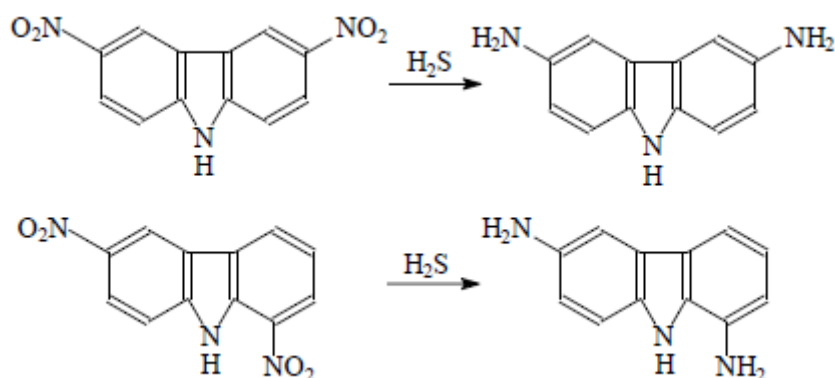
Лабораторная работа № 6 СИНТЕЗ 1,3- И 1,6-ДИАМИНОКАРБАЗОЛА

Цель работы: овладеть методикой восстановления нитрогруппы нитрокарбазолов с помощью сульфида натрия.

Задание на выполнение ЛР:

1. Провести восстановление нитрогруппы карбазолов сульфидом натрия.
2. Определить температуры плавления изомерных аминокарбазолов.
3. Проверить чистоту диаминокарбазола методом ТСХ.
4. Измерить УФ спектры 1,6-диаминокарбазола, рассчитать логарифмы коэффициентов молярного поглощения lgε.
5. Рассчитать теоретические ЯМР ¹H и ¹³C спектры для 1,6- диаминокарбазолов с помощью пакета программ ACDLabs..
6. Предсказать с помощью пакета программ Pass online биологическую активность

Порядок выполнения работы



Реагенты: 1,3- или 1,6-динитрокарбазол 25,7 г; сульфид натрия 96 г; медный купорос водный раствор 5 мл; соляная кислота 30 мл; активированный уголь; оу марка «а» 5 г; аммиак водный около 10 мл; дистиллированная вода 900 мл.

Приборы: колба круглодонная на 1000 мл; обратный холодильник; термометр, 0-150 °С; стаканы на 100 и 500 мл; цилиндр на 50 мл; колба Бунзена; воронка Бюхнера; механическая мешалка; электроплитка; масляная баня.

В трехгорлую колбу емкостью 1 л, снабженную обратным холодильником и мешалкой, загружают раствор 96 г сульфида натрия в 200 мл воды и нагревают до 100 °С, после чего добавляют суспензию 25,7 г 1,3- или 1,6-динитрокарбазола в 160 мл воды. Реакционную массу выдерживают при 100 °С в течение 1 ч и охлаждают. Осадок отфильтровывают и промывают водой до полного отсутствия сульфид-иона в промывных водах. Остаток растворяют при нагревании в 30 мл концентрированной соляной кислоты и 400 мл воды, кипятят с активированным углем, фильтрат охлаждают и нейтрализуют водным аммиаком до нейтральной реакции. Осадок отделяют, промывают водой и сушат на воздухе. Выход 1,6-диаминокарбазола составляет 66 % от теоретического.

Контрольные вопросы:

1. Привести основные области применения карбазола и его производных.
2. Какие еще восстанавливающие агенты используются для перевода нитрогруппы в аминогруппу?
3. Как определяется отсутствие в промывных водах сульфид-аниона?
4. Опишите электронные спектры 1,3- и 1,6-диаминокарбазолов, по закону Бугера-Ламберта-Бера рассчитайте десятичные логарифмы коэффициентов молярного поглощения $\lg \epsilon$.
5. Опишите теоретические спектры ЯМР ^1H и ^{13}C для 1,6-диаминокарбазола.
6. Изложите порядок выполнения работы.

Лабораторная работа № 7

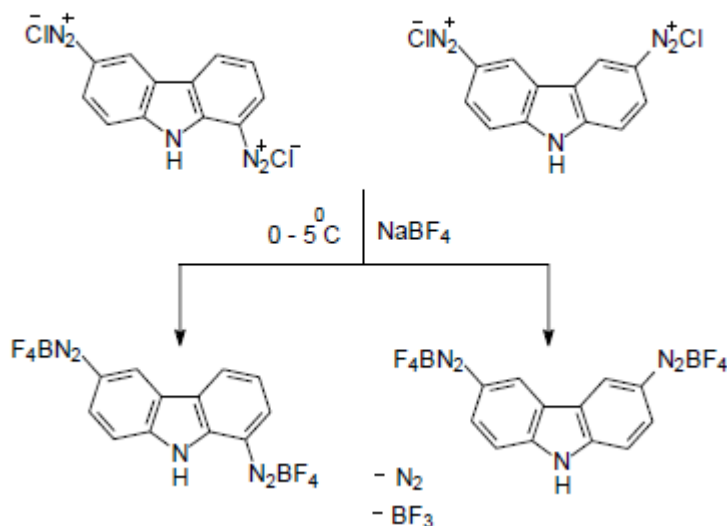
ДИАЗОТИРОВАНИЕ ДИАМИНОКАРБАЗОЛОВ

Цель работы: овладеть методикой диазотирования диаминопроизводных.

Задание на выполнение работы:

1. Провести диазотирование диаминокарбазола нитритом натрия в среде соляной кислоты.
2. Получить бис(тетрафторборатдiazоний) карбазол обработкой бис-(хлориддiazоний)карбазола тетрафторборатом натрия.
3. Измерить ИК спектр бис(тетрафторборатдiazоний) карбазолов.
4. Рассчитать теоретические ЯМР ^1H и ^{13}C спектры для бис- (тетрафторборатдiazоний) карбазолов с помощью пакета программ ACDLabs..

Порядок выполнения работы



Реагенты: 1,3- или 1,6-динитрокарбазол 2,54 г; нитрит натрия 3 г; соляная кислота 7 мл; дистиллированная вода 70 мл; тетрафторборат натрия 5 г; лед.

Приборы: химический стакан на 250 мл; термометр - $10-100^\circ\text{C}$; цилиндр на 50 мл; фильтр Шотта; механическая мешалка; ледяная баня.

В химическом стакане на 250 мл растворяют 2,54 г диаминокарбазола в 7 мл соляной кислоты и 27 мл воды и отфильтровывают через коническую воронку с бумажным фильтром. К полученному раствору при $0 \div +5^\circ\text{C}$ и прикапывают раствор нитрита натрия (3 г в 20 мл воды), затем смесь выдерживают в течение 40 мин и отфильтровывают от механических примесей, в результате получают раствор бис(хлориддiazоний)карбазола.

Полученный раствор бис(хлориддiazоний)карбазола охлаждают до $+5^\circ\text{C}$ и добавляют 2 г тетрафторбората натрия в виде 40 %-го раствора в воде, смесь выдерживают в течение 30 мин при перемешивании. Выпавший осадок

бис(тетрафторборатдiazоний)карбазола (коричневого цвета) отфильтровывают на фильтре Шотта, промывают небольшим количеством ледяной воды и оставляют сушиться на воздухе.

Контрольные вопросы:

1. Привести основные области применения карбазола и его производных.
2. Какие еще восстанавливающие агенты используются для перевода нитрогруппы в аминогруппу?
3. Как определяется отсутствие в промывных водах сульфид-аниона?
4. Опишите электронные спектры 1,3- и 1,6-динитрокарбазолов, по закону Бугера-Ламберта-Бера рассчитайте десятичные логарифмы коэффициентов молярного поглощения $\lg \epsilon$.
5. Опишите теоретические спектры ЯМР ^1H и ^{13}C для 1,3- и 1,6-динитрокарбазолов
6. Описать процедуру дробной кристаллизации 1,3- и 1,6-динитрокарбазолов.

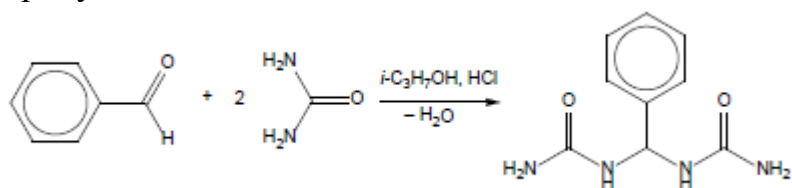
Лабораторная работа № 8.
СИНТЕЗ БЕНЗИЛИДЕНБИСМОЧЕВИНЫ

Бензилиденбисмочевина (1,1'-(фенилметилден)бисмочевина)

Брутто-формула $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$.

Сведения о веществе

Бензилиденбисмочевина представляет собой белое кристаллическое вещество, являющимся превосходным реагентом для синтеза разнообразных производных пиримидина, обладающих широким спектром биологической активности. Бензилиденбисмочевину получают конденсацией мочевины с бензальдегидом в присутствии соляной кислоты



Реактивы: мочевина 1,0 г; изопропиловый спирт 20 мл; кислота HCl (конц.) 1 мл; бензальдегид 0,8 мл; диэтиловый эфир / изопропиловый спирт 10 мл / 10 мл.

В круглодонную трёхгорлую колбу, снабженную термометром, обратным холодильником и мешалкой помещают 20 мл изопропилового спирта, содержащего несколько (1-2) капель концентрированной HCl . В данной смеси растворяют мочевину массой 1,0 г (0,02 моль). К полученному раствору при перемешивании добавляют 0,8 мл (0,87 г, 0,01 моль) бензальдегида. Реакционную массу выдерживают при перемешивании 1,5 ч, затем образующуюся гелеобразную массу отфильтровывают и промывают 10 мл диэтилового эфира,

60 мл теплой воды и 10 мл изопропилового спирта. Осадок сушат на воздухе, выход бензилиденбисмочевины составляет 4,2 г (83 %), Т.пл. 228-232 °С.

Вопросы:

1. Напишите химизм образования бензилиденбисмочевины, учитывая, что это каталитический процесс.
2. Назовите основные правила техники безопасности при работе с диэтиловым эфиром.
3. Приведены значения полос поглощения в ИК-спектре бензилиденбисмочевины. Сделайте вывод о соответствии приведенных характеристических полос структуре синтезированного соединения.

**Лабораторная работа № 9.
СИНТЕЗ АЛЛАНТОИНА**

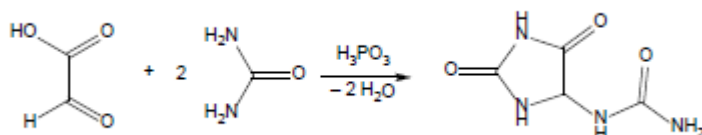
Аллантоин (2,5-диоксо-4-имидазолидинил)мочевина)

Брутто-формула C₄H₆N₄O₃.

Сведения о веществе

Аллантоин представляет собой белый порошок, не растворимый в воде и в большинстве органических растворителей. Аллантоин входит в состав косметических средств, обладающих геронтологическим и регенерирующим действием. Он способствует удалению рубцов и шрамов, восстанавливает нормальную влажность и эластичность кожи, снижает генотоксический эффект ультрафиолетового излучения, является антиоксидантом. Аллантоин входит в состав омолаживающих и регенерирующих кремов («Камелокс», «Защита и увлажнение», «Румяные щёчки», «Медерма»).

Аллантоин синтезируют реакцией циклизации глиоксалевой кислоты и мочевины



Методика синтеза

В колбу объемом 100 мл, снабженную мешалкой и обратным холодильником, помещают 1,80 г 50 %-ного водного раствора мочевины, 0,25 мл (0,41 г) 50 %-ного раствора фосфористой кислоты и 0,02 г сульфаминовой кислоты. Далее при перемешивании при 15 °С добавляют по каплям 1,13 мл (1,5 г) 50 %-ного раствора глиоксалевой кислоты. Смесь перемешивают 2 ч при 95 °С, при этом наблюдается образование белого осадка аллантоина. После охлаждения смесь фильтруют, промывают теплой водой и сушат. Выход 0,56 г (64 %). Т.пл. 237-238 °С.

Вопросы:

1. Образование аллантоина протекает через 2 химические стадии. Опишите эти стадии.
2. Почему для промывки аллантоина используют воду?

3. Соотнесите химические сдвиги в спектрах ЯМР и полосы поглощения карбонильных атомов углерода в ИК-спектрах со структурой соединения (в структуре аллантаина имеются 3 типа карбонильных групп.)

Лабораторная работа № 10

ВЫДЕЛЕНИЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИОЗИНА

Цель работы – выделение миозина из куриной грудки экстракцией и гель-хроматографией, а также его количественное определение спектрофотометрическим методом анализа.

Общая характеристика миозина. Миозин – фибриллярный белок, один из главных компонентов сократительных волокон мышц миофибрилл. Составляет 40–60% от общего количества мышечных белков. Это очень длинная палочковидная молекула с хвостом, состоящим из двух навитых друг на друга α -спиральных полипептидов (рис. 3.1). Она имеет также сложную по своему строению «головку», обладающую ферментативной активностью, заключающуюся в катализе процесса гидролитического расщепления аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) на аденозиндифосфорную кислоту (АДФ) и фосфат. Таким образом, благодаря АТФ-азной активности миозина химическая энергия макроэргических связей АТФ превращается в механическую энергию мышечного сокращения.

Общая молекулярная масса миозина составляет 450 кДа, молекула имеет длину около 160 нм и содержит шесть полипептидных цепей. Длинный хвост состоит из двух цепей, каждая с молекулярной массой 200 кДа; это тяжелые цепи, в которых находятся гибкие шарнирные участки. Головка имеет глобулярную форму и содержит концы тяжелых цепей, а также четыре легкие цепи, свернутые в виде глобул, каждая с молекулярной массой около 18 кДа. белок, можно объединить.

Реактивы, материалы и оборудование: охлажденная куриная грудка; бумага фильтровальная; гомогенизатор (блендер) или мясорубка механическая; холодильник; спектрофотометр, обеспечивающий измерение при длине волны 280 нм, укомплектованный кварцевыми кюветами; весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более 0,01, а также 0,001 г; рН-метр; марля; пластиковая емкость; ледяная баня; сорбент сефадекс G-200; центрифуга, пластиковые пробирки для центрифугирования объемом 15 мл; стеклянные палочки, стаканы; чашки Петри; колбы мерные объемом 100 и 200 мл; дистиллированная вода; 0,05 М Трис-НСl рН 6,5 с 0,3 М KCl; 1 М раствор соляной кислоты (НСl); мерные цилиндры; стеклянная колонка (40×1,2 см); конические колбы, автоматические и стеклянные пипетки.

Ход работы

Гель сефадекс G-200 массой 1 г помещают в коническую колбу на 200 мл и добавляют 120 мл буферного раствора Трис-НСl. Суспензию оставляют для набухания в течение 12 ч при комнатной температуре. В течение всего

хода работы выделяемый белок необходимо держать на холоду (ледяной бане).

Охлажденную куриную грудку массой 10 г помещают в пластиковую емкость и измельчают в блендере. Взвешивают 2,5 г измельченной пробы и переносят в стеклянный стаканчик, который помещают в ледяную баню, заливают пробу 25 мл буферного раствора, размешивают стеклянной палочкой, оставляют для экстракции миозина на 10 мин, периодически перемешивая.

Полученный экстракт отделяют от мышечной ткани на охлажденной влажной марле, сложенной в 4–6 слоев, и отжимают. Марлю для отделения грубого экстракта от мышечной ткани предварительно смачивают в буферном растворе и выдерживают в холодильнике в течение 30 мин.

Экстракт миозина помещают в пластиковые пробирки, уравнивают так, чтобы их масса не отличалась друг от друга на более чем 0,02 г, подвергают центрифугированию при скорости 6000 об/мин в течение 15 мин [1].

Супернатант отделяют от осадка, определяют его точный объем, одну его часть смешивают с глицерином в соотношении 9 : 1 и замораживают в пластиковых пробирках. Вторую часть (1 мл) подвергают дальнейшей очистке с помощью гель-хроматографии. Набивку колонки осуществляют суспензией сорбента сефадекс G-200, при этом избегают высокого гидростатического давления. Уравнивание проводят буферным раствором в течение 30 мин со скоростью 0,3 мл/мин [4, 5].

Образец супернатанта объемом 1 мл вносят автоматической пипеткой в колонку с сорбентом. Для этого жидкость с поверхности наполнителя осторожно удаляют, оставляя слой в 1–2 мм; при помощи пипетки осторожно вносят образец и, открыв нижний кран, дают ему впитаться; остатки образца над сорбентом смывают небольшой порцией элюента (буферным раствором); после того как он впитается поверхностью наполнителя, добавляют новые порции элюирующего раствора, создавая слой в 5–10 см. После нанесения образца колонку соединяют с верхним резервуаром, наполненным буферным раствором, устанавливают скорость протекания элюирующего раствора 0,3 мл/мин путем изменения гидростатического давления и начинают сбор фракций по 3 мл каждая с помощью коллектора. Собирать фракции элюата необходимо с момента нанесения образца на колонку. После окончания элюирования, которое длится, как правило, в течение 3,5 ч, измеряют оптическое поглощение собранных фракций на спектрофотометре при 280 нм.

Многократное использование колонки с сефадексом приводит к замедлению протекания жидкости через нее. В этом случае гель извлекают из колонки, отмучивают его от мелких частиц и колонку набивают заново. Сефадексы можно хранить в виде суспензии или в сухом виде. Суспензию сефадекса следует хранить в холодильнике в присутствии антисептиков: 0,02%-ного азида натрия или хлороформа. Для перевода геля в сухое состояние сефадекс сначала промывают водой для удаления солей, а затем выдерживают несколько минут с 2-кратным объемом 50%-ного этанола; после фильтрования на воронке Бухнера сефадекс выдерживают с 2-кратным объемом 96%-ного

этанола. Обработку последним повторяют несколько раз. Осадок высушивают в термостате при 60–80°C [3].

По результатам измерений строят профиль элюирования – зависимость оптической плотности разделенных на колонке фракций (D , ед. абсорбции) от их объема (V , мл). Собирают фракции, обогащенные миозином, измеряют их точный объем и оптическую плотность при 280 нм, далее рассчитывают концентрацию раствора обогащенного миозина по закону Бугера – Ламберта – Бера.

$$C = \frac{D}{El},$$

где C – концентрация миозина в обогащенной фракции, г/мл; D – оптическая плотность испытуемого раствора; $E = 5,3 \cdot 10^2$ мл/см·г – удельный показатель поглощения чистого миозина при длине волны 280 нм; l – толщина поглощающего слоя (кюветы), см

Определяют концентрацию миозина в супернатанте и массу выделенного миозина по формулам:

$$C_1 = \frac{CV_2}{V_1}; \quad m = \frac{CV_2}{V_1} V_3$$

где C_1 – концентрация миозина в супернатанте, г/мл; m – масса миозина, г; C – концентрация миозина в обогащенной фракции, г/мл; V_2 – объем фракции миозина, мл; V_1 – объем супернатанта, внесенного в колонку, мл; V_3 – объем экстракта, полученного после центрифугирования, мл.

Рассчитывают выход миозина из куриной грудки:

$$w = \frac{m}{m_0} 100\%,$$

где m – масса миозина, г; m_0 – масса куриной грудки, г.

Делают вывод о зависимости молекулярной массы белков и очередности их выхода при разделении гель-хроматографией, а также степени извлечения белка миозина из куриной грудки.

Вопросы

1. Перечислите этапы выделения и очистки индивидуальных белков. Какие особенности белков следует при этом учитывать?
2. Для чего предназначена стадия гомогенизации биологического материала?
3. Расскажите, какие методы используют для выделения индивидуального белка из обогащенной фракции и на различиях каких физико-химических свойств белков они основаны.
4. Что такое хроматография? Каким образом осуществляется разделение смеси веществ на индивидуальные компоненты, чем обеспечивается эффективность разделения?

5. Приведите классификации хроматографических методов.
6. Объясните принципы гель-фильтрации, адсорбционной, ионообменной и аффинной хроматографии. Что служит неподвижной и подвижной фазами в каждом случае?
7. Объясните принципы спектрофотометрического метода количественного определения белка.
8. Что из себя представляет миозин, какова его биологическая значимость?

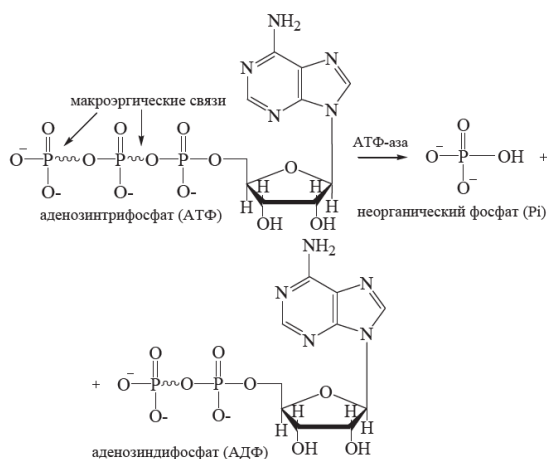
Лабораторная работа № 11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АТФ-АЗНОЙ АКТИВНОСТИ МИОЗИНА

Цель работы – определение кинетических параметров ферментативной реакции расщепления аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) миозином, выделенным из куриной грудки.

Миозин обладает АТФ-азной активностью, которая обусловлена способностью расщеплять аденозинтрифосфорную кислоту, таким образом, химическая энергия макроэргических связей АТФ превращается в механическую энергию мышечного сокращения. При этом АТФ является субстратом ферментативной реакции, она гидролизуются до аденозиндифосфорной кислоты (АДФ) и неорганического фосфата (Pi), которые являются продуктом реакции.

АТФ также является источником энергии для многих клеточных процессов в результате реакции расщепления, в которой АТФ теряет две концевые фосфорильные группы, что приводит к образованию неорганического пирофосфата ($H_2P_2O_6$), часто обозначаемого PP_i и аденозинмонофосфата (АМФ). В сократительной системе мышцы толстые нити (состоящие из молекул миозина) и тонкие нити (состоящие из G-актина) уложены параллельными рядами и представляют собой актомиозиновый комплекс. Сокращение скелетной мышцы происходит в присутствии в системе АТФ благодаря скольжению тонких нитей вдоль толстых, причем это скольжение индуцируется в присутствии других мышечных белков (тропонина и тропомиозина), а также ионов Ca^{2+} . АТФ-азную активность актомиозинового комплекса стимулируют ионы Mg^{2+} . Сигналом для сокращения мышц является электрический импульс, проходящий из двигательного нерва через нервномышечное соединение [1, 2, 7].



Удельная активность выражается числом единиц активности фермента, приходящихся на 1 мг белка. Молекулярная активность характеризуется числом молекул субстрата, которое подвергается превращению одной молекулой фермента за 1 мин. Когда известно количество активных центров в молекуле фермента, вводится понятие активности каталитического центра. Она характеризуется числом молекул субстрата, которое подвергается превращению за 1 мин при расчете на 1 каталитический центр.

Реактивы, материалы и оборудование: раствор миозина; бумага фильтровальная; холодильник; спектрофотометр, обеспечивающий измерение при длине волны 660 нм, укомплектованный стеклянными кюветами; весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более 0,01, а также 0,001 г; секундомер; рН-метр; лакмусовая бумага; ледяная баня; центрифуга; пробирки Эппендорфа; стеклянные палочки; мерные стаканы; пробирки; автоматические и стеклянные пипетки; колбы мерные вместимостью 50, 100, 200 мл; дистиллированная вода; моющая хромовая смесь; 0,05 М Трис-НСl рН 6,5 с 0,3 М KCl; 1 М раствор соляной кислоты (НСl); мерные цилиндры; конические колбы; градуировочные растворы калия фосфорнокислого однозамещенного (KH_2PO_4) с концентрацией 0,025, 0,050, 0,100, 0,125, 0,250 мкмоль/мл; 2%-ный раствор молибдата аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$), после приготовления раствор фильтруют); 6,75 мМ раствор хлорида олова (SnCl_2 , свежеприготовленный раствор фильтруют перед использованием); 1,2 М раствор гидроксида натрия (NaOH); 0,284 мкмоль/мл раствор натриевой соли аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ, раствор готовят в день использования); 1,42 мкмоль/мл раствор хлорида магния (MgCl_2); 10%-ный раствор трихлоруксусной кислоты (CCl_3COOH); 3 М натрий-ацетатный буфер рН 4,4; 1,7 М раствор хлорида калия (KCl).

В связи с тем, что молибденовая синь в растворе находится в коллоидном состоянии и легко адсорбируется поверхностно-активными веществами, посуду необходимо предварительно промыть моющей хромовой смесью.

В пробирки Эппендорфа последовательно добавляют по 270 мкл 1,7 М раствора KCl, рабочего раствора MgCl_2 (1,42 мкмоль/мл), рабочего раствора натриевой соли АТФ (0,284 мкмоль/мл), раствора миозина, выделенного из куриной грудки.

АТФ-азную активность определяют инкубированием раствора миозина с раствором АТФ в присутствии MgCl_2 на холоду. Реакцию останавливают добавлением 270 мкл 10%-ного раствора CCl_3COOH через следующие промежутки времени – 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 мин и последующей ее нейтрализацией путем добавления 135 мкл 1,2 М раствора NaOH. Значение рН контролируют с помощью лакмусовой бумаги. Выпавший в осадок белок отделяют центрифугированием при скорости 6000 об/мин в течение 15 мин. Параллельно готовят контрольную пробу, которая содержит по 270 мкл 1,7 М раствора KCl, рабочего раствора MgCl_2 (1,42 мкмоль/мл), рабочего раствора натриевой соли

АТФ (0,284 мкмоль/мл), буферного раствора Трис-НСl с рН 6,5, 10%-ного раствора CCl_3COOH и 135 мкл 1,2 М раствора NaOH.

К 1 мл надосадочной жидкости каждой пробы приливают дистиллированную воду до 1,6 мл, прибавляют 1,1 мл 3 М натрий-ацетатного буфера с рН 4,4. К каждой пробе последовательно с интервалом 1–1,5 мин добавляют по 0,1 мл 2%-ного раствора молибдата аммония и сразу же после интенсивного перемешивания 0,2 мл 6,75 мМ раствора хлористого олова. Окраска развивается в течение 15 мин при 20°C.

Аналогично поступают с контрольной пробой. Измеряют оптическую плотность каждого раствора при длине волны 660 нм в стеклянной кювете относительно контрольной пробы, используя спектрофотометр. По градуировочному графику находят концентрацию неорганического фосфата в каждой пробе.

Построение градуировочного графика. К 1 мл градуировочного раствора с концентрацией неорганического фосфата 0,025, 0,050, 0,100, 0,125, 0,250 мкмоль/мл приливают дистиллированную воду до 1,6 мл, прибавляют 1,1 мл 3 М натрий-ацетатного буфера с рН 4,4. К каждой пробе последовательно с интервалом 1–1,5 мин добавляют по 0,1 мл 2%-ного раствора молибдата аммония и сразу же после интенсивного перемешивания 0,2 мл 6,75 мМ раствора хлористого олова. Окраска развивается в течение 15 мин при 20°C. Измеряют оптическую плотность каждого раствора при длине волны 660 нм в стеклянной кювете относительно контрольного раствора, используя спектрофотометр.

Приготовление контрольного раствора. В пробирку вносят 1,6 мл дистиллированной воды, прибавляют 1,1 мл 3 М натрий-ацетатного буфера с рН 4,4, далее добавляют по 0,1 мл 2%-ного раствора молибдата аммония и сразу же после интенсивного перемешивания 0,2 мл 6,75 мМ раствора хлористого олова. По полученным данным строят градуировочный график, откладывая измеренные значения оптической плотности на оси ординат против соответствующих градуировочных растворов фосфата на оси абсцисс и проводя прямую линию через отложенные точки и начало ординат.

Определив концентрации неорганического фосфата в реакционной смеси, строят кинетическую кривую ферментативной реакции, откладывая измеренные значения концентраций неорганического фосфата на оси ординат против соответствующего временного промежутка реакции на оси абсцисс. Далее определяют скорость ферментативной реакции как тангенс угла наклона касательной к кривой в нулевой точке или по формуле

$$v_0 = \frac{p_2 - p_1}{t_2 - t_1},$$

где v_0 – скорость реакции, т. е. изменение концентрации неорганического фосфата за единицу времени, мкмоль/мл·мин; p_2 – концентрация неорганического фосфата в момент времени t_2 , мкмоль/мл; p_1 – концентрация неорганического

фосфата в момент времени t_1 , мкмоль/мл; t_2 – конечная точка отсчета времени реакции, мин; t_1 – начальная точка времени отсчета реакции, мин.

Определяют удельную активность фермента (A , мкмоль/мин·мг), т. е. скорость реакции на 1 мг белка, по формуле

$$A = \frac{v_0 V}{m},$$

где v_0 – скорость реакции, т. е. изменение концентрации неорганического фосфата за единицу времени, мкмоль/мл·мин; V – объем пробы, внесенной для реакции с молибденовокислым аммонием, мл (1 мл); m – количество миозина, внесенное в реакцию, найденное по формуле, мг:

$$m = \frac{C_1 V_{0,27}}{1000},$$

где C_1 – концентрация миозина в супернатанте, г/мл; $V_{0,27}$ – объем раствора белка, внесенного в реакционную смесь, мл; 1000 – пересчет граммов в миллиграммы.

Сопоставляют результаты с литературными данными и делают вывод об удельной активности миозина, выделенного из куриной грудки.

Вопросы

1. Что собой представляет механизм мышечного сокращения?
2. В чем суть определения неорганического фосфата по методу Ратбуна и Бетлах?
3. Что собой представляют ферменты и какими свойствами они обладают?
4. Приведите классификацию ферментов. Как образуются систематические названия ферментов?
5. Что собой представляет активный центр фермента? Какую функцию он выполняет?
6. Чем обусловлена специфичность ферментов? Перечислите виды специфичности, дайте им характеристику.
7. Что понимают под активностью фермента? В каких единицах ее выражают?
8. Чем обусловлено изменение активности фермента при изменении температуры и pH среды?
9. Что изучает ферментативная кинетика? Как измеряют скорость ферментативной реакции?
10. Перечислите основные факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции. Каков характер зависимости скорости ферментативной реакции от этих факторов?
11. При каких условиях достигается максимальная скорость ферментативной реакции? Какая модель описывает такую кинетику и в чем состоит ее суть?
12. Каков физический смысл константы Михаэлиса?

13. Какие методы применяют для линеаризации уравнения Михаэлиса – Ментен?

14. Объясните характер действия обратимых и необратимых ингибиторов на активность ферментов.

Лабораторная работа № 12 **МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО** **МАТЕРИАЛА**

Цель работы – освоение методов выделения липидов из растительного материала и их качественного анализа с помощью тонкослойной хроматографии; изучение жирнокислотного состава липидов методом газожидкостной хроматографии.

Липиды (от греч. *lipos* – жир) представляют собой группу соединений растительного, животного или микробного происхождения, практически нерастворимых в воде и хорошо растворимых в неполярных органических растворителях. Особое место среди липидов занимают сложные эфиры глицерина и жирных кислот (триацилглицерины), доля которых в составе липидов масличных культур и животных жиров часто превышает 95%. В зависимости от химического состава липиды можно разделить на две группы: простые и сложные. Простые липиды содержат только углерод, водород и кислород, а сложные – кроме того азот, фосфор или серу. К простым липидам относят прежде всего производные высших жирных кислот и спиртов. Это сложные эфиры высокомолекулярных одноатомных спиртов (воска), сложные эфиры двухатомных спиртов-диолов (диольные эфиры) и сложные эфиры трехатомного спирта глицерина (ацилглицерины, или глицериды). К сложным липидам относят смешанные сложные эфиры многоатомных спиртов не только с жирными кислотами, но и фосфорной (фосфолипиды) или серной (сульфолипиды) кислотой.

Широко используется и другая классификация липидов, в основу которой положено отношение липидов к действию щелочи. По этой классификации липиды делят на две большие группы: омыляемые и неомыляемые.

Реактивы, материалы и оборудование: семена льна масличного; оксид алюминия; гексан; изопропиловый спирт; физиологический раствор (0,85%-ный раствор NaCl); сульфат натрия (безводный); дистиллированная вода; ледяная уксусная кислота; диэтиловый эфир, йод кристаллический; маргариновая кислота; раствор 2%-ной серной кислоты в метаноле; шпатели; фильтровальная бумага; ступки; пипетки на 1, 2, 5 мл; автоматические пипетки на 200 и 1000 мкл; химически чистые пробирки; пробирки с пришлифованными стеклянными пробками; стеклянные воронки; штативы для пробирок; ампулы стеклянные; капилляр стеклянный; электронные весы; газовый хроматограф; шприцы для хроматографии; ротонный испаритель; пластины для ТСХ; камера для ТСХ.

1. Качественный анализ липидов методом тонкослойной хроматографии (эксперимент 1)

Методика. Небольшое количество (~0,5 г) семян льна масличного взвешивают, добавляют 1–2 мл смеси гексан + изопропиловый спирт (1 : 1 об.) и растирают в фарфоровой ступке с 0,5–1,0 г окиси алюминия (Al_2O_3) в течение 10 мин. Затем приливают еще 3 мл экстрагента и снова растирают содержимое на протяжении 1–2 мин. Полученную суспензию фильтруют через фильтровальную бумагу. Осадок на фильтре промывают 5 мл экстрагента, которым предварительно ополаскивают ступку и пестик. Для более полного удаления экстракта осадок на фильтре необходимо слегка (очень осторожно, чтобы не порвать фильтр) отжать. Затем экстракт липидов промывают физиологическим раствором (0,4 объема от объема липидного экстракта) для удаления нелипидных примесей. Смесь тщательно перемешивают встряхиванием.

После расслоения фаз верхнюю органическую фазу аккуратно при помощи пипетки переносят в отдельную пробирку и добавляют к ней 0,3–0,5 г безводного сульфата натрия до просветления экстракта. Полученный липидный экстракт сливают с осадка сульфата натрия в небольшую колбочку или пробирку с пришлифованной стеклянной пробкой (резиновые пробки использовать нельзя!) и хранят в холодильнике.

В качестве адсорбента используют пластины с мелкозернистым силикагелем. На слой адсорбента вблизи основания пластинки тонким капилляром наносят каплю образца (2–10 мкл). Предварительно отмечают на пластинке линию старта тонкозаточенным карандашом, не повреждая слой адсорбента, на расстоянии 1,5–2,0 см от основания пластинки. Расстояние между точками нанесения нескольких образцов должно быть не менее 1–2 см. Диаметр пятна не должен превышать 3 мм. Растворы наносят в виде круглых пятен или коротких узких полосок, осторожно прикасаясь капилляром к поверхности пластинки, и дают раствору впитаться в слой адсорбента.

В качестве элюента берут смесь гексан : диэтиловый эфир : уксусная кислота (80 : 20 : 1). Пластинку основанием вниз помещают в наклонном положении в герметически закрывающуюся стеклянную камеру, на дне которой находится элюент высотой 5–7 мм. Линия старта с нанесенными образцами должна находиться несколько выше уровня элюента в камере. Камеру закрывают стеклянной крышкой для лучшего насыщения ее парами элюента. Как только растворитель дойдет до линии фронта, отстоящей от верхнего края пластинки приблизительно на 5 мм, пластинку вынимают из камеры, отмечают карандашом линию фронта и высушивают на воздухе до полного испарения подвижной фазы.

Затем проводят проявление хроматограмм парами йода. Для этого на дно стеклянной камеры помещают несколько кристаллов йода и нагревают камеру на водяной бане при 60°C. Пластины для ее обработки опускают в камеру на 30–60 с при комнатной температуре. При полном разделении каждое пятно на пластинке соответствует индивидуальному веществу. Положение пятен на пластинке фиксируют с помощью карандаша, обводя по контуру. Положение

пятна разделенного вещества определяют посредством измерения величины его подвижности R_f (rate – скорость; fraction – фракция):

$$R_f = \frac{A}{B},$$

где R_f – подвижность вещества; A – расстояние, пройденное веществом от линии старта до середины пятна, см; B – расстояние, пройденное подвижной фазой от линии старта до линии фронта, см.

При разделении в указанном элюенте липиды от старта к финишу располагаются в следующей последовательности: фосфолипиды, гликолипиды, моноацилглицериды, диацилглицериды, стеролы, жирные кислоты, триацилглицериды.

2. Анализ жирно-кислотного состава липидов методом газожидкостной хроматографии (эксперимент 2)

Методика. Полученный липидный экстракт упаривают на роторном испарителе. От остатка отбирают навеску массой 50–70 мг, помещают в стеклянные ампулы, приливают 1 см³ раствора 2%-ной серной кислоты в метаноле с внутренним стандартом – маргариновой кислотой (C17 : 0; 1,35 мг/см³). Ампулы запаивают на газовой горелке, гидролиз триацилглицеридов с одновременным метилированием образующихся жирных кислот проводят при температуре $(80 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 4 ч. Затем ампулы охлаждают до комнатной температуры, вскрывают и экстрагируют метиловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) гексаном (0,5 см³). МЭЖК разделяют методом газовой хроматографии на хроматографе, оснащенный пламенно-ионизационным детектором и капиллярной колонкой HP-Innowax 0,25 мм×30 м×0,25 мкм (полиэтиленгликоль). Анализ проводят при скорости потока гелия через колонку 1,36 мл/мин; температуре инжектора – 250°C , детектора – 275°C , температуре колонки – 150°C (1 мин), затем температуру колонки повышают со скоростью $2,9^\circ\text{C}/\text{мин}$ до 250°C и выдерживают 3 мин. Объем анализируемой пробы – 1 мкл.

Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот производят по времени удерживания при разделении стандартных смесей этих веществ и оценивают в процентах от весового суммарного содержания по отношению к внутреннему стандарту.

Вопросы

1. Объясните принципы классификации липидов.
2. Какие биологические функции выполняют различные классы липидов?
3. Какие хроматографические методы применяются для качественного и количественного анализа липидов?
4. Объясните принцип метода газожидкостной хроматографии. Каким образом с помощью этого метода проводят качественный и количественный анализ липидов?
5. В чем состоят особенности ГЖХ-анализа триацилглицеринов? Запишите реакцию, лежащую в основе получения МЭЖК.

6. Объясните принцип метода тонкослойной хроматографии. Каким образом с помощью этого метода проводят качественный анализ липидов?

Лабораторная работа № 13

ВЫДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА

Цель работы – освоение методов выделения крахмала из картофеля и его качественного определения.

Реактивы, материалы и оборудование: клубни картофеля; марля; центрифуга; центрифужные пробирки на 50 мл; плитка электрическая, водяная баня; пластиковые емкости; 1%-ный раствор натрия хлорида (NaCl); 96%-ный этанол; раствор Люголя; фильтровальная бумага; дистиллированная вода; мерные колбы на 100 мл; стеклянные палочки; мерные цилиндры; стеклянные воронки, водоструйный насос, фильтр Шотта, круглодонная колба на 100 мл; стеклянные пробирки; стеклянные пипетки; насадка Вюрца; конические колбы на 250 мл; шпатели; весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более 0,01.

Картофель (2 клубня) очищают от кожуры, промывают холодной водой, вытирают фильтровальной бумагой и взвешивают. Клубни измельчают на мелкой терке в пластиковую емкость, далее добавляют 50 мл 1%-ного раствора NaCl. Полученную кашу перемешивают стеклянной палочкой в течение 15 мин и фильтруют через 2 слоя марли. К осадку приливают 30 мл 1%-ного раствора NaCl и полученную суспензию снова фильтруют. При этом в осадке находятся клеточные стенки, а в фильтрате – плохо растворимые белки, низкомолекулярные соединения и крахмальные зерна. Фильтраты объединяют и оставляют на некоторое время для осаждения зерен крахмала. Надосадочную жидкость сливают, а осадок промывают холодной водой 2–3 раза.

Осадок ресуспендируют в 20 мл 96%-ного этанола и помещают в пластиковые пробирки, уравнивают так, чтобы их масса не отличалась друг от друга на более чем на 0,02 г, подвергают центрифугированию при скорости 5000 об/мин в течение 10 мин. Осадок крахмала промывают 20–30 мл 96%-ного этанола и помещают на фильтр Шотта, соединенный с круглодонной колбой и водоструйным насосом через насадку Вюрца. Отфильтрованный крахмал высушивают и взвешивают. В пробирку с 0,5 мл дистиллированной воды вносят небольшое количество (на кончике шпателя) порошка выделенного крахмала. Пробирку с крахмалом нагревают на кипящей водяной бане до растворения крахмала, а затем содержимое пробирки охлаждают. Далее добавляют по несколько капель раствора Люголя и наблюдают за появлением характерного окрашивания.

Рассчитывают содержание крахмала (w, %) в клубнях картофеля в расчете на сухое вещество по формуле

$$w = \frac{m_1}{0,2m_0} 100\%,$$

где m_0 – масса сырого картофеля, г; 0,2 – коэффициент пересчета на массу сухих веществ картофеля, г; m_1 – масса сухого крахмала, г.

В соответствии с содержанием в картофеле крахмала делают вывод о его крахмалистости, а в соответствии с полученной окраской при реакции с йодом делают вывод о состоянии крахмального зерна картофеля.

Вопросы:

1. Что собой представляют моно-, олиго- и полисахариды?
2. Какие моносахариды относятся к альдозам, а какие – к кетозам? Приведите примеры.
3. Напишите реакции образования циклического полуацетала и циклического полукетала из D-глюкозы и D-фруктозы соответственно.
4. Чем обусловлено существование α - и β -изомеров моносахаридов? Какой углеродный атом циклических альдоз называется аномерным?
5. Приведите различные способы изображения циклических форм моносахаридов. Какая из этих конформаций термодинамически более устойчива и почему?
6. Напишите структурные формулы производных моносахаридов. Укажите их биохимические функции.
7. Какие функциональные группы моносахаридов принимают участие в формировании гликозидной связи и как ее обозначают? Напишите уравнение реакции.
8. Чем отличаются восстанавливающие олигосахариды от невосстанавливающих? Приведите примеры.
9. Какова роль в клетках резервных и структурных полисахаридов? Приведите примеры.
10. В чем состоят особенности выделения и анализа полисахаридов?

Лабораторная работа №14

ПОЛЯРИМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КРАХМАЛА В РИСЕ

Цель работы – изучить поляриметрический метод анализа углеводов и осуществить количественное определение крахмала в рисе.

Реактивы, материалы и оборудование: плитка электрическая; водяная баня, колбы мерные вместимостью 100 и 1000 мл; колбы конические; стеклянные воронки, фильтровальная бумага, дистиллированная вода; кофемолка электрическая; 1,124%-ный раствор соляной кислоты (HCl); 30%-ный раствор сульфата цинка ($ZnSO_4$); 15%-ный раствор железистосинеродистого калия ($K_4[Fe(CN)_6]$), диэтиловый эфир; шпатели, стеклянные палочки; поляриметр POLAMAT A, оснащенный кюветой длиной 2 дм; весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более 0,01; термометр.

Навеску риса массой 5 г перемалывают в кофемолке и помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл. В колбу наливают 25 мл 1,124%-ного раствора HCl и перемешивают содержимое легким встряхиванием, добиваясь полного смачивания риса. Затем, смывая частицы продукта со стенок, в колбу добавляют еще 25 мл раствора соляной кислоты. Мерную колбу при постоянном встряхивании содержимого погружают в кипящую водяную баню так, чтобы вода покрывала ее широкую часть. Необходимо следить, чтобы кипение воды в водяной бане не прекращалось из-за погружения колбы.

В течение 3 мин колбу с содержимым покачивают, не вынимая из водяной бани, затем выдерживают в водяной бане еще 12 мин без перемешивания содержимого. По истечении 15 мин колбу извлекают из водяной бани, а к ее содержимому приливают 20 мл холодной дистиллированной воды.

Охлаждают полученный раствор до температуры $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ путем помещения колбы в проточную воду. Белковые вещества в растворе осаждают, добавляя 1 мл 30%-ного раствора ZnSO_4 и после перемешивания 1 мл 15%-ного раствора $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ при энергичном встряхивании содержимого колбы. Пену, образующуюся в растворе после добавления осадителей, следует погасить 1–2 каплями диэтилового эфира. Объем раствора в колбе доводят до отметки на горловине колбы дистиллированной водой. Затем содержимое колбы тщательно перемешивают и фильтруют через сухой складчатый бумажный фильтр в сухую коническую колбу. Во избежание испарения раствора при фильтрации воронку накрывают стеклом. Первую мутную порцию фильтрата выливают из колбы. Вторую порцию фильтрата помещают в кювету и снимают показания на поляриметре POLAMAT A. Измерение проводят при 20°C . Производят расчет концентрации крахмала в растворе (C , г/100 мл) по формуле

$$C = \frac{100\alpha}{[\alpha]_D^{20} l},$$

где C – концентрация оптически активного вещества в растворе, г/100 мл; α – наблюдаемый угол поворота плоскости поляризации, град; $[\alpha]_D^{20}$ – удельное оптическое вращение, для крахмала в рисе 181,3 град; l – длина слоя раствора, дм.

Рассчитывают содержание крахмала в рисе (X , %) по формуле

$$X = \frac{CV}{m} 100\%,$$

где C – концентрация оптически активного вещества в растворе, г/100 мл; V – объем гидролизата, мл; m – масса навески риса, г.

Делают вывод о содержании крахмала в рисе и соответствии полученных результатов литературным данным.

Вопросы:

1. Назовите, какие стереоизомерные формы характерны для моносахаридов. Как определить принадлежность моносахаридов, содержащих два и более асимметрических атома углерода, к D- или L-ряду?
2. В чем состоит суть явления мутаротации?
3. Что такое эпимеры? Приведите примеры.
4. Объясните принцип работы поляриметра.
5. Что такое плоскость поляризации?
6. Что такое плоскополяризованный свет?
7. Что такое удельное оптическое вращение?
8. В чем состоит суть поляризметрического метода анализа углеводов?
9. От чего зависит угол оптического вращения?
10. Из чего состоит крахмал?
11. Назовите продукты гидролиза крахмала.

Лабораторная работа №15

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ВИТАМИНА С В ХВОЕ ЕЛИ

Цель работы – осуществить титриметрическое определение витамина С в верхней и нижней частях хвои кроны ели.

Реактивы, материалы и оборудование: хвоя ели нижней и верхней частей кроны; фарфоровые ступки; оксид алюминия (Al_2O_3), 2%-ный раствор соляной кислоты (HCl); фильтровальная бумага; стеклянные воронки, 0,001 н раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята; бюретки; конические колбы вместимостью 100 мл; пипетки; градуированные пробирки; весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более 0,01, а также 0,001 г.

Хвою в количестве 2 г тщательно растирают в фарфоровой ступке с 1 г оксида алюминия, добавляя порциями 2%-ный раствор соляной кислоты до консистенции густой сметаны в течение 10 мин. После этого приливают 3–5 мл 2%-ного раствора соляной кислоты, содержимое перемешивают и фильтруют через складчатый бумажный фильтр. Измеряют объем фильтрата, отбирают половину, разводят ее в 2 раза дистиллированной водой, помещают в коническую колбу и титруют из бюретки 0,001 н раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия до появления розовой окраски, сохраняющейся в течение 30 с. Одновременно проводят контрольный опыт для проверки восстанавливающих свойств растворов соляной кислоты, которая применялась для извлечения витамина С. Для этого отбирают объем 2%-ного раствора соляной кислоты, равный объему фильтрата, взятого для анализа, разводят его в 2 раза дистиллированной водой и титруют тем же раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания.

Полученную поправку (так называемую поправку на реактивы) вычитают из результатов титрования опытного раствора. Величина ее обычно составляет 0,05–0,10 мл.

Содержание витамина С в хвое верхней и нижней частей кроны ели рассчитывают по формулам

$$C_1 = \frac{0,088(A - A_0)V_1}{V_2 m}; \quad C_2 = \frac{0,005(A - A_0)V_1}{V_2 m},$$

где C_1 – содержание аскорбиновой кислоты, мг/г; 0,088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, мг; A – количество 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованного на титрование, мл; A_0 – количество 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, израсходованного на титрование контрольной пробы, мл; V_1 – общее количество экстракта, мл; V_2 – объем экстракта, взятый для титрования, мл; m – масса хвои, г; C_2 – содержание аскорбиновой кислоты, ммоль/г; 0,0005 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н раствора 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия, ммоль.

Полученные значения сравнивают с литературными данными, делают вывод о содержании витамина С в зависимости от освещенности кроны ели.

Вопросы:

1. Что собой представляют витамины? В чем заключается их функциональное значение?
2. По какому признаку классифицируют витамины?
3. Напишите структурную формулу витамина С и его окисленного производного. В каких биохимических процессах принимает участие витамин С?
4. Напишите структурные формулы жирорастворимых витаминов. Укажите их биохимические функции.
5. Какие жирные кислоты относятся к эссенциальным? Какова их биологическая роль?
6. Назовите, какие витамины существуют в нескольких формах. Какая из форм обладает биологической активностью? Напишите их формулы.
7. Каким витаминам присущи антиоксидантные свойства?
8. Объясните принципы методов количественного определения витамина С.
9. От чего зависит содержание витамина в хвое?

Лабораторная работа №16 ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ КОФЕИНА ИЗ ЛИСТЬЕВ ЗЕЛЕННОГО ЧАЯ

Реактивы, материалы и оборудование: листья черного чая; MgO; дистиллированная вода; 10%-ный раствор H₂SO₄; безводный Na₂SO₄; 5%-ный раствор NaOH; хлороформ; изопропиловый спирт; йод кристаллический; кофеин, субстанция-порошок; фильтровальная бумага; химические стаканы на 100 и 250 мл; мерный цилиндр на 25 мл; колба круглодонная на 100 мл; колба грушевидная на 50 мл; стеклянная воронка; стеклянные пипетки на 1 и 5 мл;

делительная воронка на 100 мл; обратный холодильник; шпатели; центры кипения; пластинки TLC Silica gel 60; стеклянные капилляры; технические весы; аналитические весы; pH-метр; электрическая плитка; хроматографическая камера; роторный испаритель.

К 5 г тонко измельченного чая приливают 25 мл дистиллированной воды и взвесь MgO (2,5 г MgO в 15 мл дистиллированной воды), перемешивают и кипятят 10–15 мин в колбе с обратным холодильником. Надосадочный раствор декантируют. Операцию повторяют еще два раза с новыми порциями дистиллированной воды по 15 мл.

Объединенную водную вытяжку подкисляют 10%-ным раствором H_2SO_4 до pH 3,0 и концентрируют на роторном испарителе при пониженном давлении до $\frac{1}{3}$ объема. Горячий раствор фильтруют через складчатый бумажный фильтр, затем 5 раз производят извлечение хлороформом. На каждую экстракцию затрачивают по 5 мл растворителя. Экстракцию проводят в делительной воронке. Объединенную хлороформную вытяжку промывают сначала 5 мл 5%-ного раствора NaOH , затем таким же количеством дистиллированной воды. Экстракт сушат безводным Na_2SO_4 . Хлороформ отгоняют на роторном испарителе при пониженном давлении. В остатке получают сырой кофеин, который перекристаллизовывают из 3–5 мл горячей дистиллированной воды.

Кофеин кристаллизуется в виде тонких белых шелковистых игл. Затем около 10 мг осадка растворяют в 0,5 мл хлороформа и проводят ТСХ-анализ кофеина. Принцип ТСХ представлен в лабораторной работе № 5. В качестве элюента используют смесь изопропиловый спирт : хлороформ в соотношении 1 : 1.

Идентификацию кофеина проводят на основании сравнения значения R_f анализируемого вещества со значением R_f стандартного вещества («свидетель» – кофеин, субстанция-порошок).

Вопросы:

1. Какие соединения называются алкалоидами?
2. Приведите классификации алкалоидов, опишите их биологические функции.
3. Приведите структуру кофеина, укажите природные источники.
4. Какие физико-химические методы применяют для качественного и количественного анализа алкалоидов?

Список использованной литературы

1. Химия биологически активных веществ. Лабораторный практикум: учеб.-метод. пособие для студентов специальности 1-48 02 01 «Биотехнология» специализации 1-48 02 01 02 «Технология ферментов, витаминов и продуктов брожения» /В. Н. Леонтьев, О. В. Стасевич, О. С. Игнатовец. – Минск:БГТУ, 2020. – 91 с.
2. Попова Л.М., Почкаева Е.И., Базарнова Ю.Г. Методические указания по организации и проведению лабораторных работ по дисциплине «Химия и синтез биологически активных веществ». – СПб. 2020. – 36 с.
3. Бакибаев А.А., Ляпунова М.В., Мальков В.С., Панышина С.Ю., Кущербая В.Р. Синтез биологически активных веществ и лекарственных соединений: учебное пособие. – Томск: Издательский Дом Томского государственного университета, 2019. – 49 с.
4. Химия биологически активных веществ: лаб. практикум /Е. В. Исаева, О. Н. Еременко; СибГУ им. М.Ф. Решетнева. – Красноярск, 2022. – 98 с.
5. Химия биологически активных веществ: учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ для студ. обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология / Г. Е. Степанцова – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2023 г.– 76 с.

Форма отчета

ОТЧЕТ

1. Уравнения основной и промежуточных реакций. Условия проведения реакции (температура, катализатор и т.п.).
2. Уравнения побочных реакций.
3. Свойства получаемого вещества (молекулярная масса, температура плавления, температура кипения, плотность).
4. Особенности получаемого вещества и побочных продуктов, которые необходимо учитывать при проведении синтеза.
5. Таблица характеристик исходных веществ, используемых в синтезе:

Название вещества	Молекулярная масса	T _{пл.} , °C	T _{кип.} , °C	Плотность, г/см ³	Количество продукта (моль, г, мл)

6. Расчеты реагентов и теоретического выхода целевого вещества.
7. Схемы используемых приборов.
8. Ход получения препарата, объяснение результатов занести в таблицу:
9. Практические константы полученного вещества, выход препарата в граммах и в процентах от теоретического.
10. Вывод.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие.	3
Правила работы и техника безопасности	4
<i>Лабораторная работа № 1.</i>	
Синтез нитробензола	9
<i>Лабораторная работа № 2.</i>	
Синтез <i>o</i> -, <i>p</i> -нитрохлорбензола.	11
<i>Лабораторная работа № 3.</i>	
Синтез анилина.	12
<i>Лабораторная работа № 4.</i>	
Выделение абиегиновой кислоты из талловой канифоли.	14
<i>Лабораторная работа № 5.</i>	
Синтез 1,3- и 1,6-динитрокарбазола	18
<i>Лабораторная работа № 6</i>	
Синтез 1,3- и 1,6-диаминокарбазола	19
<i>Лабораторная работа № 7</i>	
Дiazотирование диаминокарбазолов	21
<i>Лабораторная работа № 8.</i>	
Синтез бензилиденбисмочевина	22
<i>Лабораторная работа № 9.</i>	
Синтез аллантаина	23
<i>Лабораторная работа № 10</i>	
Выделение и количественное определение миозина.	24
<i>Лабораторная работа № 11</i>	
Определение АТФ-азной активности миозина	27
<i>Лабораторная работа № 12</i>	
Методы выделения липидов из биологического материала.	31
<i>Лабораторная работа № 13</i>	
Выделение углеводов из растительного материала.	34
<i>Лабораторная работа № 14</i>	
Поляриметрическое определение крахмала в рисе.	35
<i>Лабораторная работа № 15</i>	
Анализ содержания витамина с в хвое ели.	37
<i>Лабораторная работа № 16</i>	
Выделение и идентификация кофеина из листьев зеленого чая . .	38
Список использованной литературы	40
Приложение.	41