

ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

А.Г. Шлейкин, Н.Н. Скворцова, А.Н. Бландов

# **БИОХИМИЯ. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ**

## **Часть 3. Углеводы. Липиды**

**Учебное пособие**

 УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Санкт-Петербург

2015

УДК 633.1+633.85

ББК 28.072

Ш 68

**Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н.** Биохимия. Лабораторный практикум. Часть 3. Углеводы. Липиды: Учеб. пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2015. – 64 с.

Даны краткие теоретические сведения о составе и биологических функциях углеводов и липидов. Изложены методы использования тонкослойной хроматографии для фракционирования углеводов и липидов.

Рекомендуется в качестве руководства для самостоятельной работы студентов бакалавриата и магистратуры всех форм обучения по направлениям: 19.03.01; 19.04.01 Биотехнология; 19.03.02; 19.04.02 Продукты питания из растительного сырья; 19.03.03; 19.04.03 Продукты питания животного происхождения; 18.03.02; 18.04.02 Энерго- и ресурсосберегающие процессы в химической технологии, нефтехимии и биотехнологии по дисциплинам «Биохимия»; «Основы биохимии и молекулярной биологии»; «Энзимология»; «Химия природных органических веществ»; «Биоконверсия пищевых веществ» и др.

**Рецензенты: кафедра биохимии Санкт-Петербургского государственного университета (доктор биол. наук, проф. Н.Д. Ещенко); доктор техн. наук, проф., зав. кафедрой Л.А. Забодалова (Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики)**

**Рекомендовано к печати редакционно-издательским советом Института холода и биотехнологий**



**Университет ИТМО** – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 – 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2015

© Шлейкин А.Г., Скворцова Н.Н., Бландов А.Н., 2015

# 1. УГЛЕВОДЫ

## 1.1. Биологические функции и классификация углеводов

**Углеводы** – самые распространенные в природе органические соединения. Они являются главной составной частью большинства продуктов растительного происхождения и входят в состав тканей животных. Углеводы в больших количествах накапливаются в растительных тканях, как правило, в виде полисахаридов. Растительные полисахариды являются основным источником моносахаридов, которые подвергаются далее химической или микробиологической переработке с получением широкого спектра производных.

Углеводы выполняют в организме важные функции. Среди них:

– **энергетическая**. При окислении 1 г углеводов выделяется 17 кДж энергии (4,1 ккал). В качестве основного энергетического источника используется свободная глюкоза или запасы углеводов в виде гликогена;

– **структурная**. Углеводы (рибоза, дезоксирибоза) входят в состав некоторых ферментов и используются для построения нуклеиновых кислот. Отдельные углеводы являются компонентами клеточных мембран. Производные глюкозы (глюкуроновая кислота, глюкозамин и т. д.) входят в состав полисахаридов и сложных белков хрящевой и соединительной тканей;

– **защитная**. Углеводные компоненты входят в состав иммуноглобулинов и участвуют в поддержании иммунитета. Гетерополисахариды находятся в веществах, покрывающих поверхность сосудов, бронхов, пищеварительного тракта, и защищают от проникновения бактерий, вирусов, а также от механических повреждений;

– **резервная**. В животных организмах углеводы запасаются в скелетных мышцах, печени и других тканях в виде гликогена. Крахмал является запасующим полисахаридом растений;

– **регуляторная**. Клетчатка пищи не расщепляется в кишечнике, но активизирует перистальтику кишечника, а также ферменты пищеварительного тракта, способствующие усвоению питательных веществ.

Классификация углеводов основана на их структуре: в зависимости от сложности молекулы их можно разделить на *моносахариды* и их производные, *олигосахариды* и *полисахариды*.

### 1.1.1. Моносахариды

Моносахариды содержат альдегидную или кетонную группы и несколько спиртовых гидроксильных групп. По числу атомов углерода различают низшие моносахариды (триозы и тетразы; они содержат в цепи соответственно 3 и 4 атома углерода), обычные (пентозы и гексозы) и высшие (гептозы, октозы, нонозы).

Стереохимия моносахаридов хорошо иллюстрируется проекционными формулами Фишера, в которых группа OH располагается справа от вертикальной черты, обозначающей углеродную цепь, если соответствующий асимметрический центр имеет D-конфигурацию, и слева, если он имеет L-конфигурацию. Общее число изомерных альдоз равно  $2^n$ , где  $n$  – число асимметрических атомов углерода в молекуле.

Строение важнейших представителей моносахаридов показано на рис. 1:

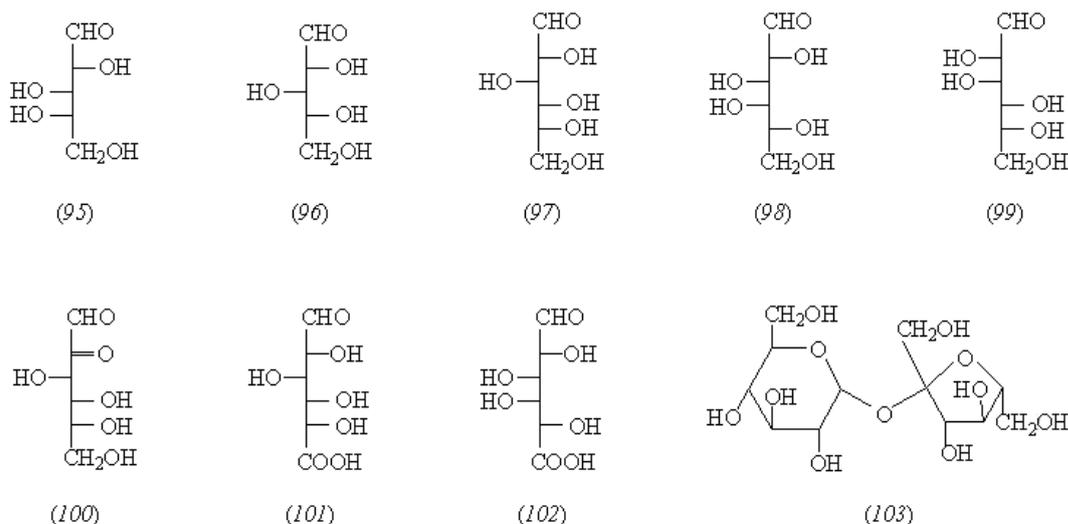


Рис. 1. Строение наиболее распространенных низкомолекулярных углеводов:  
 95 – L-арабиноза; 96 – D-ксилоза; 97 – D-глюкоза; 98 – D-галактоза;  
 99 – D-манноза; 100 – D-фруктоза; 101 – D-глюкуроновая кислота;  
 102 – D-галактуоновая кислота; 103 – сахароза

В растворе каждый моносахарид находится в виде смеси таутомеров. В большинстве случаев преобладают циклические пиранозные формы, а ациклические присутствуют в следовых количествах. В кристаллическом состоянии моносахариды, как правило,

представлены одной из пиранозных форм ( $\alpha$  или  $\beta$ ). Растворение кристаллов сопровождается таутомерными превращениями, за протеканием которых можно следить по изменению во времени величины оптического вращения. Это явление называется *мутаротацией*.

### 1.1.2. Функциональные производные моносахаридов

Производные моносахаридов, которые содержат другие функциональные группы или атом Н вместо одной или нескольких гидроксильных групп. Известно несколько групп моносахаридов, отличающихся набором функциональных групп или структурой углеродной цепи. К ним относятся:

– **дезоксисахара** (одна или несколько групп ОН замещены на атомы Н);

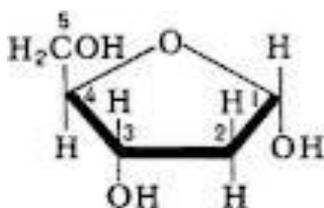
– **аминосахара** (одна или несколько групп ОН замещены на аминогруппы);

– **уроновые кислоты** (группа  $\text{CH}_2\text{OH}$  окислена в карбоксильную);

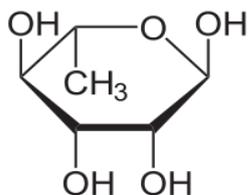
– **гликозиды** (гликозидный гидроксил замещен на остатки спиртов – О-гликозид или аминов – N-гликозид).

#### *Дезоксисахара*

**2-Дезоксирибоза** входит в состав ДНК:

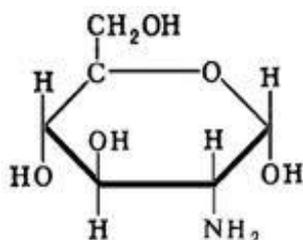


**Рамноза** (6-дезоксиманноза) входит в состав гетерополисахаридов, например, камедей:



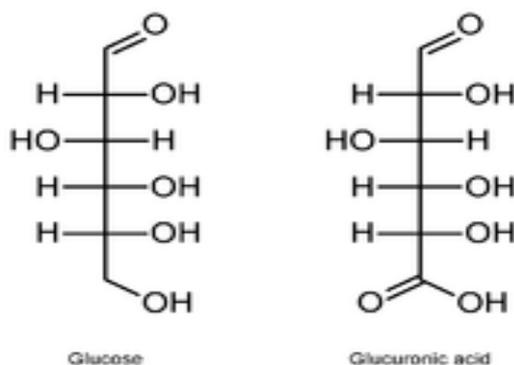
### *Аминосакхара*

**Глюкозамин** (2-амино-глюкоза) – вещество, вырабатываемое хрящевой тканью суставов, служит необходимым строительным компонентом и входит в состав важных для сустава веществ:



### *Уроновые кислоты*

**Моносахариды** (альдозы), молекулы которых вместо первичной спиртовой группы содержат карбоксильную группу:

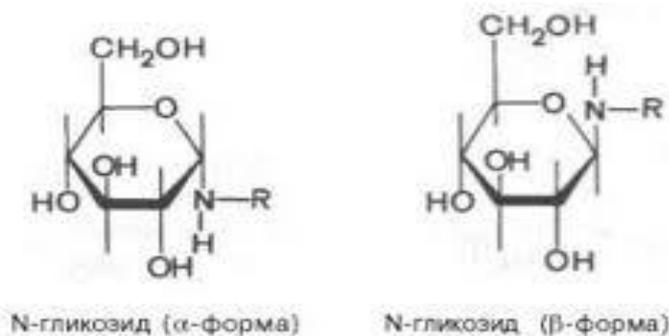


Названия уроновых кислот производят от названия соответствующих альдоз путем прибавления к корню окончания «уроновая кислота» (например, глюкоза – глюкуроновая кислота). Входят в состав биополимеров растительного и животного происхождения.

### *O- и N- гликозиды*

Полуацетальный гидроксил отличается большей реакционной способностью и может замещаться другими группировками в реакциях со спиртами, фенолами, карбоновыми кислотами, аминами.

Продукт реакции называют **O-гликозидом**, если связь осуществляется через кислород. Природные O-гликозиды, большинство из которых образуется в результате жизнедеятельности растений, существуют преимущественно в  $\beta$ -форме.

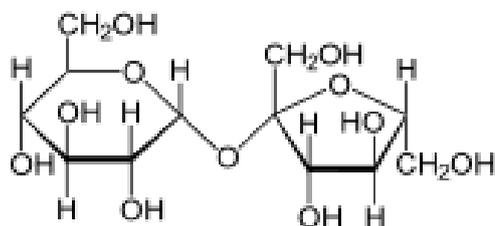


**N-гликозиды** рассматривают как производные моносахаридов, у которых гликозидная часть молекулы связана через атом азота с радикалом органического соединения R, не являющегося углеводом.

### 1.1.3. Олигосахариды

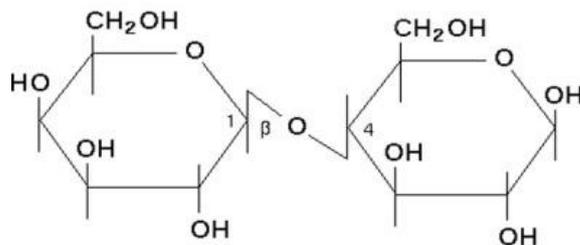
Молекулы данных веществ состоят из нескольких (двух или трех) простых составляющих. Наиболее распространены дисахариды. К этой группе относятся: сахароза, мальтоза, лактоза, изомальтулоза, лактулоза.

**Сахароза** (α-D-глюкопиранозил-β-D-фруктофуранозид) – нередуцирующий дисахарид, состоящий из остатков глюкозы и фруктозы, соединенных 1,2-гликозидной связью:

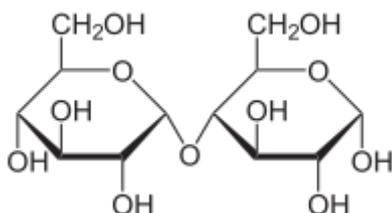


Сахароза выделяется из сахарного тростника и сахарной свеклы в промышленных масштабах в очень больших количествах.

**Лактоза** (4-β-D-галактопиранозил-D-глюкопираноза) – это второй по популярности представитель дисахаридов, состоящий из глюкозы и галактозы. Является основным дисахаридом молока (молочный сахар):



**Мальтоза** (4- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-D-глюкопираноза) – солодовый сахар, продукт частичного гидролиза крахмала:



**Лактулоза** (4- $\beta$ -D-галактопиранозил-D-фруктофураноза) – неприродный дисахарид, состоящий из остатков молекул галактозы и фруктозы, синтетический стереоизомер молочного сахара – лактозы.

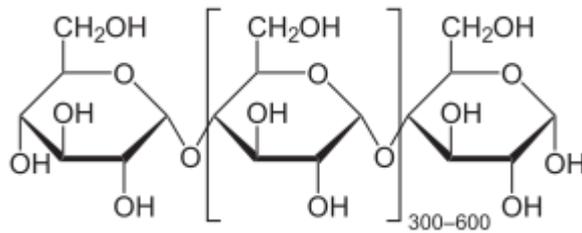
**Изомальтулоза** (6- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-D-фруктофураноза) – дисахарид, состоящий из остатков глюкозы и фруктозы, соединенных  $\alpha$ -1,6-гликозидной связью. По своему химическому составу изомальтулоза состоит из тех же основных структурных фрагментов, что и сахароза. В природе изомальтулоза встречается в составе таких объектов, как пчелиный мед (до 0,7–1 %), сахарный тростник и др.

Лактулоза и изомальтулоза широко используются как пищевые добавки при создании функциональных продуктов. Относятся к числу самых известных **пребиотиков** – неусваиваемых компонентов пищи, способных благоприятно влиять на здоровье человека путем селективной стимуляции роста и активности одного или нескольких родов полезных бактерий.

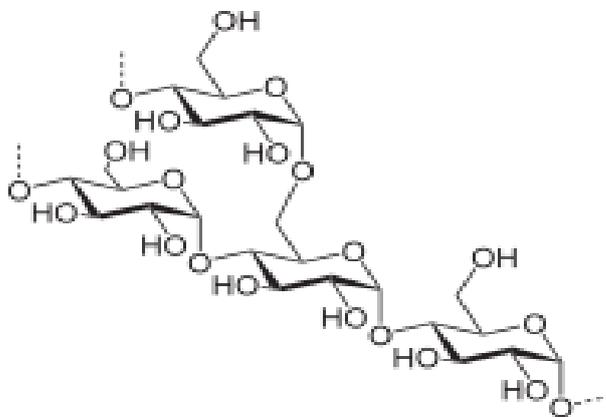
#### 1.1.4. Полисахариды

**Крахмал** является запасующим полисахаридом растительных клеток. Состоит из двух полисахаридов – *амилозы* и *амилопектина*, элементарным звеном в которых является остаток  $\alpha$ -D-глюкопиранозы.

Амилоза представляет собой линейный полисахарид, остатки глюкозы которого соединены друг с другом  $\alpha$ -1,4-гликозидной связью. В зависимости от вида растения молекулярная масса амилозы составляет  $1,5-5 \cdot 10^5$  Да.



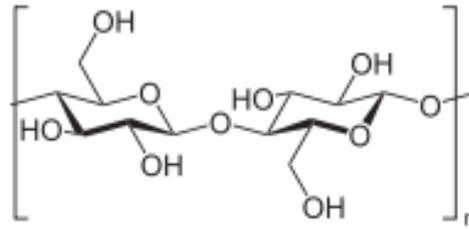
Амилопектин является разветвленным полисахаридом, у которого имеются достаточно длинные и тоже разветвленные боковые цепи, присоединенные к основной цепи  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6- гликозидными связями. Молекулярная масса амилопектина составляет  $10^6$ – $10^9$  Да.



Крахмал и его производные широко используются для пищевых целей в качестве углеводных продуктов, студнеобразователей, загустителей, эмульгаторов. Как основной вид сырья крахмал применяется в производстве этанола и других продуктов микробиологической переработки. Крахмал и его модификации нашли широкое применение и в технических целях.

В качестве сырья для производства крахмала используются клубнеплоды (картофель, батат, маниока) и зерновые культуры (кукуруза, рис, пшеница, сорго).

**Целлюлоза** – наиболее распространенное вещество в живой природе. Является структурным компонентом всех растительных клеток. Целлюлоза представляет собой линейный полисахарид, цепь которого построена из звеньев  $\beta$ -D-глюкопиранозы, соединенных  $\beta$ -1,4-гликозидными связями:

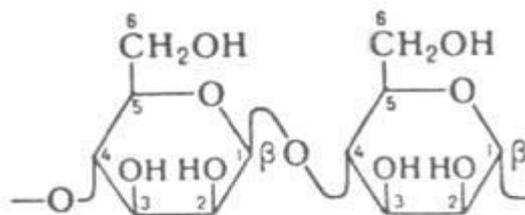


Мономерным звеном в макромолекуле является остаток **целлобиозы**.

Широко используется в различных сферах производства, основное направление ее применения – производство бумажных и текстильных изделий.

**Гемицеллюлозы** – нецеллюлозные полисахариды, являющиеся структурными компонентами клеточной стенки растений.

Макромолекулы гемицеллюлоз разветвлены и построены из пентоз (ксилозы, арабинозы) или гексоз (маннозы, галактозы, фруктозы); степень полимеризации составляет 50–300; молекулярная масса значительно меньше, чем у целлюлозы. По доминирующему в структуре моносахариду гемицеллюлозы можно подразделить на три подгруппы – **ксиланы**, **маннаны** и **галактаны**.



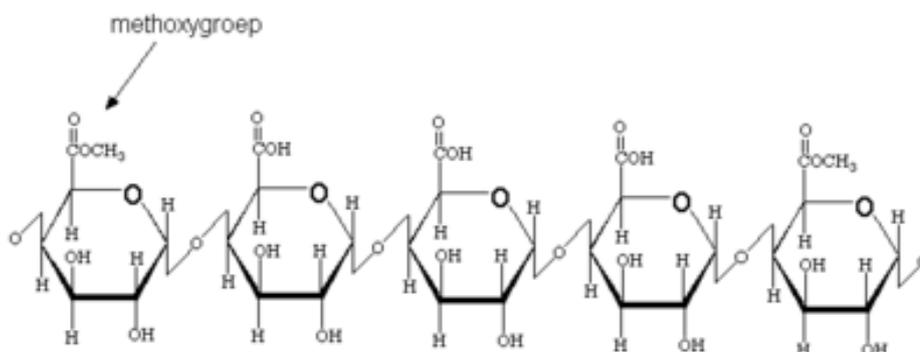
Участок линейного  $\beta$ -1  $\rightarrow$  4-маннана

В состав отдельных растений входит, как правило, несколько различающихся по строению гемицеллюлоз. Наиболее распространены в растениях ксиланы.

**Пектиновые вещества** осуществляют в растениях структурную и ионообменную функции, регулируют водный обмен, участвуют в процессах роста и растяжения растительных клеток.

Пектиновые вещества по химической природе являются кислыми полисахаридами и включают три структурные единицы: **пек-**

**тин, галактан, арабинан.** Основой пектиновых веществ является молекулярная цепь, состоящая из остатков D-галактуроновой кислоты, соединенных 1,4- $\alpha$ -гликозидной связью (галактан). Пектины из разных растительных источников обладают отличающейся степенью этерификации карбоксильных групп:

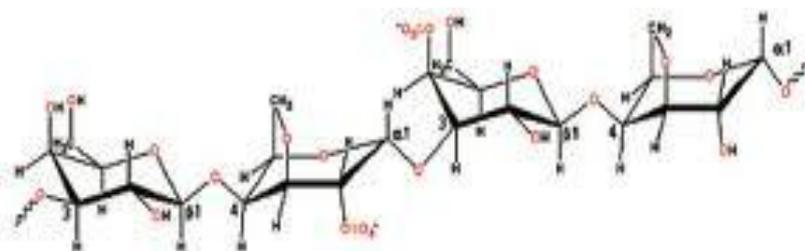


Пектиновые вещества являются природными ионообменными материалами. Емкость нерастворимых пектиновых ионообменников может достигать 7–10 мг-экв /г. Это определяет их функциональное свойство как компонента пищи – способность к выведению из организма ксенобиотиков – тяжёлых металлов и радионуклидов.

Способность пектиновых веществ образовывать студни определяет широкое использование их в пищевой промышленности в качестве студнеобразователя.

Все пектины в зависимости от их свойств можно условно разделить на две группы: пектины-студнеобразователи (цитрусовый, яблочный) и пектины-комплексообразователи (свекловичный, подсолнечный), что определяет области их использования в пищевой и фармацевтической промышленности.

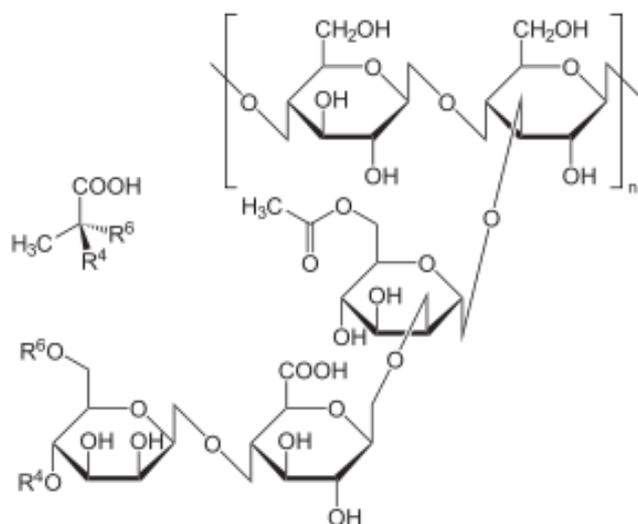
**Каррагинаны** – линейные полисахариды, состоящие из сульфатных эфиров галактозы:



Это природные загустители, желеобразующие компоненты и стабилизаторы консистенций. Широко применяются в пищевой промышленности.

**Камеди (гумми)** – это растительные полимеры моносахаридов глюкозы, галактозы, арабинозы, рамнозы, глюкуроновых кислот. К камедям относят также полисахариды микроорганизмов, в частности, накапливаемые в культуральной жидкости производные, получаемые модификацией полисахаридов природного происхождения (например, целлюлозы, крахмала).

Например, ксантановая камедь по химической природе представляет собой полисахарид, полученный путем ферментации с использованием бактерии *Xanthomonas campestris*. Главная цепь полимера идентична молекуле целлюлозы. Ответвления представляют собой остатки молекул глюкозы, маннозы, глюкуроновой кислоты, а также пируватные (пировиноградные) и ацетильные группы:

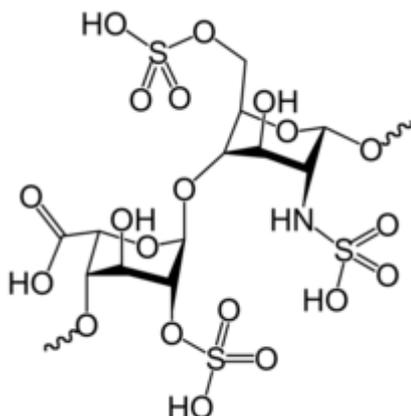


Ксантановая камедь используется в пищевых системах в качестве загустителей, желеобразователей и стабилизаторов.

Камеди являются главным компонентом сока, выделяемого растениями при механических повреждениях коры.

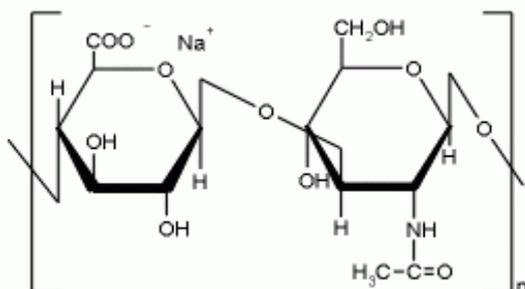
Наиболее известные разновидности камеди: гуммиарабик, агар-агар, альгиновые кислоты, ксантан, трагакант.

**Гепарин** впервые выделен из печени животных. Представляет собой кислый серосодержащий гликозаминогликан:



В клинической практике известен как вещество, препятствующее свёртыванию крови (антикоагулянт).

**Гиалуроновая кислота** представляет собой несulfированный гликозаминогликан:



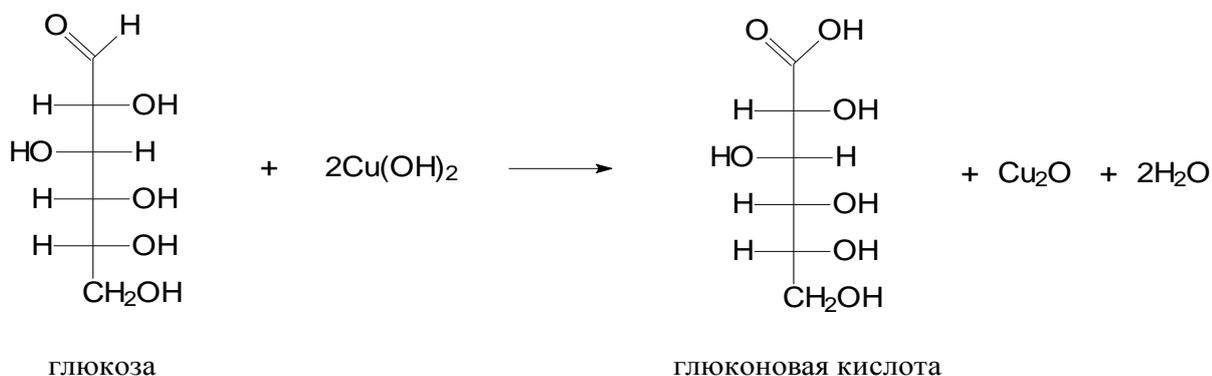
Является одним из основных компонентов внеклеточного матрикса, содержится во многих биологических жидкостях (слюне, синовиальной жидкости и др.). Входит в состав соединительной, эпителиальной и нервной тканей.

## 1.2. Качественные реакции на углеводы

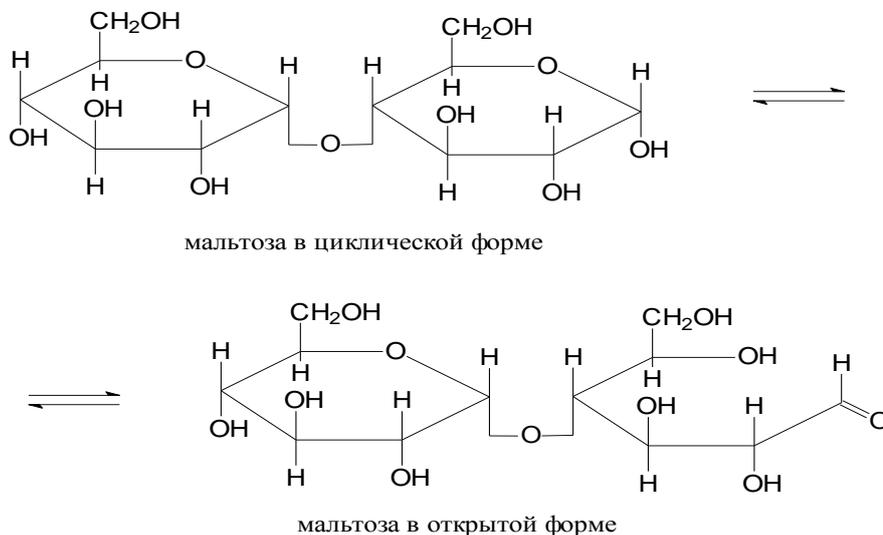
Углеводы дают ряд цветных реакций, с помощью которых осуществляют качественные и количественные определения моно-, ди- и полисахаридов в продуктах растительного и животного происхождения.

### 1.2.1. Качественная реакция на альдозы

Глюкоза, а также восстанавливающие дисахариды – мальтоза и лактоза – в щелочной среде превращают гидроксид меди (II) в оксид меди (I) за счет восстановительных свойств альдегидной группы:



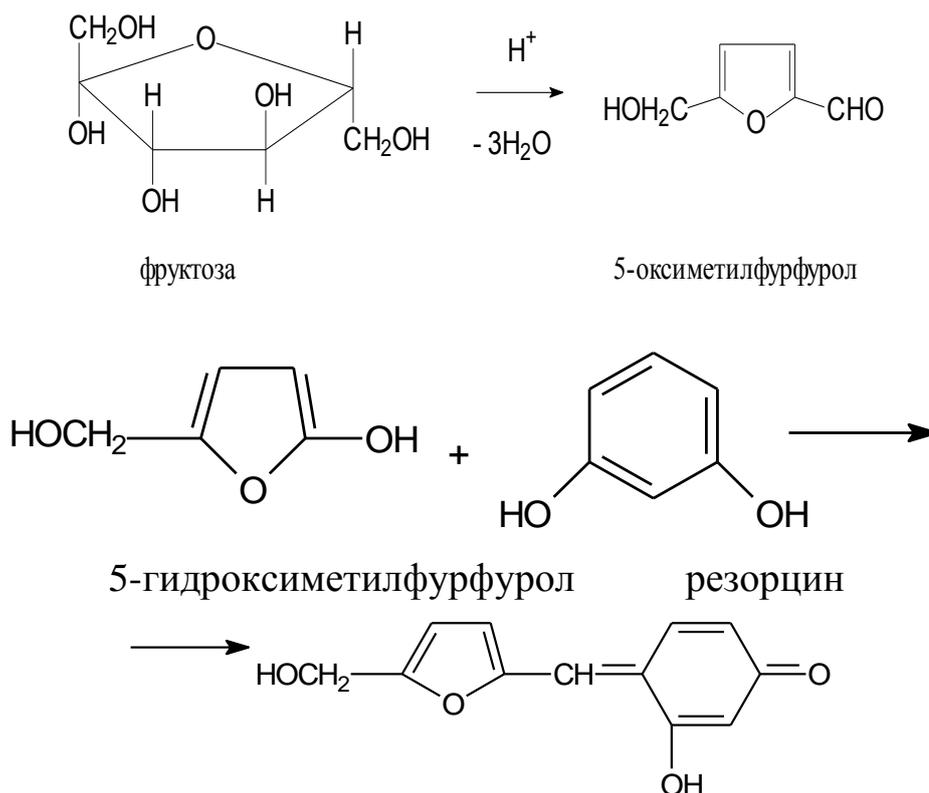
Восстановительные свойства мальтозы и лактозы объясняются обратимым раскрытием циклической формы с образованием свободной альдегидной группы, которая и восстанавливает гидроксид меди:



**Ход определения.** К 1 мл раствора глюкозы, мальтозы или лактозы прибавляют равный объем 10 %-го раствора гидроксида натрия, а затем 0,5 мл 1 %-го раствора сульфата меди. Получившуюся смесь нагревают до кипения. При этом образуется осадок оксида меди (I) красного цвета.

### 1.2.2. Качественная реакция на кетозы

Реакция Селиванова – это реакция на фруктозу и другие кетозы, основанная на образовании из них при нагревании с соляной кислотой 5-гидроксиметилфурфуrolа, который затем образует в реакции с резорцином или  $\alpha$ -нафтолом окрашенный продукт конденсации:



**Ход определения.** В пробирку наливают 1–2 мл реактива Селиванова (0,05 г раствора резорцина в 100 мл 20 %-го раствора соляной кислоты), добавляют 2–3 капли раствора фруктозы и нагревают в течение 2 мин в кипящей водяной бане. Наблюдают окрашивание раствора в красный цвет.

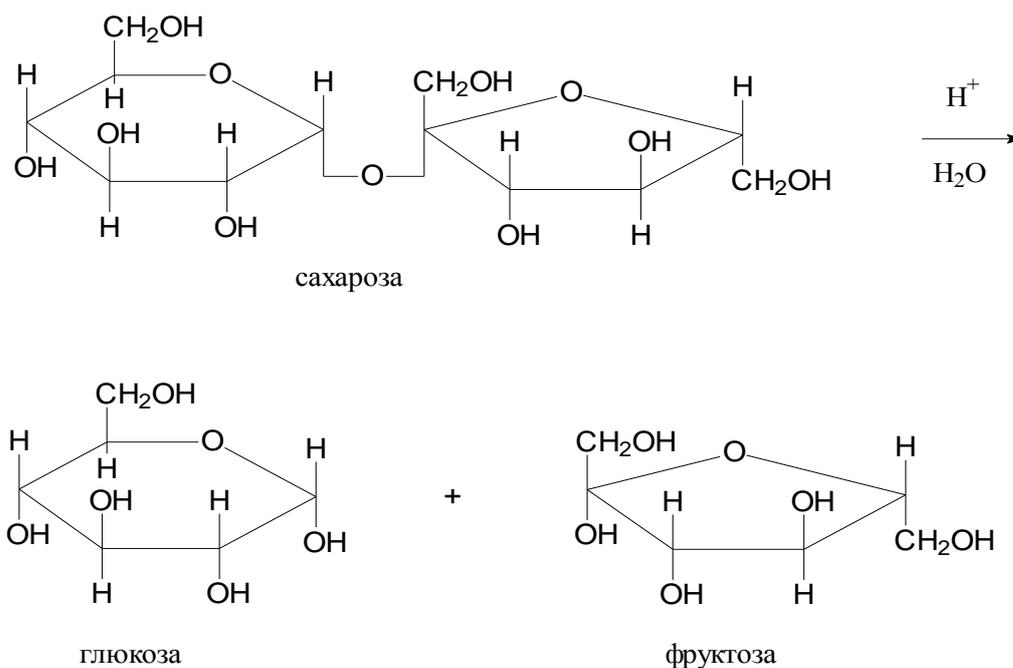
### 1.2.3. Реакции на дисахариды

#### *Качественная реакция на сахарозу*

Сахароза в щелочной среде с сульфатом кобальта дает комплекс, окрашенный в фиолетовый цвет.

**Ход определения.** В пробирку наливают 2 мл 1 %-го раствора сахарозы, приливают несколько капель раствора сульфата кобальта. При добавлении избытка раствора щелочи (1 мл) жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

### Гидролиз сахарозы



**Ход определения.** К 1 мл раствора сахарозы прибавляют равный объем раствора гидроксида натрия, а затем раствор сульфата меди. Получившийся раствор нагревают до кипения. При этом образуется черный осадок оксида меди, так как сахароза – невосстанавливающий дисахарид и в ее присутствии гидроксид меди не восстанавливается, а разлагается на оксид меди (II) и воду.

Затем к 1 мл раствора сахарозы добавляют 10 капель 10 %-го раствора соляной кислоты и кипятят в течение 3 мин. Далее повторяют реакцию с гидроксидом натрия и сульфатом меди. При этом образуется красный осадок оксида меди (I), так как при гидролизе сахарозы образовалась глюкоза, обладающая свойствами восстановителя.

#### 1.2.4. Качественная реакция на полисахариды

Крахмал и гликоген с раствором Люголя (раствор йода в водном растворе йодида калия) дают окрашенные комплексные соединения: крахмал – синее, гликоген – красно-бурое. Гидролитический фермент слюны  $\alpha$ -амилаза катализирует реакцию гидролиза  $\alpha$ -гликозидной связи крахмала. Расщепление крахмала идет через стадии образования полисахаридов с меньшей молекулярной массой, называемых декстринами:

Крахмал → Амилодекстрины → Эритродекстрины →  
→ Ахродекстрины → Мальтоза

Декстрины дают с раствором йода различное окрашивание: близкие к крахмалу по молекулярной массе амилодекстрины дают сине-фиолетовое окрашивание, эритродекстрины – красно-бурое, ахродекстрины и мальтоза вообще не дают окрашивания.

**Ход определения.** В пробирку наливают 2–3 мл 1 %-го раствора крахмала и добавляют 1–2 капли раствора Люголя. Жидкость окрашивается в синий цвет. При нагревании раствор обесцвечивается, так как комплекс неустойчив, а при охлаждении окраска появляется вновь.

Затем в пробирку наливают 5 мл 1 %-го раствора крахмала и около 2 мл разбавленной в 10–20 раз слюны. Содержимое пробирок перемешивают и ставят в водяную баню с температурой 37–40 °С. Далее через 2, 4, 6 и 8 мин стеклянной палочкой отбирают 1–2 капли раствора крахмала из пробирки и смешивают на часовом стекле с одной каплей раствора йода.

Вначале жидкость будет давать с йодом синее окрашивание, затем капли постепенно будут окрашиваться йодом в темно-коричневый, красный цвет и, наконец, перестанут окрашиваться совсем (останется желтый цвет йода).

### 1.3. Количественное определение моно- и дисахаридов

При определении содержания сахаров в продуктах необходимо приготовить водную вытяжку. Она не должна содержать белки и дубильные вещества, которые могут исказить результаты. Все эти

вещества удаляют, осаждая ацетоном или нитратом свинца. Избыток свинца осаждают при помощи сульфата или фосфата натрия. После этого жидкость фильтруют. Полученный фильтрат служит для непосредственного определения количества сахаров. Величину навески подбирают с таким расчетом, чтобы в конечном фильтрате концентрация сахара была в пределах 0,4–0,8 %. При необходимости испытуемую вытяжку разбавляют водой, либо берут большую исходную навеску.

Определение содержания сахаров в растворах может быть осуществлено физическими и химическими методами.

### 1.3.1. Определение содержания глюкозы и лактозы поляриметрическим методом

Этот физический метод основан на способности сахаров вращать плоскость поляризации плоскополяризованного света (явление оптической активности). Данное свойство характеризуется знаком и величиной угла вращения  $\alpha$ , величина которого является функцией концентрации водных растворов сахара, поэтому, измеряя угол вращения плоскости поляризации, можно определять содержание сахаров. Однако следует заметить, что на величину угла вращения могут влиять и другие оптически активные соединения, присутствующие в растворе (например, аминокислоты или пептиды), поэтому при анализе сложных смесей данный метод является лишь ориентировочным.

Определение угла вращения плоскости поляризации поляризованного луча производится при помощи оптического прибора – поляриметра. Наиболее распространены поляриметры – сахариметры, имеющие условную шкалу, по которой можно находить концентрацию сахара в процентах.

**Материал исследования и приборы.** Растворы глюкозы и лактозы; сахариметр универсальный СУ-3 со стеклянными кюветами длиной 100 и 200 мм (рис. 2).

**Ход определения.** Наполняют поляриметрическую трубку (кювету) исследуемым раствором, закрывают ее поляриметрическим стеклом, проследив, чтобы под ним не остались пузырьки воздуха. Осторожно завинчивают гайку (без усилий) и протирают наружные части стекол трубки. Перед тем как вложить трубку в камеру

поляриметра 5, смотрят в окуляр шкалы 9 и при помощи рабочего винта 12 совмещают нуль нониуса с нулем шкалы. При таком положении шкалы поле зрения в поляриметре должно иметь равномерную освещенность, в чем убеждаются, наблюдая в окуляр зрительной трубы 10.

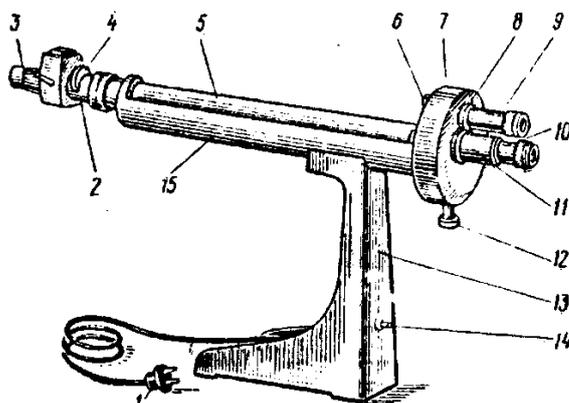


Рис. 2. Поляриметр-сахариметр СУ-3:

1 – штепсельная вилка; 2 – поляризатор; 3 – осветительный узел; 4 – поворотная обойма со светофильтрами; 5 – камера; 6 – выступающий винт нониуса; 7 – измерительная головка; 8 – винт для установки шкалы; 9 – лупа для отсчета показаний по шкале; 10 – зрительная труба с окуляром; 11 – гильза с анализатором; 12 – рукоятка кремальной передачи; 13 – литое основание с понижающим трансформатором; 14 – кнопка; 15 – траверса

После этого поляриметрическую трубку вкладывают в камеру прибора 5 и вновь смотрят в окуляр зрительной трубы. Вследствие вращения плоскости поляризованного луча раствором сахара две половинки, на которые разбито поле зрения, будут освещены неравномерно. При помощи рабочего винта вновь устанавливают равномерное освещение поля зрения и производят отсчет по шкале, пользуясь нониусом. Для этого определяют положение нулевой точки нониуса относительно делений шкалы. Если нуль нониуса приходится между двумя делениями шкалы, то берут меньшее число, которое показывает целое число отсчета по шкале.

Затем вправо от нуля нониуса находят деление, которое совпадает с каким-либо делением шкалы. Это число дает десятичные части отсчета по шкале. Из 3–4 определений берут среднее. Один градус ( $1^\circ$ ) шкалы поляриметра-сахариметра при длине трубки 200 мм

соответствует определенному содержанию сахара в 100 см<sup>3</sup> раствора. Так, для глюкозы оно равно 0,328, а для лактозы – 0,330 г.

Умножая показания сахариметра соответственно на эти величины, находят содержание сахара в исследуемом растворе в процентах (при пользовании трубкой длиной 100 мм показания умножают на два).

### 1.3.2. Определение содержания глюкозы и лактозы рефрактометрическим методом

**Материал исследования и приборы.** Растворы глюкозы и лактозы; рефрактометр универсальный ИРФ-454; пипетки.

**Ход определения.** Для проведения измерений на чистую полированную поверхность измерительной призмы с помощью пипетки осторожно, не касаясь поверхности призмы, наносят 2–3 капли исследуемого раствора глюкозы или лактозы, опускают осветительную призму и, вращая ручку компенсатора, обозначают границу между светлой и темной частями поля зрения максимально четко, без радужных полутонов. Затем вращением основного маховика наводят эту границу на перекрестье в поле зрения прибора и считывают значение показателя преломления по основной шкале прибора с точностью до четвертого знака. Затем рассчитывают концентрацию глюкозы или лактозы  $C$  (в процентах по массе по следующей формуле):

$$C = (n_D^{20} - 1,3330)/0,0014,$$

где  $n_D^{20}$  – показатель преломления, определенный при температуре 20 °С.

Если нет возможности термостатирования призмы, производят расчет концентрации, учитывая температуру воздуха в помещении ( $t$ , °С), где производилось измерение:

$$C = (n_D^t - 1,3330 + 0,0001 (t - 20))/0,0014,$$

где  $n_D^t$  – показатель преломления, измеренный при определенной температуре;  $t$  – температура воздуха в помещении в градусах Цельсия.

После завершения измерения открывают измерительный блок и несколько раз промывают поверхность измерительной призмы с помощью пипетки дистиллированной водой, затем осторожно, без нажима, протирают ее мягкой салфеткой или ватой и просушивают на воздухе.

### 1.3.3. Определение содержания глюкозы и лактозы йодометрическим методом

Йодометрический метод относится к химическим методам определения сахаров. Он основан на окислении йодом альдегидной группы сахаров в щелочной среде (этот метод неприменим для определения нередуцирующих сахаров, например, сахарозы). Альдо-сахара при этом окисляются в соответствующие кислоты: глюкоза – в глюконовую кислоту, лактоза – в лактобионовую и т.д.



Кетозы в щелочном растворе не окисляются йодом. Это дает возможность определить количество альдоз в присутствии кетоз, например, глюкозы в присутствии фруктозы. Испытуемая вытяжка должна содержать не более 0,1 г сахара в 10 см<sup>3</sup> раствора.

**Материал исследования и реактивы.** Растворы глюкозы и лактозы; 0,1 н. раствор йода; 0,1 н. раствор гидроксида натрия; 0,5 н. раствор соляной кислоты; 0,1 н. раствор тиосульфата натрия; 1 %-й раствор крахмала.

**Приборы.** Колба мерная емкостью 100 см<sup>3</sup>; колбы конические объемом 200 см<sup>3</sup>; пипетки вместимостью 10 и 25 см<sup>3</sup>.

**Ход определения.** Исследуемые растворы, содержащие глюкозу и лактозу, предварительно разбавляют водой в 10 раз (в мерную колбу вместимостью 100 см<sup>3</sup> отмеривают 10 см<sup>3</sup> раствора сахара и объем колбы доводят водой до метки). К 10 см<sup>3</sup> разбавленных растворов сахаров, отмеренных пипеткой в конические колбы объемом 200 см<sup>3</sup>, вливают 10 см<sup>3</sup> 0,1 н. раствора йода и при непрерывном помешивании – 15 см<sup>3</sup> 0,1 н. раствора NaOH. Колбы закрывают пробками и оставляют на 20 мин в таком положении.

Затем в колбы приливают по 15 см<sup>3</sup> 0,5 н. раствора соляной кислоты и выделившийся йод титруют 0,1 н. раствором тиосульфата

натрия. Титруют сначала быстро до получения светло-желтого окрашивания, затем прибавляют 1 см<sup>3</sup> крахмала и медленно продолжают титрование до исчезновения синей окраски. По окончании титрования необходимо проверить полноту выделения йода, прибавляя 1–3 см<sup>3</sup> 0,5 н. раствора HCl.

Параллельно ставят холостую пробу, в которой вместо раствора сахара берут 10 см<sup>3</sup> воды. Содержание сахара рассчитывают (в процентах) по формуле

$$X = ((a - b) \cdot T \cdot 100 \cdot m) / p,$$

где  $a$  – количество 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование йода, выделившегося в холостой пробе, см<sup>3</sup>;  $b$  – количество 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование йода в пробе с исследуемым раствором, см<sup>3</sup>;  $T$  – титр раствора йода по соответствующему сахару (0,009 г/мл для глюкозы и 0,01801 г/мл для лактозы);  $m$  – количество раствора, взятого для йодометрического определения сахара, см<sup>3</sup> (10 см<sup>3</sup>);  $p$  – фактор разведения (10).

#### **1.4. Определение промежуточных продуктов обмена углеводов**

Одна из основных функций углеводов в обмене веществ различных видов организмов – энергетическая. В процессе аэробного дыхания через ряд промежуточных продуктов углеводы превращаются в пировиноградную кислоту, которая после декарбоксилирования окисляется до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O. В анаэробных условиях окисление заканчивается образованием молочной кислоты. При различных видах брожения (молочнокислом, пропионовокислом, спиртовом и др.) превращение углеводов заканчивается образованием различных органических кислот, спиртов и некоторых других продуктов.

##### **1.4.1. Определение содержания молочной кислоты**

Колориметрический метод определения содержания молочной кислоты связан с образованием желтого окрашивания в результате цветной реакции молочной кислоты с хлоридом железа, интенсивность которого возрастает пропорционально увеличению концентрации кислоты.

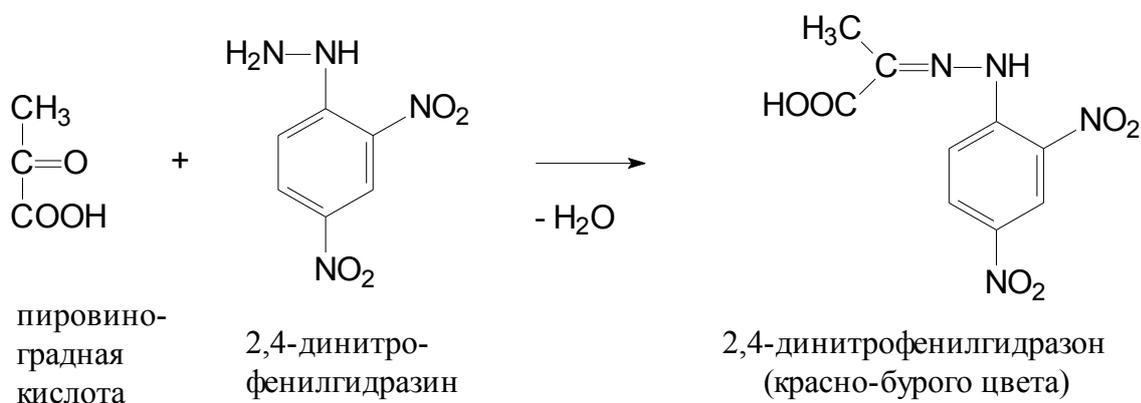
**Материалы исследования и реактивы.** Молочная сыворотка; сыворотка крови; рассол квашеной капусты (огурцов); 10 %-й раствор хлорида бария; 0,66 н. раствор гидроксида натрия; 22 %-й раствор сульфата цинка; 1 %-й раствор хлорида железа.

**Приборы.** Фотоколориметр МКМФ-1 (Ч. 1, раздел 3); конические колбы объемом 50 см<sup>3</sup>; мерная колба емкостью 100 см<sup>3</sup>; пипетки вместимостью 1,2 и 10 см<sup>3</sup>; воронка; фильтр.

**Ход определения.** К 5 см<sup>3</sup> сыворотки (рассола) прибавляют 2 см<sup>3</sup> раствора BaCl<sub>2</sub>, потом 2 см<sup>3</sup> 0,66 н. раствора NaOH и, наконец, 1 см<sup>3</sup> раствора ZnSO<sub>4</sub>. Реактивы вводят очень быстро, обязательно перемешивая раствор в течение не менее 30 с после добавления каждого реактива. Жидкость пропускают через бумажный фильтр. Затем 1 см<sup>3</sup> прозрачного фильтрата переносят в мерную колбу емкостью на 100 мл, разбавляют дистиллированной водой до 100 мл, перемешивают, отбирают 10 мл раствора и добавляют к нему 1 см<sup>3</sup> FeCl<sub>3</sub>. Раствор перемешивают и определяют его оптическую плотность на фотоколориметре с синим светофильтром. Содержание молочной кислоты в фильтрате определяют по калибровочному графику.

#### 1.4.2. Определение содержания пировиноградной кислоты

Пировиноградную кислоту (ПВК) определяют колориметрически по цветной реакции с 2,4-динитрофенилгидразином в щелочной среде, приводящей к образованию окрашенного в желто-оранжевый цвет 2,4-динитрофенилгидразона, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации ПВК:



**Материалы исследования и реактивы.** Молочная сыворотка; сыворотка крови; 0,1%-й раствор 2,4-динитрофенилгидразина в 1 н. HCl; 2,5 %-й спиртовой раствор КОН.

**Приборы.** Фотоэлектрический колориметр МКМФ-1 с синим светофильтром и кюветами с рабочим расстоянием 10 мм; пробирки; пипетки емкостью 1 мл.

**Ход определения.** Берут две пробирки. В одну пробирку наливают 1 мл сыворотки, в другую – 1 мл воды (контроль), затем вливают в обе пробирки по 1 мл спиртового раствора КОН и перемешивают точно в течение 1 мин. После этого доливают по 0,5 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, перемешивают и оставляют стоять в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем измеряют оптическую плотность рабочего раствора относительно контроля на фотоколориметре с синим светофильтром. Содержание ПВК (в процентах) находят по калибровочному графику, построенному для ряда растворов с определенными, точно известными концентрациями ПВК.

## 1.5. Выделение углеводов

Углеводы извлекают методом экстракции из животных и растительных тканей с помощью 75 %-го этанола, раствора гидроксида калия на кипящей водяной бане, 5 %-го раствора трихлоруксусной кислоты и другими методами. Для разделения углеводов применяют различные виды хроматографии.

### 1.5.1. Выделение гликогена из тканей животных

**Материалы исследования и реактивы.** Ткань животного (печень, мышечная ткань, мозг и др.), 15 %-й и 60 %-й растворы гидроксида калия, этанол, лед, реактив Люголя.

**Приборы.** Штатив с центрифужными и обычными пробирками; водяная баня; пипетки градуированные вместимостью 2 и 10 см<sup>3</sup>; стакан; центрифуга.

**Ход определения.** В центрифужную пробирку помещают 1,5–2 г животной ткани и добавляют 2 мл 60 %-го раствора КОН. Пробирку ставят на 1 ч в кипящую водяную баню, содержимое пробирки часто взбалтывают. Затем пробирку вынимают из бани, охлаждают и до-

бавляют в нее 8–10 мл этанола. Выпавший осадок гликогена отделяют центрифугированием в течение 5–10 мин при скорости вращения 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, а осадок растворяют в 2 мл 15 %-го раствора гидроксида калия, добавляют 8–10 мл этанола и охлаждают полученную смесь. Выпавший снова осадок гликогена отделяют центрифугированием. Затем растворяют меньшую часть осадка в нескольких каплях воды и добавляют реактив Люголя. Появление красного окрашивания доказывает наличие гликогена.

### 1.5.2. Выделение углеводов из растительных тканей и их разделение методом тонкослойной хроматографии

**Материалы исследования и реактивы.** Листья шелковицы, капусты; 75 %-й этанол; 10 %-й изопропиловый спирт; смесь н-бутанола, уксусной кислоты и воды 4:1:1; бензидиновый проявитель (0,5 г основания бензидина растворяют в 80 мл этанола, к раствору добавляют 10 мл 40 %-го раствора трихлоруксусной кислоты и 10 мл ледяной уксусной кислоты); стандартный раствор смеси сахаров.

**Приборы.** Весы; центрифуга; сушильный шкаф; хроматографическая камера; хроматографическая бумага; эксикатор с краном; пульверизатор; воронка Бюхнера; микропипетки; ступка фарфоровая; чашка выпарительная; пипетки градуированные на 5 и 10 см<sup>3</sup>; воронка с фильтром.

**Ход определения.** Навеску тонко измельченных воздушно-сухих листьев массой 1 г растирают в течение 30 мин в фарфоровой ступке с 10 см<sup>3</sup> 75 %-го раствора этанола. Содержимое ступки переносят на воронку Бюхнера и фильтруют через двойной плотный фильтр в колбу Бунзена. Осадок на фильтре трижды промывают 75 %-м этанолом. Спиртовые экстракты объединяют, помещают в круглодонную колбу и упаривают на ротационном испарителе при температуре внешнего обогрева 50–60 °С. Остаток после упаривания обрабатывают 2 см<sup>3</sup> 10 %-го изопропанола и центрифугируют для удаления пигментов. Надосадочную жидкость, содержащую углеводы, сушат досуха в эксикаторе; остаток растворяют в 1 см<sup>3</sup> 10 % изопропанола.

Разделение углеводов ведут методом тонкослойной хроматографии на пластинках Силуфол. Перед употреблением пластинки

активируют, нагревая в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 45 мин. На пластинке отмечают линию старта (1 см от края) несколькими уколами иглы в слой силикагеля и на нее наносят микропипеткой 0,02 см<sup>3</sup> раствора углеводов в изопропанол. Пластины устанавливают в стеклянную камеру под углом 60°, заполненную смесью растворителей н-бутанол/уксусная кислота/вода 4:1:1. Разделение проводят в течение 45–60 мин до подъема растворителя на 2/3 высоты пластины. Затем пластины вынимают из камеры, отмечают линию фронта растворителя и сушат в вытяжном шкафу. После высушивания пластинку опрыскивают из пульверизатора раствором бензидина, который образует с углеводами окрашенные в коричневый цвет соединения. Идентификацию компонентов анализируемой смеси проводят с помощью углеводов-свидетелей.

## **1.6. Определение активности гликолитических ферментов**

Активность ферментов, катализирующих расщепление углеводов, может быть определена по убыли концентрации соответствующих им субстратов или по накоплению продуктов расщепления.

### **1.6.1. Определение декстринолитической активности**

Декстринолитическая активность характеризуется способностью фермента амило-1,6-гликозидазы (КФ 3.2.1.33) катализировать гидролиз конечных декстринов (фосфодекстринов) с 1,6-гликозидной связью до редуцирующих сахаров. Количество сахара, образовавшегося в процессе ферментативной реакции, определяют йодометрическим методом.

За единицу декстринолитической активности принимают такое количество фермента, которое при стандартных условиях (рН 4,7–4,9; температура 30 °С, продолжительность реакции 60 мин) катализирует гидролиз до редуцирующих сахаров 1 г конечных декстринов, которые составляют 30 % их количества, введенного в реакцию. Декстринолитическую активность определяют в солоде, полученном из различных культур зерна – ячменя, овса, проса и ржи.

**Материалы исследования и реактивы.** Субстрат – 1 %-й раствор фосфодекстринов; фосфатный буфер, рН 4,8–5,0; 0,1 н. раствор йода; 0,1 н. раствор тиосульфата натрия; разбавленная 1:4 серная кислота; 0,1 н. раствор гидроксида натрия; 0,1 н. и 1 н. растворы соляной кислоты; 1 %-й раствор растворимого картофельного крахмала.

**Приборы.** Колбы конические объемом 50 мл, пробирки, пипетки вместимостью 2, 5 и 10 мл; градуированная пипетка емкостью 1 мл; воронка, бумажный фильтр; фарфоровая ступка с пестиком; кварцевый песок.

**Ход определения.** Отвешивают на аналитических весах 5 г соды, растирают в ступке с кварцевым песком, прибавляют 5 мл фосфатного буферного раствора и 45 мл дистиллированной воды. Полученную смесь перемешивают и выдерживают в термостате в течение 30 мин при температуре 30 °С, затем раствор фильтруют и фильтрат используют для анализа. Ставят два параллельных опыта. С этой целью в две пробирки вводят пипеткой по 10 мл 1 %-го раствора субстрата и выдерживают их в течение 10 мин в термостате с температурой 30 °С. Затем в них вносят по 5 мл ферментного раствора, перемешивают и выдерживают реакцию смесь в термостате в течение 60 мин при температуре 30 °С для проведения ферментативной реакции. По истечении этого времени реакцию останавливают добавлением в реакцию смесь 1 мл 1 н. раствора соляной кислоты.

Затем в растворе определяют количество образовавшегося сахара, для чего содержимое двух пробирок переносят в две конические колбы вместимостью 250 мл, в каждую добавляют 20 мл 0,1 н. раствора йода и по каплям, при перемешивании – 60 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия. Затем колбы оставляют стоять в течение 15 мин. Далее в растворы вводят 2 мл 5 %-й серной кислоты и оттитровывают избыток йода 0,1 н. раствором тиосульфата натрия.

Одновременно ставят контрольный опыт для определения содержания сахаров в самом субстрате. Для этого в колбу вместимостью 250 мл вводят 10 мл субстрата, 1 мл 1 н. раствора соляной кислоты и 5 мл ферментного раствора. Добавляют воду до объема 100 мл, перемешивают и проводят определение сахара таким же образом, как и в основном опыте. Количество образовавшегося сахара определяют по разности между объемами раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование контрольной и исследуемой

проб. Эта разность должна быть в пределах 1–6 мл. Если она более 6 или менее 1 мл, то анализ повторяют, соответственно уменьшая или увеличивая навеску солода.

Для расчета декстринолитической активности берут среднее значение количества раствора тиосульфата, пошедшего на титрование двух параллельных проб. Для определения сахара, образовавшегося в процессе реакции, полученную разность умножают на 17,1 мг, так как 1 мл 0,1 н. раствора йода (или тиосульфата) эквивалентен 17,1 мг мальтозы. Декстринолитическую активность (ДС) рассчитывают по уравнению

$$ДС = ((1,240 \cdot 0,95 \cdot \Delta V \cdot 17,1) - 7,5) / a \cdot 1000,$$

где  $\Delta V$  – средняя разность объемов тиосульфата натрия, пошедшего на титрование в основном и контрольном опытах, мл;  $a$  – количество исследуемого солода в растворе, взятое на анализ, г; 0,95 – коэффициент перевода мальтозы в декстрины; 1000 – перевод количества образовавшегося сахара из миллиграммов в граммы; 1,240 и 7,5 – коэффициенты, найденные экспериментальным путем.

Метод прост и обладает достаточно высокой точностью. Погрешность метода составляет в среднем  $\pm 4\%$ . Преимуществом метода является возможность проведения анализа в широких пределах степени гидролиза субстрата без снижения точности анализа.

### 1.6.2. Определение активности сахаразы

Сахараза ( $\beta$ -фруктофуранозидаза, инвертаза) относится к классу гидролаз (КФ 3.2.1.26). Этот фермент катализирует расщепление сахарозы на глюкозу и фруктозу. При этом разрывается 1–2 связь, находящаяся у  $\beta$ -глюкозидного углеродного атома остатка фруктозы. Скорость реакции устанавливают по количеству образовавшихся глюкозы и фруктозы методом Бертрана. В качестве субстрата используют 20 %-й раствор сахарозы. Ферментативную реакцию проводят в течение 30 мин при температуре 30 °С и при рН 4,6. За единицу активности фермента принимают такое его количество, которое катализирует расщепление одного микромоля сахарозы за 1 мин в указанных выше условиях.

**Материал исследования и реактивы:**

а) субстрат – 20 %-й раствор сахарозы;

б) ацетатный буферный раствор с рН 4,6 готовится смешением двух растворов: 1) 1 н. раствор уксусной кислоты (57,25 мл ледяной уксусной кислоты растворяют в 1 л воды); 2) 1 н. раствор ацетата натрия (82 г безводного ацетата натрия растворяют в 1 л воды);

в) раствор Фелинга I (40 г сульфата меди растворяют в воде, объем доводят до 1 л в мерной колбе);

г) раствор Фелинга II (200 г тартрата натрия и калия и 150 г гидроксида натрия растворяют в воде, объем доводят до 1 л в мерной колбе);

д) раствор сульфата железа (III) и аммония (готовят насыщенный на холоде раствор, содержащий примерно 400 г железоаммонийных квасцов  $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  на 1 л воды; для приготовления рабочего раствора к 500 мл насыщенного раствора осторожно малыми порциями приливают 100 мл концентрированной серной кислоты, охлаждают, переносят в мерную колбу объемом 1 л и доводят до метки дистиллированной водой);

е) раствор перманганата калия (2,5 г  $\text{KMnO}_4$  растворяют в воде и доводят объем до 1 л в мерной колбе);

ж) ферментный раствор (раствор 0,1–0,5 г ферментного препарата в 100 мл воды).

**Приборы.** Колбы конические объемом 100 и 150 мл; пробирки; пипетки на 2, 5 и 10 мл; градуированная пипетка емкостью 1 мл; воронка; бумажный фильтр; фарфоровая ступка с пестиком; кварцевый песок.

**Ход определения.** Растворы сахарозы, фермента и дистиллированную воду выдерживают в термостате с температурой 30 °С в течение 20–25 мин. Затем в мерную колбу вместимостью 100 мл вносят 50 мл раствора сахарозы и 5 мл раствора ферментного препарата, перемешивают и отмечают время по секундомеру. Далее объем жидкости быстро доводят до метки нагретой до 30 °С дистиллированной водой, тщательно перемешивают и помещают на 30 мин в термостат с температурой 30 °С. Затем раствор охлаждают и вносят 20 мл полученного гидролизата в коническую колбу объемом 150 мл и по 20 мл растворов Фелинга I и II. Параллельно с основным определением проводят холостое с инактивированным ферментным раствором. Для этого в колбу вместимостью 100 мл вносят 30 мл дистиллированной воды и 5 мл раствора ферментного препарата и поме-

щают на 10 мин в кипящую водяную баню для инактивации фермента. Затем раствор охлаждают, добавляют к нему 50 мл сахарозы и объем жидкости в колбе доводят до метки дистиллированной водой. Реакцию с этим раствором проводят аналогично опытной пробе, определяя сахар по методу Бертрана. Для этого смеси перемешивают и нагревают на газовой горелке до кипения и кипятят ровно 3 мин. Затем под вакуумом водоструйного насоса горячий раствор фильтруют через фильтр Шотта, осадок несколько раз промывают горячей водой. Далее полученный осадок оксида меди (1) растворяют в 20 мл раствора сульфата железа и аммония и полученный раствор титруют раствором перманганата калия до появления розовой окраски. Расчет активности сахаразы  $A$  в ед./г исследуемого препарата ведут по формуле

$$A = ((c - b) \cdot 0,95) / 0,000342 \cdot a \cdot t,$$

где  $c$  – количество инвертного сахара, образовавшегося в реакционной среде, г;  $b$  – количество инвертного сахара в холостом растворе, г;  $a$  – количество ферментного препарата, внесенного в реакционную среду, г;  $t$  – длительность инкубации, мин. При расчете количества инвертного сахара исходят из того, что 1 мл раствора перманганата калия соответствует 10 мг оксида меди и 5,3 мг инвертного сахара.

### Контрольные вопросы

1. Приведите классификацию углеводов.
2. Охарактеризуйте строение и свойства моносахаридов, виды изомерии.
3. Дайте характеристику строения и свойств дисахаридов, имеющих пищевое значение.
4. Приведите примеры строения амилозы, амилопектина и гликогена.
5. Опишите строение и свойства целлобиозы и целлюлозы.
6. Перечислите цветные реакции на углеводы.
7. Назовите методы количественного определения углеводов.
8. Расскажите о сущности химических реакций, лежащих в основе йодометрического метода определения сахаров.
9. Объясните сущность колориметрических методов определения молочной и пировиноградной кислот.
10. Перечислите и охарактеризуйте методы выделения и фракционирования углеводов.

## 2. ЛИПИДЫ

### 2.1. Классификация, строение и биологические функции липидов

Липиды представляют собой обширную группу соединений, существенно различающихся по своей химической структуре и функциям. Липиды характеризуются следующими признаками: нерастворимостью в воде; растворимостью в неполярных растворителях (эфир, хлороформ, бензол); содержанием высших алкильных радикалов; распространенностью в живых организмах.

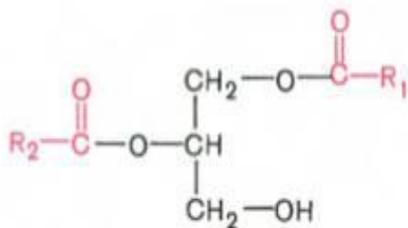
К липидам относятся жиры (триглицериды), воска, фосфолипиды, гликолипиды, стеролы и стериды, терпены.

#### 2.1.1. Основные классы липидов

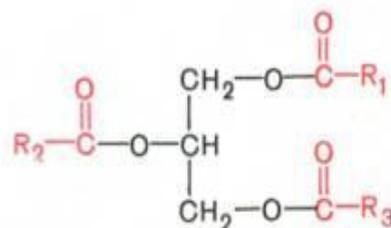
Наибольшее распространение получила классификация, основанная на структурных особенностях липидов. По этой классификации различают следующие основные классы липидов.

**Простые липиды** – сложные эфиры жирных кислот с различными спиртами: глицериды и воска.

**Глицериды (ацилглицеролы)** – сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных кислот.

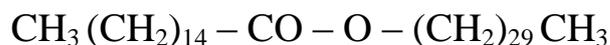


Диглицерид (диацилглицерол)



Триглицерид (триацилглицерол)

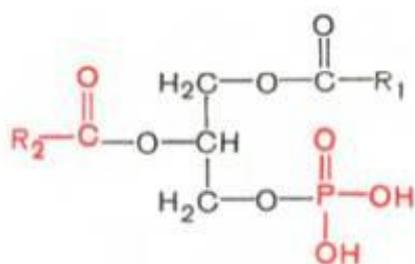
**Воска** – сложные эфиры высших жирных кислот и высших одноатомных или двухатомных спиртов. Например, мирицилпальмитат – сложный эфир пальмитиновой кислоты и мирицилового спирта:



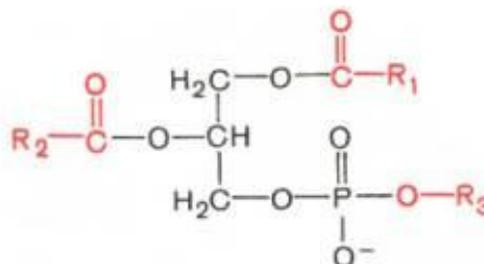
Мирицилпальмитат входит в состав пчелиного воска.

**Сложные липиды** – сложные эфиры жирных кислот со спиртами, содержащие дополнительно и другие группы.

**Фосфолипиды** – липиды, содержащие, помимо жирных кислот и спирта, остаток *фосфорной кислоты*. В их состав часто входят азотистые основания и другие компоненты. Общий структурный фрагмент фосфолипидов – **фосфатидная кислота** (1,2-диацил-3-фосфоглицерол):

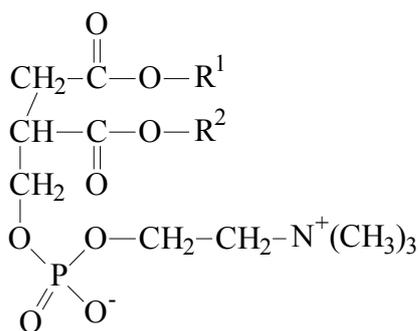


Фосфатидная кислота

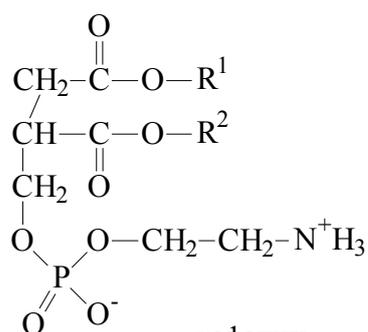


Глицерофосфолипид

**Глицерофосфолипиды** отличаются друг от друга дополнительными группировками  $\text{R}_3$ , присоединенными фосфоэфирной связью к фосфатидной кислоте. Дополнительными группировками могут быть спирты, предельные и непредельные жирные кислоты, фосфорная кислота и азотсодержащее соединение (некоторые фосфолипиды содержат циклический спирт инозитол, не содержащий азот). Например, фосфатидилхолин (**лецитин**), дополнительная группировка – аминоспирт холин (2-триметиламиноэтанол); фосфатидилэтанолламин (**кефалин**), дополнительная группировка – аминоспирт этаноламин:



лецитин  
(фосфатидилхолин)

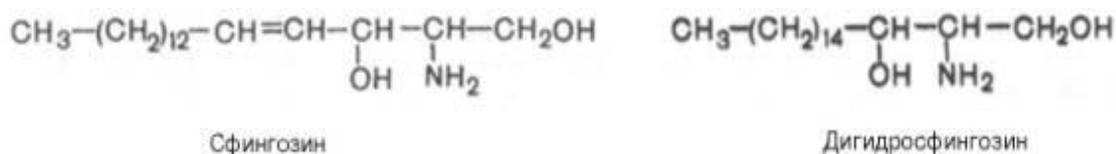


кефалин  
(фосфатидилэтанолламин)

Лецитин в значительном количестве содержится в яичном желтке, мозге, печени и твороге. Промышленным путем его полу-

чают из сои. Эти две группы фосфолипидов являются главными липидными компонентами мембран клеток.

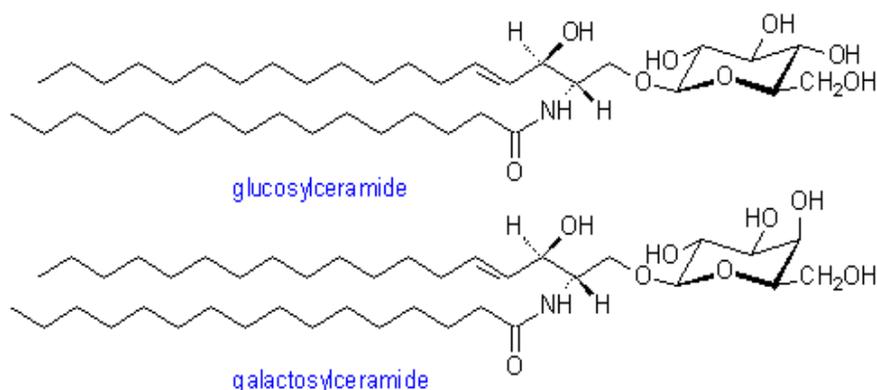
**Гликолипиды (гликофинголипиды)** содержат в своем составе ненасыщенный дигидроксиаминоспирт **сфингозин**:



Существуют три подкласса сфинголипидов: сфингомиелины, цереброзиды и ганглиозиды.

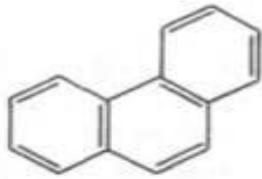
Общий план построения молекул **сфингомиелинов** напоминает строение молекул фосфолипидов. Гликолипидами являются цереброзиды и ганглиозиды.

**Цереброзиды** образованы остатками аминоспирта сфингозина, жирной кислоты и углевода (галактоза, реже глюкоза), впервые были обнаружены в составе мозга. В качестве жирной кислоты в состав цереброзидов чаще всего входят насыщенные и ненасыщенные кислоты с 24 атомами углерода в цепи:

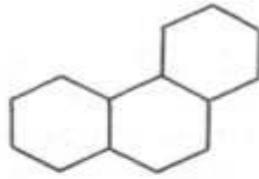


**Ганглиозиды** содержат, как правило, сложный олигосахарид и сосредоточены в плазматических мембранах нервных клеток.

**Стероиды** – группа биологически важных природных соединений, в структуру которых входит полициклический углеводород, образованный гидрированным фенантреном (кольца А, В и С) и циклопентаном (кольцо D):



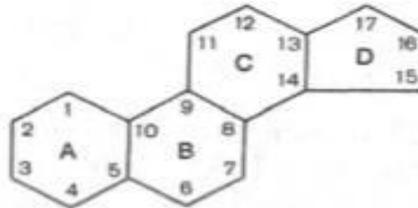
Фенантрен



Пергидрофенантрен



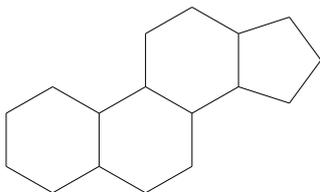
Циклопентан



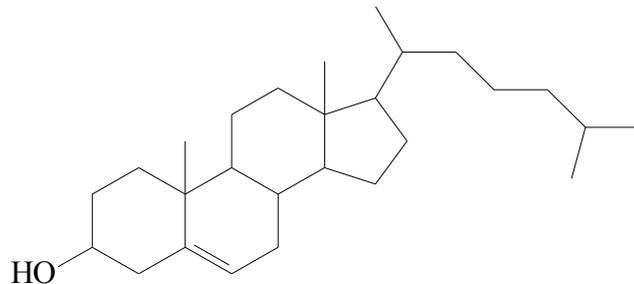
Циклопентанпергидрофенантрен  
(общая структурная основа стероидов)

Стероиды входят в состав всех растительных (фитостерины) и животных (зоостерины) организмов. Объединяются одной схемой биогенеза в живой клетке.

**Стеролы** – одноатомные вторичные циклические спирты, структурную основу которых составляет циклопентанопергидрофенантрен. Одним из наиболее распространенных стеролов является **холестерол** – главный представитель стеринов животных, предшественник всех стероидов в организме:



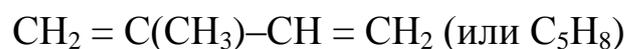
циклопентанпергидрофенантрен



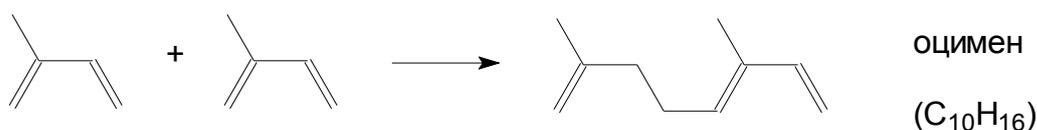
холестерол (холестерин)

Холестерол и его эфиры встречаются в головном мозге, желчи, крови и других тканях.

**Терпены** (терпеноиды) представляют собой соединения, в основе химической структуры которых лежит фрагмент изопрена:



Обычно соединение изопреновых звеньев происходит по типу «голова к хвосту» (изопреновое правило Ружичка, 1921 г.), например:



В природе чаще встречаются кислородсодержащие производные терпенов – спирты, альдегиды, кетоны и т. д., которые называют терпеноидами. Они могут быть как ациклическими, так и моно-, ди-, трициклическими.

Терпены делят на группы (табл. 1) по количеству изопреновых звеньев.

Таблица 1

### Классификация терпенов

Наименование группы	Количество изопреновых звеньев	Брутто-формула
Гемитерпеноиды	1	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub>
Монотерпеноиды	2	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
Сесквитерпеноиды	3	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>
Дитерпеноиды	4	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>
Тритерпеноиды	6	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>
Тетратерпеноиды	8	C <sub>40</sub> H <sub>64</sub>
Политерпеноиды	N	C <sub>5n</sub> H <sub>8n</sub>

Моно- и сесквитерпеноиды летучи и являются компонентами эфирных масел многих растений, придавая им характерный аромат, и используются в парфюмерии.

К дитерпеноидам относится, например, *ретинол* – активная форма витамина А. К тритерпеноидам относятся *сквален* и *лано-стерин*, на основе которых в растительных и животных клетках происходит биосинтез стероидов. При этом происходит удаление нескольких углеродных атомов, поэтому стероиды уже не отвечают общей для тритерпенов брутто-формуле.

Тетратерпеноиды – это *каротиноиды*, растительные пигменты, окрашенные в желтый, оранжевый или красный цвет и придающие характерную окраску многим растительным и животным тканям.

К их числу относятся, например,  $\alpha$ -,  $\beta$ - , и  $\gamma$ -каротины, являющиеся предшественниками витамина А.

Политерпеноиды – природные полимеры, построенные из сотен или тысяч изопреновых звеньев. Они являются компонентами млечного сока многих растений, например, натуральный каучук содержится в млечном соке гевеи.

### 2.1.2. Предшественники липидов: жирные кислоты

В природных жирах обнаружено более 200 различных жирных кислот. Значительное распространение имеют около 20 жирных кислот. Все они монокарбоновые кислоты, содержащие линейные углеводородные цепи с четным числом углеродных атомов. Наиболее часто встречаются жирные кислоты с четным числом углеродных атомов от 8 до 24. Среди них преобладают кислоты, имеющие  $C_{16}$  и  $C_{18}$  (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая и линолевая). Входящие в состав триглицеридов жирные кислоты могут быть насыщенными и ненасыщенными. Примерно  $3/4$  всех жирных кислот являются ненасыщенными.

Нумерацию углеродных атомов в жирно-кислотной цепи начинают с атома углерода карбоксильной группы.

Ненасыщенные жирные кислоты обычно содержат двойную связь между 9-м и 10-м атомами углерода. Дополнительные двойные связи чаще бывают на участке между 11-м атомом углерода и метильным концом цепи. Между ними всегда имеется хотя бы одна метиленовая группа:



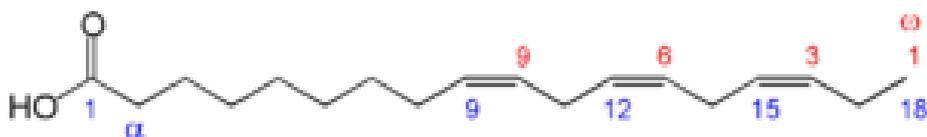
Природные ненасыщенные жирные кислоты имеют *цис*-конфигурацию. Количество и положение двойных связей в ненасыщенных жирных кислотах часто обозначают с помощью цифровых символов: например, *олеиновую кислоту* 18:1(9), *линолевую кислоту* 18:2(9,12), где первая цифра – число углеродных атомов, вторая – число двойных связей, а следующие цифры в скобках – номера ближайших к карбоксилу углеродных атомов, вовлеченных в образование двойной связи (табл. 2).

Таблица 2

### Номенклатура жирных кислот

Тривиальное название	Систематическое название	Сокращенное название
Пальмитиновая	Гексадекановая	C16:0
Стеариновая	Октадекановая	C18:0
Олеиновая	Октадеценовая	C18:1 (9)
Линолевая	Октадекадиеновая	C18:2 (9,12)
Линоленовая	Октадекатриеновая	C18:3 (9,12,15)
Арахидоновая	Эйкозатетраеновая	C20:4 (5,8,11,14)
	Эйкозопентаеновая	C20:5 (5,8,11,14, 17)
	Докозагексаеновая	C22:6 (4,7,10,13,16,19)

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) не синтезируются в организме и являются незаменимыми (эссенциальными) факторами питания. ПНЖК выступают как предшественники образования целой группы биологически активных соединений – простагландинов, которые оказывают влияние на сердечно-сосудистую систему и гладкую мускулатуру. Особенно большое значение для жизнедеятельности человеческого организма имеют линолевая, линоленовая и арахидоновая жирные кислоты, которые называют витамином F. Наиболее ценные для здоровья человека ПНЖК – Омега-3, например, линоленовая кислота:



При недостатке поступления в организм незаменимых жирных кислот и тем более при их полном отсутствии наступает обширный комплекс расстройств функций организма, называемый синдромом недостаточности незаменимых жирных кислот.

### 2.1.3. Биологические функции липидов

Липиды являются одним из основных компонентов биологических мембран, влияют на проницаемость мембран. Участвуют в передаче нервного импульса, создании межклеточных контактов.

Жиры служат весьма эффективным источником энергии либо при непосредственном использовании, либо потенциально – в форме запасов жировой ткани. Энергетическая ценность жиров примерно в 2 раза выше, чем углеводов, при условии их биологической доступности и здорового усвоения организмом.

Велика *физиологическая роль* жиров и из-за наличия в них физиологически важных сопутствующих веществ. К таким веществам относятся *стерины*, часть которых может быть источником образования витамина D и других производных, характеризующихся физиологической активностью. *Каротины* (провитамин А) в жирах являются источником образования витамина А. Кроме того, важны содержащиеся в растительных жирах токоферолы (витамин Е) и антигеморрагический витамин К.

Жиры создают термоизоляционные покровы у животных и растений и защищают органы и ткани от механических воздействий.

### 2.1.4. Жиры и масла

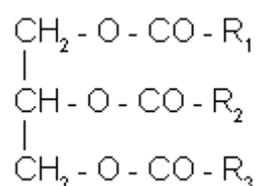
#### *Общая характеристика. Строение жиров*

Жирные масла растений и запасные жиры тканей животных представляют собой наряду с углеводами концентрированный энергетический и строительный резерв жизнедеятельности организма.

Основная роль запасных жиров – использование их в качестве резервного источника энергии; кроме того, они выполняют важную роль защитных веществ, помогающих организмам переносить неблагоприятные условия окружающей среды, например, низкие температуры.

У животных жиры являются конечными или временными запасными веществами. Конечные запасы, например, жир молока, не подлежат использованию самим организмом. Только временные запасные жиры, типичные для жировых тканей, являются мобильными продуктами. Именно эти жиры одновременно являются продуктами, используемыми человеком для пищевых, лекарственных и технических целей.

Жиры состоят почти исключительно из глицеридов жирных кислот, т. е. сложных эфиров глицерина и высокомолекулярных жирных кислот. Глицериды имеют следующую общую формулу:



где  $\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$  – радикалы жирных кислот.

Если все три кислотных радикала принадлежат одной и той же жирной кислоте, то такие триглицериды называют простыми (например, трипальмитин, тристеарин, триолеин и т. д.), если разным жирным кислотам, то смешанными. Названия смешанных триглицеридов образуются в зависимости от входящих в их состав жирных кислот, при этом цифры 1, 2 и 3 указывают на связь остатка жирной кислоты с соответствующей спиртовой группой в молекуле глицерина (например, 1-олео-2-пальмитостеарин). Необходимо отметить, что положение крайних атомов углерода в молекуле глицерина на первый взгляд равнозначно, тем не менее их обозначают сверху вниз (1 и 3).

Жиры, состоящие из триглицеридов с одинаковыми остатками жирных кислот  $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3$ , в природе встречаются довольно редко. Например, оливковое масло необычайно богато мононенасыщенными жирными кислотами. Это масло отличается высоким содержанием олеиновой кислоты, составляющей более 70 % от общего количества жирных кислот, которые содержат, как правило, около 10 % линолевой кислоты и около 15 % насыщенных жирных кислот (в основном, пальмитиновой кислоты).

подавляющее большинство известных жиров представляют смеси глицеридов разных кислот, например, стеаринодиолеин, пальмитиноолеинолинолеин и т. п. В настоящее время известно свыше 1300 различных жиров, различающихся по составу жирных кислот и образуемых ими глицеридов.

### *Свойства жиров. Жировые числа*

Насыщенные жирные кислоты образуют триглицериды, имеющие при обычной температуре твердую консистенцию. Среди них встречаются как животные (например, говяжий жир), так и растительные (например, масло какао) жиры. Ненасыщенные жирные кислоты образуют триглицериды, имеющие при тех же условиях жидкую консистенцию – животные жиры (например, рыбий жир) и подавляющее большинство растительных масел. Так, в конопляном масле 95 % всех жирных кислот приходится на долю олеиновой, линолевой и линоленовой кислот и только 5 % – на долю стеариновой и пальмитиновой кислот. В жире человека, плавящемся при температуре 15 °С (при температуре тела он жидкий), содержится 70 % олеиновой кислоты. Плотность подавляющего числа жиров находится в пределах 0,910–0,945. Лишь у немногих масел (например, касторового) плотность выше – до 0,970 (при 20 °С).

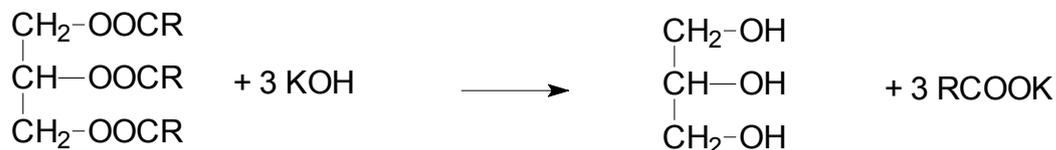
Температура плавления твердых жиров возрастает с числом углеродных атомов входящих в их состав жирных кислот. Поскольку жиры представляют сложные смеси разных триглицеридов, точка плавления и температура застывания обычно не бывает четко выраженной.

Температура кипения жиров не может быть определена, поскольку при нагревании до 250 °С они разрушаются с образованием из глицерина сильно раздражающего слизистые оболочки глаз альдегида акролеина.

Показатель преломления и число рефракции тем выше, чем больше содержится в жире триглицеридов ненасыщенных кислот. Например, масло какао имеет показатель преломления 1,457, миндальное – 1,470, льняное – 1,482.

Химические свойства жиров проявляются в их способности к омылению, прогорканию, высыханию и гидрогенизации.

**Омыление.** Триглицериды жирных кислот способны к превращениям, характерным для сложных эфиров. Под влиянием едких щелочей происходит расщепление эфирных связей, в результате чего образуются свободный глицерин и щелочные соли жирных кислот (мыла):



Реакция омыления широко используется для приготовления бытовых и медицинских мыл, а также для выяснения состава жиров и их доброкачественности. С этой целью определяют **число омыления**.

**Число омыления** – это количество миллиграммов едкого калия (KOH), необходимое для нейтрализации свободных и связанных в виде триглицеридов жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Количество KOH, которое требуется для омыления 1 г жира, зависит от молекулярной массы входящих в его состав жирных кислот. Чем больше молекулярная масса жирных кислот, тем меньше молекул триглицеридов будет в 1 г жира и, следовательно, меньше KOH пойдет на омыление. Таким образом, число омыления характеризует молекулярный состав жира. (В количество KOH, идущего на омыление 1 г жира, включается также количество щелочи, затраченное на нейтрализацию свободных жирных кислот).

**Прогоркание.** Этот сложный химический процесс происходит при хранении жира в неблагоприятных условиях (доступ воздуха и влаги, свет, тепло), в результате чего жиры приобретают горьковатый вкус и неприятный запах. Если жиры в этих условиях подвергаются действию фермента липазы, то происходит их разложение, аналогичное реакции омыления. Этот вид порчи жира легко контролируется по величине **кислотного числа** (КЧ). Доброкачественные жиры содержат небольшое количество свободных жирных кислот.

**Кислотное число** – это количество миллиграммов едкого кали (KOH), которое необходимо для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

С помощью других констант можно определить природу содержащихся в масле свободных жирных кислот. Так, по **числу Рейхерта–Мейсля** можно судить о количестве летучих растворимых в воде кислот, а по **числу Поленске** – о количестве летучих кислот, нерастворимых в воде.

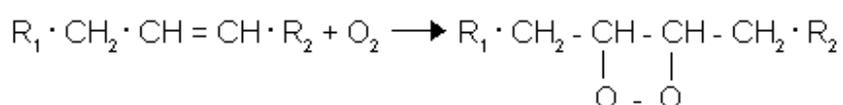
**Число Рейхерта–Мейсля** – количество миллилитров 0,1 М раствора едкого кали, необходимое для нейтрализации летучих растворимых в воде жирных кислот, полученных при строго определенных условиях из 5 г жира.

**Число Поленске** – количество миллилитров 0,1 М раствора едкого кали, необходимое для нейтрализации нелетучих, нерастворимых в воде жирных кислот, полученных при строго определенных условиях из 5 г жира. Устанавливается вслед за определением летучих кислот в той же навеске жира. Выпавшие жирные кислоты переводят в спиртовой раствор и титруют 0,1 М спиртовым раствором едкого калия.

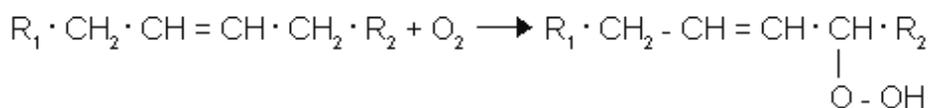
К числу летучих кислот относятся масляная, капроновая, каприловая и каприновая кислоты. Из них растворимы в воде масляная и капроновая, нерастворимы – каприловая и каприновая.

Для более точного представления о количестве содержащихся в жирах глицеридов из числа омыления вычитают кислотное число и получают так называемое **эфирное число** (ЭЧ), которое характеризует только связанные жирные кислоты.

Иногда прогоркание жиров зависит от жизнедеятельности микроорганизмов, вызывающих окисление отщепленных жирных кислот в кетоны или альдегиды. Однако чаще всего прогоркание жиров обуславливается окислением ненасыщенных жирных кислот кислородом воздуха. Последний может присоединяться по месту двойных связей, образуя перекиси.



Кислород может присоединяться также и к углеродному атому, соседнему с двойной связью, образуя гидроперекиси

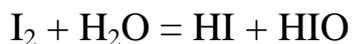


Образовавшиеся перекиси и гидроперекиси подвергаются разложению с появлением альдегидов и кетонов. Для характеристики окислительного прогоркания жира используется константа, известная под названием *перекисное число*.

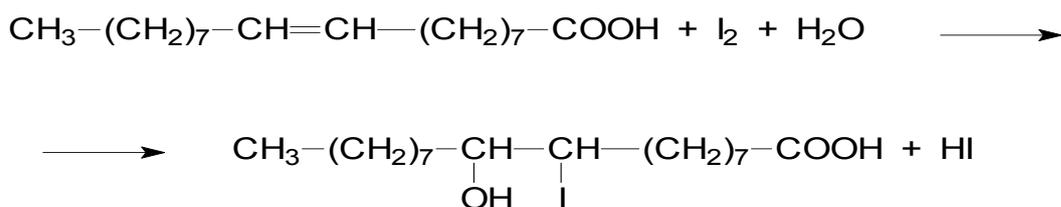
**Перекисное число** – количество граммов йода, которое может прореагировать с активным водородом перекисей, содержащихся в 100 г жира.

**Высыхание.** Намазанные тонким слоем жидкие жиры ведут себя на воздухе по-разному: одни остаются без изменения жидкими, другие, окисляясь, постепенно превращаются в прозрачную смолоподобную эластичную пленку – линоксин, нерастворимую в органических растворителях. Масла, не образующие пленку, называются **невысыхающими**. Главной составной частью в таких маслах являются глицериды олеиновой кислоты. Масла, образующие плотную пленку, называются **высыхающими**. Главной составной частью в таких маслах являются глицериды линоленовой кислоты. Масла, образующие мягкие пленки, называются **полуввысыхающими**. Главной составной частью в таких маслах являются глицериды линолевой кислоты.

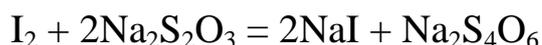
Надежным способом выявления высыхаемости масел служит определение **йодного числа**. Известно, что все непредельные кислоты, в том числе и жирные, способны присоединять по месту двойной связи галогены. Чем больше в жирных кислотах будет двойных связей, тем больше присоединится галогена. Для аналитических целей обычно используют йод. Метод определения йодного числа основан на действии спиртового раствора йода в присутствии воды:



В обычных условиях эта реакция почти не идет, но, когда образующаяся йодноватистая кислота расходуется на присоединение по месту двойных связей, реакция идет легко и быстро:



Обычно прибавляемый избыток йода оттитровывается раствором тиосульфата натрия по реакции:



**Йодное число** – количество граммов йода, которое поглощается 100 г жира.

Таким образом, по величине йодного числа можно легко установить, к какой группе по степени высыхаемости относится то или иное масло (табл. 3):

Таблица 3

#### Йодное число некоторых масел

Невысыхающие масла (тип олеиновой кислоты)	
Оливковое	80–85
Арахисовое	83–105
Миндальное	93–102
Персиковое	96–103
Касторовое	81–90
Полувсыхающие масла (тип линолевой кислоты)	
Горчичное	93–107
Кунжутное	103–112
Хлопковое	100–120
Подсолнечное	119–144
Кукурузное	111–131
Высыхающие масла (тип линоленовой кислоты)	
Маковое	131–143
Конопляное	140–175
Льняное	169–192

В табл. 4 приведены физико-химические константы наиболее часто используемых пищевых жиров.

Таблица 4

**Жировые константы основных пищевых жиров**

Жиры и масла	Число омыления	Йодное число	Число Рейхерта–Мейссля	Число Поленске	Температура, °С		Показатель преломления*
					плавления	отвердевания	
Жир молока	220–234	28–45	20–32	1,9–5,0	28–33	18–23	1,453–1,456
<i><b>Животные жиры</b></i>							
Говяжий	190–200	32–47	0,25–0,5	0,3–1,0	42–52	30–38	1,454–1,459
Бараний	192–198	32–46	0,1–1,2	0,1–0,9	44–55	32–45	1,450–1,452
Свиной	193–203	46–66	0,3–0,9	0,4–0,6	36–42	26–32	1,458–1,461
<i><b>Растительные масла</b></i>							
Подсолнечное	186–194	125–145	до 0,6	0,5–1,8	–	От –16 до –19	1,474–1,478
Хлопковое	189–199	101–116	0,2–1,0	0,2–0,7	–	От 0 до –6	1,472–1,476
Кукурузное	187–190	111–133	0–2,5	До 0,5	–	От –10 до –20	1,471–1,474
Соевое	189–195	120–140	0,5–0,8	0,8–1,1	–	От –15 до –18	1,474–1,478
Кокосовое	251–264	8–12	4–8	12–18	20–25	14–26	1,448–1,450

\* Показатель преломления измеряется для молочного, говяжьего, свиного жира и кокосового масла при температуре 40 °С, для бараньего жира – при 60 °С, для жидких растительных масел – при 20 °С.

**Гидрогенизация.** К двойным связям, помимо галогенов, легко присоединяется также водород. В результате такого присоединения жирные кислоты из ненасыщенных переходят в насыщенные; жиры при этом приобретают плотную консистенцию. Реакция гидрогенизации широко используется для получения плотных жиров из растительных масел. Среди них имеются пищевые жиры (маргарин, саломас) и жиры, используемые в фармацевтике (основы для мазей и суппозиториев) и космецевтике.

## 2.2. Экспериментальные методы исследования жиров

### 2.2.1. Растворение и эмульгирование жиров

**Материалы исследования и реактивы.** Растительное масло; этанол, бензол (ацетон); хлороформ; желчь (разведенная в два раза); раствор белка; мыло (1%-й раствор); раствор соды.

**Приборы.** Штатив с пробирками.

**Ход работы.** В четыре пробирки наливают по 5–7 капель растительного масла. В первую пробирку добавляют 2 см<sup>3</sup> этанола, во вторую – 2 см<sup>3</sup> бензола (ацетона), в третью – 2 см<sup>3</sup> хлороформа и в четвертую – 2 см<sup>3</sup> воды. Смесь в пробирках хорошо встряхивают и наблюдают изменения. В первой пробирке образуется мутный раствор, что указывает на плохую растворимость масла в спирте, во второй и третьей пробирках образуются прозрачные растворы, а в четвертой образуется нестойкая эмульсия.

Берут пять других пробирок. В первую пробирку наливают 1 см<sup>3</sup> желчи, во вторую – 1 см<sup>3</sup> раствора белка, в третью – 1 см<sup>3</sup> раствора мыла, в четвертую – 1 см<sup>3</sup> раствора соды, в пятую – 1 см<sup>3</sup> воды. В каждую пробирку добавляют по 5 капель масла. Содержимое энергично встряхивают и оставляют на 5 мин. Во всех пробирках, кроме пятой, образуется относительно устойчивая эмульсия.

### 2.2.2. Определение числа омыления

**Материалы исследования и реактивы.** Жир (животный, молочный, растительный); 3 %-й спиртовой раствор гидроксида калия; 0,5 н. раствор соляной кислоты; 1 %-й раствор фенолфталеина.

**Приборы.** Баня водяная, колба коническая на 250–300 см<sup>3</sup> с обратным холодильником.

**Ход определения.** В колбу емкостью 250–300 см<sup>3</sup> отвешивают 1–2 г (с точностью до 0,01 г) жира и приливают из бюретки 25 см<sup>3</sup> спиртового раствора КОН. Колбу соединяют с обратным воздушным холодильником и нагревают на кипящей водяной бане в течение 20 мин. По окончании омыления колбу вынимают из бани, через 1–2 мин снимают холодильник, прибавляют 5 капель фенолфталеина и горячую жидкость титруют 0,5 н. раствором НСl до исчезновения красного окрашивания (до перехода красного окрашивания в желтое).

Одновременно ставят контрольную (холостую) пробу, которая проводится в тех же условиях, что и первая, но без жира, т. е. в колбу отмеривают 25 см<sup>3</sup> спиртового раствора КОН, соединяют с холодильником, нагревают в течение 20 мин и титруют 0,5 н. раствором НСl.

Число омыления рассчитывают по формуле

$$X = ((a - b) \cdot 28) / m,$$

где  $a$  – количество 0,5 н. раствора НСl, пошедшего на титрование контрольной пробы, см<sup>3</sup>;  $b$  – количество 0,5 н. раствора НСl, пошедшего на титрование пробы с жиром, см<sup>3</sup>;  $m$  – навеска жира, г; 28 – количество едкого калия, соответствующее 1 см<sup>3</sup> 0,5 н. раствора НСl, мг.

**Пример.** Взяли навеску жира массой 1,57 г; на ее контрольное титрование пошло 20 см<sup>3</sup> 0,5 н. раствора НСl, а на титрование пробы с жиром – 7,5 см<sup>3</sup>. Следовательно, на омыление жира пошло количество 0,5 н. раствора КОН, равное разности 0,5 н. раствора НСl при титровании контрольной и опытной проб,

$$20 - 7,5 = 12,5 \text{ см}^3 \text{ 0,5 н. раствора НСl.}$$

Так как 1 см<sup>3</sup> 0,5 н. раствора КОН содержит 28,05 мг КОН, то в 12,5 см<sup>3</sup> содержится

$$12,5 \cdot 28,05 = 350,6 \text{ мг КОН.}$$

Отсюда 1 г жира омыляется

$$\frac{350,0}{1,57} = 223,3 \text{ КОН.}$$

Следовательно, для данного жира число омыления составляет 223,3 мг КОН.

### 2.2.3. Определение йодного числа

**Материалы исследования и реактивы.** Жир (животный, молочный, растительный); 96 %-й этиловый спирт; 0,2 н. спиртовой раствор йода (приготовленный из фиксанала или кристаллического свежеевозогнанного йода); 0,1 н. раствор тиосульфата натрия; 1 %-й раствор крахмала.

**Приборы.** Коническая колба емкостью 500 см<sup>3</sup>; пипетка объемом 25 см<sup>3</sup>; цилиндр вместимостью 100–200 см<sup>3</sup>.

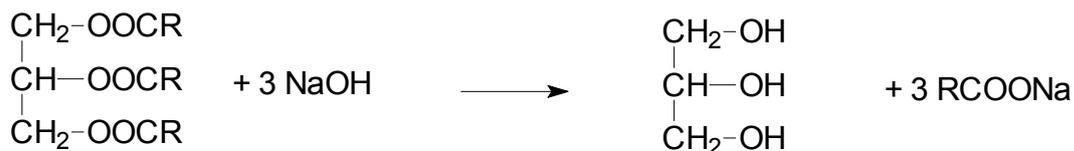
**Ход определения.** В коническую колбу емкостью 500 см<sup>3</sup> отвешивают 0,1–0,2 г жира. Отвешивание жира можно производить непосредственно в колбу (лучше по методу отвешивания по разности) или на кусочке пергаментной бумаги, который вместе с навеской помещают в колбу. Затем в колбу приливают 40 см<sup>3</sup> этилового спирта и на водяной бане с температурой 40–50 °С (колбу пробкой не закрывать!) при перемешивании растворяют жир. После растворения жира колбу вынимают из бани, охлаждают, к раствору жира приливают пипеткой 25 см<sup>3</sup> 0,2 н. спиртового раствора йода, хорошо взбалтывают и затем добавляют 200 см<sup>3</sup> дистиллированной воды. Колбу плотно закрывают пробкой. Раствор сильно взбалтывают и оставляют в покое ровно на 5 мин, после чего избыток йода оттитровывают 0,1 н. раствором тиосульфата натрия. Для связывания избытка йода титрование необходимо вести быстро, для чего сначала раствор тиосульфата натрия вливают струей до появления желтого окрашивания. Затем, прибавив 0,5 см<sup>3</sup> раствора крахмала, титруют по каплям до обесцвечивания раствора. Наряду с этим проводят контрольное титрование пробы без жира, т. е. в коническую колбу отмеривают 25 см<sup>3</sup> спиртового раствора йода, 40 см<sup>3</sup> спирта, 200 см<sup>3</sup> воды и через 5 мин титруют раствором тиосульфата натрия. Йодное число жира вычисляют по формуле

$$\text{йодное число} = ((a - b) \cdot 0,0127 \cdot 100)/m,$$

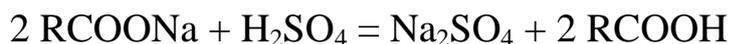
где  $a$  – количество 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование контрольной пробы, см<sup>3</sup>;  $b$  – количество 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование пробы с жиром, см<sup>3</sup>;  $m$  – навеска жира, г; 0,0127 – количество йода, соответствующее 1 см<sup>3</sup> 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, г.

## 2.2.4. Определение чисел Рейхерта–Мейссля и Поленске

Метод основан на омылении жира и перегонке освободившихся летучих растворимых и нерастворимых в воде жирных кислот. Жир обрабатывают раствором щелочи, при этом происходит гидролитическое расщепление сложноэфирной связи с образованием глицерина и солей высших жирных кислот (мыло):



Полученное мыло обрабатывают серной кислотой и летучие кислоты перегоняют с водяным паром:



Таким образом, определение чисел Рейхерта–Мейссля и Поленске ведут одновременно.

**Материалы исследования и реактивы.** Жир (животный, молочный, растительный); 50 %-й водный раствор гидроксида натрия; глицерин; раствор серной кислоты (25 см<sup>3</sup> концентрированной H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> разводят водой до 1 л). **Внимание:** при растворении кислоты следует приливать к воде!); 0,1 н. водный раствор гидроксида натрия; 1 %-й раствор фенолфталеина; 90 %-й этиловый спирт; пемза.

**Приборы.** Весы; круглодонная колба емкостью 300 см<sup>3</sup>; цилиндры объемом 5, 50 и 100 см<sup>3</sup>; мерный приемник (цилиндр) вместимостью 150 см<sup>3</sup>; мерная колба объемом 100 см<sup>3</sup>; воронка с бумажным фильтром; коническая колба емкостью 200 см<sup>3</sup>.

**Ход определения.**

### 1. Определение числа Рейхерта–Мейссля.

В круглодонную колбу емкостью 300 см<sup>3</sup> отвешивают 5 г профильтрованного жира, прибавляют 2 см<sup>3</sup> 50 %-го раствора NaOH и 20 см<sup>3</sup> глицерина. Смесь омыляют нагреванием на газовой горелке до тех пор, пока она из мутной не станет прозрачной. Затем жидкость охлаждают до температуры 80–90 °С, доливают 90 см<sup>3</sup> дистиллированной воды, нагретой до 80–90 °С. Жидкость в колбе после прибавления воды должна быть прозрачной.

В колбу опускают несколько кусочков пемзы, приливают  $50 \text{ см}^3$  раствора  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , быстро соединяют колбу с холодильником (рис. 3), подставив для собирания дистиллята мерный приемник (цилиндр) емкостью  $150 \text{ см}^3$ . Перегонку ведут, регулируя пламя горелки так, чтобы  $110 \text{ см}^3$  дистиллята получить за 18–20 мин. После перегонки дистиллят фильтруют через гладкий бумажный фильтр в мерную колбу емкостью  $100 \text{ см}^3$ . Фильтрат содержит летучие растворимые в воде жирные кислоты. Воронку с фильтром и мерный приемник (цилиндр) оставляют для определения числа Поленске.

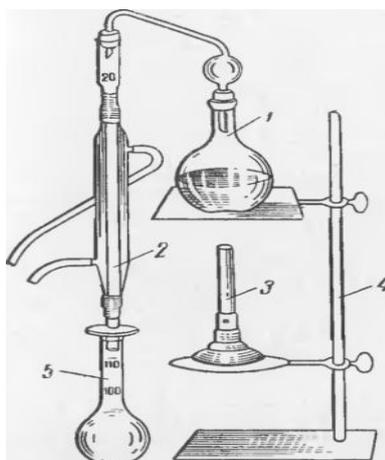


Рис. 3. Прибор для определения чисел Рейхерта–Мейссля и Поленске:  
 1 – колба с жиром; 2 – холодильник; 3 – горелка; 4 – штатив;  
 5 – колба для дистиллята

Фильтрат переливают в коническую колбу (мерную колбу ополаскивают 2–3 раза дистиллированной водой, сливая в ту же коническую колбу) и титруют 0,1 н. раствором  $\text{NaOH}$  с 3–4 каплями раствора фенолфталеина до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 2 мин.

Объем раствора щелочи ( $\text{см}^3$ ), пошедший на титрование, умножают на 1,1 (так как для титрования взяли  $100 \text{ см}^3$  фильтрата вместо отогнанных  $110 \text{ см}^3$ ) и получают количество летучих растворимых в воде жирных кислот в 5 г жира – число Рейхерта–Мейссля.

*Пример.* На титрование  $100 \text{ см}^3$  фильтрата пошло  $26 \text{ см}^3$  0,1 н. раствора  $\text{NaOH}$ . Следовательно, количество летучих растворимых в воде жирных кислот, или число Рейхерта–Мейссля,

$$26 \cdot 1,1 = 28,6 \text{ см}^3.$$

## 2. Определение числа Поленске

Разъединив верхнюю часть прибора после определения числа Рейхера–Мейссля, под холодильник подставляют мерную колбу емкостью 110 см<sup>3</sup>. Затем холодильник последовательно промывают три раза водой, пропуская её порциями по 15 см<sup>3</sup>, давая каждый раз ей полностью стечь в колбу вместимостью 110 см<sup>3</sup>. Этой же водой промывают фильтр с воронкой (подставив под нее любую колбу) и промывные воды удаляют. Воронку с фильтром переносят в чистую коническую колбу. Холодильник, мерную колбу объемом 110 см<sup>3</sup> трижды промывают 90 %-м спиртом отдельными порциями по 15 см<sup>3</sup>, пропуская их каждый раз полностью через фильтр на воронке. Находящиеся на фильтре нерастворимые кислоты растворяются.

Спиртовой раствор, полученный в конической колбе после фильтрования, титруют 0,1 н. раствором NaOH с тремя каплями раствора фенолфталеина до розовой окраски.

Объем раствора щелочи (см<sup>3</sup>), пошедший на титрование, соответствует числу Поленске.

### 2.2.5. Определение числа рефракции

Число рефракции жира определяют по показателю преломления. Показатель преломления зависит от жирно-кислотного состава триглицеридов жиров и масел. Чем больше в состав жира входит ненасыщенных кислот и чем выше их молекулярный вес, тем выше показатель преломления и число рефракции. Показатель преломления жира измеряют на специальном приборе – рефрактометре (рис. 4).

**Ход определения.** Перед началом работы через призмы рефрактометра пропускают воду температурой 41–42 °С. Откидывают верхнюю камеру призмы 12, на поверхность призмы наносят несколько капель расплавленного жира и верхнюю камеру опускают. Затем, наблюдая в окуляр 16, движениями рукоятки 15 вверх и вниз совмещают границу между темной и светлой частью поля зрения с пунктирной линией. Если граница между темной и светлой частью неотчетливая (радужная), вращением винта компенсатора 8 достигают резкости (монохроматичности). Показатель (коэффициент) преломления отсчитывают по левой шкале, для этого находят деление шкалы, совпадающее с пунктирной линией, совмещенной с границей темного и светлого поля. По показателю преломления, пользуясь табл. 5, находят число рефракции. В первом вертикальном ряду

таблицы стоят числа рефракции, соответствующие приведенным коэффициентам преломления.

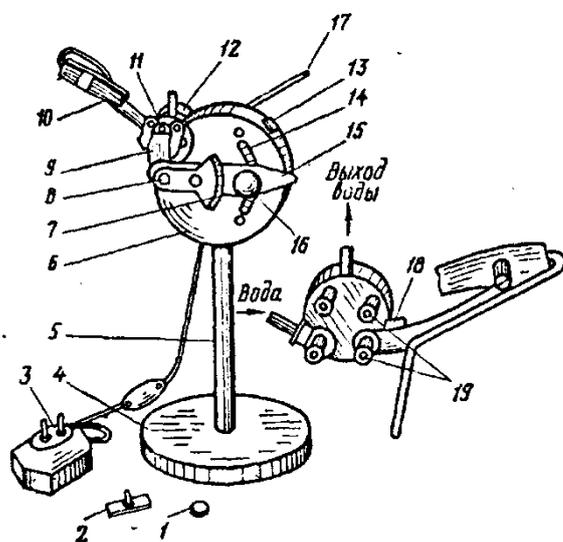


Рис. 4. Рефрактометр РПЛ-3:

- 1 – светофильтр; 2 – ширма; 3 – вилка с понижающим трансформатором; 4 – основание, 5 – колонка; 6 – корпус прибора; 7 – шкала для установки компенсатора; 8 – винт для поворота дисперсионного компенсатора; 9 – нижняя камера; 10 – осветитель; 11 – шарнир; 12 – верхняя камера; 13 – пробка; 14 – шкала сухих веществ; 15 – рукоятка; 16 – окуляр; 17 – термометр; 18 – пробка; 19 – штуцера

Для жира молока число рефракции обычно составляет 40–45, для говяжьего жира – от 45 до 50, свиного – от 49 до 52. Более низкое значение числа рефракции для жира молока объясняется его высоким числом Рейхерта–Мейссля и низким йодным числом, поскольку жировые константы находятся в определенной зависимости между собой.

Так как по рефрактометру показатель преломления отсчитывается с четвертым десятичным знаком, то значение числа рефракции в этом случае определяется следующим образом. Например, показатель преломления жира по рефрактометру равен 1,4572. В первом вертикальном ряду находим показатель преломления 1,457, которому соответствует число рефракции 46. Значение четвертого десятичного знака показателя преломления 2 находим в соответствующей графе, оно соответствует первому десятичному знаку числа рефракции 9. Следовательно, показателю преломления 1,4572 будет соответствовать число рефракции 46,9. Показателю преломления 1,4555 соответствует целое число рефракции 43, четвертому десятичному

знаку 5 соответствует цифра 4 со звездочкой, в этом случае целое число рефракции берется на единицу больше, т. е. не 43, а 44. Следовательно, показателю преломления 1,4555 соответствует число рефракции 44,4. Если найденная цифра первого десятичного знака имеет две звездочки, то целое число рефракции увеличивается на две.

Таблица 5

**Перевод величин показателя преломления жира в числа рефракции**

Показатель преломления	Число рефракции	Четвертый десятичный знак показателя преломления									
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1,450	36	7	8	0*	1*	2*	4*	5*	7*	8*	9*
1,451	38	1	2	3	5	6	7	9	0*	2*	3*
1,452	39	5	6	7	9	0*	1*	3*	4*	6*	7*
1,453	40	9	0*	1*	3*	4*	5*	7*	8*	0**	1**
1,454	42	3	4	5	7	8	0*	1*	3*	4*	6*
1,455	43	7	9	0*	2*	3*	4*	6*	7*	9*	0**
1,456	45	2	3	5	6	7	9	0*	2*	3*	4*
1,457	46	6	7	9	0*	2*	3*	5*	6*	7*	9*
1,458	48	0	2	3	5	6	8	9	1*	2*	4*
1,459	49	5	7	8	0*	1*	2*	4*	5*	7*	8*
1,460	51	0	1	3	4	6	7	9	0*	2*	3*
1,461	52	5	7	8	0*	1*	3*	4*	6*	7*	9*
1,462	54	0	2	3	5	6	8	0*	1*	3*	4*
1,463	55	6	7	9	0*	2*	3*	5*	6*	8*	9*
1,464	57	1	3	4	6	7	9	0*	2*	3*	5*
1,465	58	6	8	9	1*	2*	4*	5*	7*	8*	0**
1,466	60	2	3	5	6	8	9	1*	2*	4*	5*
1,467	61	7	8	0*	2*	3*	5*	6*	8*	9*	1**
1,468	63	2	4	5	7	8	0*	2*	3*	5*	7*
1,469	64	8	0*	1*	3*	4*	6*	7*	9*	1**	2**
1,470	66	4	5	7	8	0*	2*	3*	5*	7*	8*
1,471	68	0	1	3	4	6	7	9	1*	2*	4*

\* Целая часть числа рефракции на единицу больше.

\*\* Целая часть числа рефракции на две единицы больше.

## 2.3. Фосфолипиды, стеринны и терпены

### 2.3.1. Качественная реакция на лецитин

**Материалы исследования и реактивы.** Спиртовой раствор лецитина, выделенного из яичного желтка (получение см. ниже); спирт; насыщенный спиртовой раствор хлорида кадмия (1,5 г хлорида кадмия растворяют в 100 см<sup>3</sup> 96 %-го этилового спирта).

**Приборы.** стакан; стеклянная палочка; воронка с фильтром; штатив с пробирками; пипетки емкостью 2 и 20 см<sup>3</sup>.

**Ход определения:**

#### 1. Выделение лецитина из яичного желтка.

В стакан помещают половину яичного желтка, добавляют 20 см<sup>3</sup> горячего спирта и перемешивают стеклянной палочкой. Смесь охлаждают и фильтруют в сухую пробирку. Обработку спиртом проводят для отделения лецитина от жира: лецитин хорошо растворим в спирте, а жир в холодном спирте растворяется плохо. Спиртовой раствор лецитина используют для проведения цветных реакций на лецитин.

#### 2. Качественная реакция на лецитин с хлоридом кадмия.

В сухую пробирку помещают 2 см<sup>3</sup> спиртового раствора лецитина и добавляют 1 см<sup>3</sup> насыщенного спиртового раствора хлорида кадмия. Выпадает белый хлопьевидный осадок комплексного соединения лецитина с хлоридом кадмия. Такую реакцию не дают растворы холестерина.

### 2.3.2. Качественная реакция на холестерол

**Материалы исследования и реактивы.** Раствор холестерина в хлороформе, выделенного из мозга животных (см. ниже); гипс; хлороформ; концентрированная серная кислота; уксусный альдегид.

**Приборы.** Пробирки; пипетка объемом 1 см<sup>3</sup>.

**Ход определения.**

#### 1. Выделение холестерина из ткани мозга.

В фарфоровой ступке тщательно растирают 3–5 г ткани мозга с 6–10 г гипса до гомогенной массы. Полученную массу деревянной лопаточкой распределяют тонким слоем на стеклянной пластинке (предметном стекле) и высушивают в сушильном шкафу при темпе-

ратуре 60 °С или над пламенем горелки (стекло держат над пламенем на расстоянии 20 см и контролируют степень нагрева стекла на ощупь).

Сухую массу счищают ножом в сухую пробирку и заливают 5–6 см<sup>3</sup> хлороформа. Экстрагируют 5 мин при комнатной температуре, тщательно встряхивая содержимое пробирки, затем фильтруют в сухую пробирку, получая раствор холестерина в хлороформе.

### 2. Реакция с уксусным альдегидом (Либермана–Бурхарда).

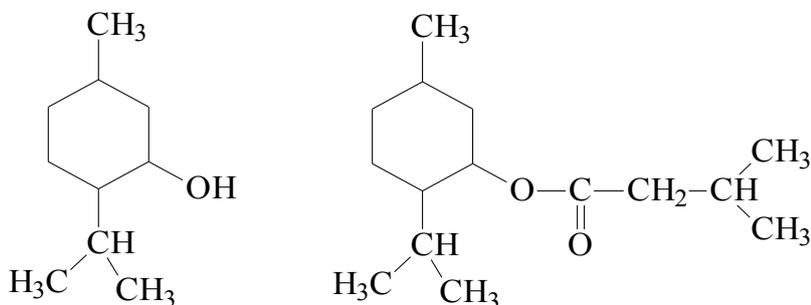
В термостойкую пробирку наливают 1–2 см<sup>3</sup> раствора холестерина в хлороформе, добавляют 10 капель уксусного альдегида и 2 капли концентрированной серной кислоты, хорошо перемешивают и наблюдают зеленое окрашивание. Под действием концентрированной серной кислоты происходит отщепление воды от вторичного спирта холестерина с последующей конденсацией непредельных углеводородов, которые с уксусным альдегидом и серной кислотой дают красное окрашивание, переходящее затем в синее и зеленое.

### 3. Реакция с серной кислотой (реакция Шиффа).

В термостойкой пробирке к 1 см<sup>3</sup> раствора холестерина в хлороформе добавляют (осторожно! по стенке пробирки!) 1 см<sup>3</sup> концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей появляется кольцо красного цвета.

## 2.3.3. Качественная реакция на ментол

Ментол – представитель моноциклических монотерпеноидов, входящий в состав эфирного масла мяты перечной (*Mentha piperita*). Он придает этому растению характерный аромат и используется в медицине как сосудорасширяющее средство.



ментол

ментилизовалерат

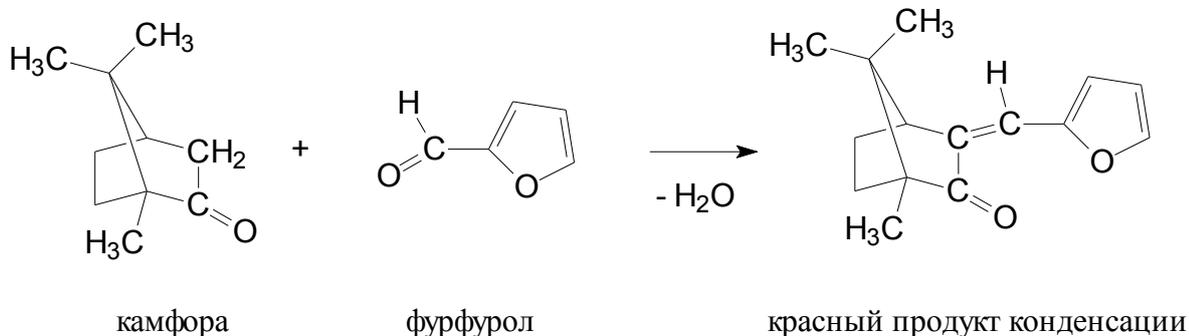
(входят в состав валидола)

**Выполнение реакции.** В термостойкой пробирке нагревают смесь нескольких кристаллов ментола (или валидола), ванилина и нескольких капель концентрированной серной кислоты. При этом появляется желтое окрашивание, переходящее при добавлении воды в малиново–красное.

### 2.3.4. Качественная реакция на камфору

Камфора – представитель бициклических монотерпеноидов, она входит в состав эфирного масла камфорного лавра (*Cinnamomum camphora*). Камфора обладает антисептическим действием, а также является стимулятором сердечной деятельности. Кроме того она используется в качестве пластификатора в производстве различных пластмасс. В настоящее время ее получают синтетически.

**Выполнение реакции.** Смешивают в термостойкой пробирке по 0,5 мл спиртовых растворов камфоры и фурфурола, добавляют к смеси три капли 10 %-го раствора гидроксида натрия и нагревают до кипения. При этом происходит конденсация и появляется красное окрашивание:

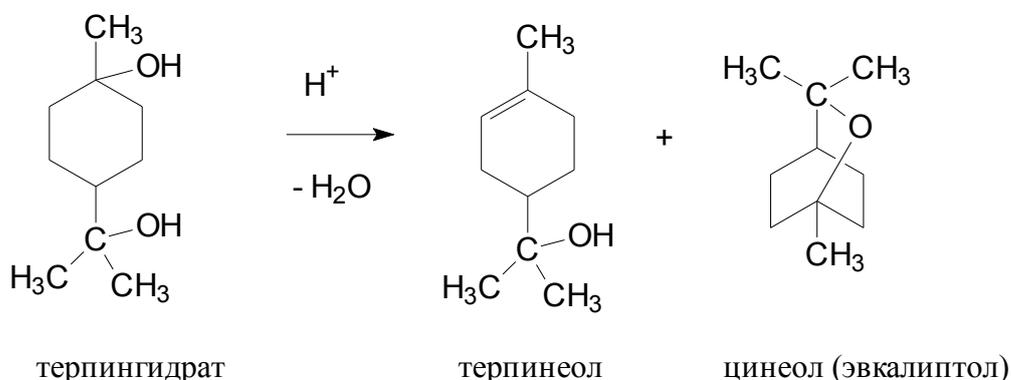


### 2.3.5. Качественная реакция на терпингидрат

Терпингидрат относится к моноциклическим монотерпеноидам. Используется в медицине в качестве отхаркивающего средства.

**Выполнение реакции.** В сухую термостойкую пробирку помещают несколько кристаллов терпингидрата и добавляют несколько капель концентрированной серной кислоты. При этом образуется мутный раствор и появляется характерный запах продуктов дегидра-

тации – терпинеола (компонент терпентинового масла) и эвкалиптола (компонент эвкалиптового масла).



## 2.4. Фракционирование липидов методом тонкослойной хроматографии

Для проведения опыта используют экстракт липидов, выделенных из биологического материала.

**Материал исследования и реактивы.** Экстракт липидов, выделенных из мышечной ткани или жира; хлороформ; этиловый спирт; система растворителей: гексан/диэтиловый эфир/ледяная уксусная кислота в соотношении 80:20:2 (73:25:2); 10 %-й водный раствор фосфорно-молибденовой кислоты.

**Приборы.** Весы; встряхиватель; колба круглодонная вместимостью 1 л; воронка Бюхнера; колба Бунзена; насос водоструйный; воронка делительная емкостью 50 см<sup>3</sup>; ротационный испаритель; пластины Силуфол; хроматографическая камера; микропипетка объемом 0,1 см<sup>3</sup>; пульверизатор; сушильный шкаф.

**Ход определения:**

### 1. Выделение липидов из мышечной ткани.

В колбу помещают 40 г измельченного мяса, заливают 130 см<sup>3</sup> этилового спирта и перемешивают в течение нескольких минут. Затем добавляют 65 см<sup>3</sup> хлороформа и встряхивают смесь на аппарате в течение 10 мин. После этого прибавляют еще 65 см<sup>3</sup> хлороформа и встряхивают еще в течение 5 мин. Далее добавляют 65 см<sup>3</sup> воды и встряхивают в течение 30 с. Содержимое сосуда фильтруют через бумажный фильтр на воронке Бюхнера. Фильтрат из колбы Бунзена переливают в делительную воронку и оставляют для разделения

слоев. Нижний хлороформный слой, содержащий липиды, сливают в предварительно взвешенную круглодонную колбу и упаривают досуха на ротационном испарителе при температуре внешнего обогрева 40–50 °С. Колбу охлаждают, взвешивают и смывают липиды с поверхности хлороформом из расчета 1 см<sup>3</sup> на 100 мг липидов и снова взвешивают для подсчета содержания липидов.

*Примечание.* Вместо мышечной ткани можно использовать жир (говяжий, свиной), сливочное или подсолнечное масло. Навеску жира необходимо растворить в хлороформе из расчета 1 см<sup>3</sup> на 100 мг образца.

## **2. Проведение хроматографии.**

Для разделения липидов используют пластинки «Силуфол» (перед употреблением их активируют путем нагревания в сушильном шкафу при температуре 105 °С в течение 45 мин). На пластинке отмечается линия старта (1 см от края) несколькими уколами иглы в слой силикагеля и на нее наносят микропипеткой 0,02 см<sup>3</sup> раствора липидов в хлороформе. Пластины устанавливают в стеклянную камеру под углом 60° и липиды разгоняют растворителем в течение 45–60 мин до подъема растворителя на 2/3 высоты пластины. Затем пластины вынимают из камеры, отмечают линию фронта растворителя и сушат под тягой до исчезновения запаха растворителя. Для проявления пятен липидов пластины опрыскивают 10 %-м водным раствором фосфорно-молибденовой кислоты, после чего нагревают в сушильном шкафу при температуре 80–100 °С в течение 5–10 мин (до появления синих пятен).

Известно, что в первом пятне от линии старта находятся фосфолипиды, во втором – неидентифицированные липиды, в третьем – холестерол, в четвертом – моноглицериды, в пятом – диглицериды, в шестом – свободные жирные кислоты, в седьмом – триглицериды и в восьмом – эфиры холестерола (стериды). Непосредственно к линии фронта примыкают углеводороды.

## **Контрольные вопросы**

1. Назовите общие свойства, присущие всем липидам.
2. На какие классы и по какому принципу классифицируются липиды?

3. Какие спирты встречаются в составе различных липидов? Напишите их структурные формулы.

4. Каковы различия между насыщенными и ненасыщенными жирными кислотами? Приведите примеры предельных и непредельных жирных кислот, входящих в состав липидов.

5. В каких формах находится нейтральный жир в организме? В чем заключается биологическая роль каждого из них?

6. Напишите формулу триглицерида, состоящего из пальмитиновой, стеариновой и линолевой жирных кислот.

7. Какими свойствами будет обладать жир, содержащий преимущественно предельные (насыщенные) жирные кислоты?

8. Какими свойствами будет обладать жир, содержащий преимущественно непредельные (ненасыщенные) жирные кислоты?

9. Какова структура и биологическая роль фосфолипидов, липопротеидов и гликолипидов?

10. К какому классу липидов относится холестерин? Напишите его формулу.

11. Перечислите качественные реакции на лецитин и холестерол.

12. Почему число омыления молочного жира выше чисел омыления животных жиров и растительных масел?

13. Объясните принцип определения йодного числа жира.

14. Расскажите о методах выделения и разделения липидов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф.** Биологическая химия. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
2. Биохимия: Учеб. / Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 784 с.
3. Биохимия с упражнениями и задачами: Учеб. / Под ред. Е.С. Северина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 384 с.
4. **Горбатова К.К., Гунькова П.И.** Биохимия молока и молочных продуктов: Учеб. / СПб.: ГИОРД, 2010. – 330 с.
5. **Комов В.П., Шведова В.Н.** Биохимия: Учеб. – М.: Дрофа, 2008. – 638 с.
6. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
7. **Шаробайко В.И.** Биохимия продуктов холодильного консервирования. – М.: Агропромиздат, 1991. – 256 с.
8. **Шлейкин А.Г., Бландов А.Н., Смирнов В.А.** Углеводы и липиды. Лабораторный практикум по биохимии: Метод. указания к лабораторным работам для студ. 3-го курса спец. 260202, 260204, 260301, 260302, 260303, 260504, 240902. – СПб.: СПбГУНиПТ, 2006. – 45 с.

### Интернет-ресурсы по биохимии

1. <http://www.anchem.ru/literature/books/muraviev/005.asp>
2. <http://lib.rushkolnik.ru/text/1149/index-1.html?page=6>
3. [http://chemanalytica.com/book/novyuy\\_spravochnik\\_khimika\\_i\\_tekhnologa/06\\_syre\\_i\\_produkty\\_promyshlennosti\\_organicheskikh\\_i\\_neorganicheskikh\\_veshchestv\\_chast\\_II/5174](http://chemanalytica.com/book/novyuy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/06_syre_i_produkty_promyshlennosti_organicheskikh_i_neorganicheskikh_veshchestv_chast_II/5174)
4. <http://www.foodingredients.ru/article-isomaltulose.html>
5. Остерман Л.А. – Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование.  
<http://medbookaide.ru/books/fold1002/book1701/p11.php>
6. Follmer et al., 2001 –  
<http://www.biochemj.org/bj/360/0217/bj3600217.htm>);
7. <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/.html>
8. "Практическая Молекулярная Биология" <http://molbiol.edu.ru>
9. <http://www.herbarius.info/special/adepts/lypos/>
10. <http://www.xumuk.ru/biologhim/070.html>

11. <http://www.xumuk.ru/biologhim/061.html>
12. [http://www.bsu.ru/content/hecadem/biochemistry/p\\_2\\_1.htm](http://www.bsu.ru/content/hecadem/biochemistry/p_2_1.htm)
13. <http://www.foodingredients.ru/article-isomaltulose.html>
14. <http://ru.wikipedia.org/wiki/>. Html
15. Биохимия. Справочник (он-лайн):  
<http://www.humbio.ru/humbio/biochem/000b6185.htm>
16. Медицинская биохимия:  
<http://www.volgmed.ru/biochem/301/edu-libr-d.php>
17. Каталог научно-образовательных ресурсов МГУ  
<http://www.protein.bio.msu.ru/biokhimiya/index.htm>
18. Новости в науке: <http://www.vesti-nauka.ru> ;
19. Новости в науке: <http://www.lenta.ru/science> ;
20. Наука, новости науки и техники для студентов:  
<http://www.sci-lib.com>
21. Наука, новости <http://www.biomolecula.ru> ;
22. Российское образование – Федеральный портал:  
<http://www.edu.ru> .
23. Все ГОСТы – [vsegost.com](http://vsegost.com)
24. Информационный портал «Пищевик»– <http://mppnik.ru>
25. Электронные книги по пищевой промышленности:  
<http://www.twirpx.com/files/food/quality/>
26. Сайт Соросовского образовательного журнала (СОЖ):  
<http://www.pereplet.ru>
27. "Практическая Молекулярная Биология" <http://molbiol.edu.ru>

### **Электронные библиотечные системы**

1. <http://lib.ifmo.ru/index.php?type=1&id2=0>
2. <http://lib.ifmo.ru/index.php?type=3&page=eljournal2&id2=6>
3. Поиск электронных книг, публикаций, ГОСТов, на сайтах научных библиотек: <http://www.tusearch.blogspot.com>
4. Электронная библиотека ИХиБТ ИТМО  
[http://ihbt.edu.ru/struktura/podrazdeleniya/biblioteka/elektronnye\\_resursy/](http://ihbt.edu.ru/struktura/podrazdeleniya/biblioteka/elektronnye_resursy/)
5. Научная электронная библиотека: <http://elibrary.ru>;
6. Библиотека. Единое окно доступа к образовательным ресурсам: <http://window.edu.ru>;
7. Российская электронная библиотека: <http://www.elbib.ru>;
8. Публичная Интернет-библиотека: <http://www.public.ru>;
9. Студенческая библиотека – онлайн: <http://www.referats.net>.

## СОДЕРЖАНИЕ

1. УГЛЕВОДЫ.....	3
1.1. Биологические функции и классификация углеводов .....	3
1.1.1. Моносахариды .....	4
1.1.2. Функциональные производные моносахаридов.....	5
1.1.3. Олигосахариды .....	7
1.1.4. Полисахариды .....	8
1.2. Качественные реакции на углеводы .....	13
1.2.1. Качественная реакция на альдозы .....	14
1.2.2. Качественная реакция на кетозы .....	15
1.2.3. Реакции на дисахариды.....	15
1.2.4. Качественная реакция на полисахариды.....	15
1.3. Количественное определение моно- и дисахаридов .....	17
1.3.1. Определение содержания глюкозы и лактозы поляриметрическим методом.....	18
1.3.2. Определение содержания глюкозы и лактозы рефрактометрическим методом .....	20
1.3.3. Определение содержания глюкозы и лактозы йодометрическим методом.....	21
1.4. Определение промежуточных продуктов обмена углеводов.....	22
1.4.1. Определение содержания молочной кислоты .....	22
1.4.2. Определение содержания пировиноградной кислоты.....	23
1.5. Выделение углеводов .....	24
1.5.1. Выделение гликогена из тканей животных .....	24
1.5.2. Выделение углеводов из растительных тканей и их разделение методом тонкослойной хроматографии .....	25
1.6. Определение активности гликолитических ферментов.....	26
1.6.1. Определение декстринолитической активности.....	26
1.6.2. Определение активности сахаразы.....	28

2. ЛИПИДЫ .....	31
2.1. Классификация, строение и биологические функции липидов .....	31
2.1.1. Основные классы липидов .....	31
2.1.2. Предшественники липидов: жирные кислоты .....	36
2.1.3. Биологические функции липидов .....	38
2.1.4. Жиры и масла.....	38
2.2. Экспериментальные методы исследования жиров.....	46
2.2.1. Растворение и эмульгирование жиров .....	46
2.2.2. Определение числа омыления.....	46
2.2.3. Определение йодного числа.....	48
2.2.4. Определение чисел Рейхерта–Мейссля и Поленске .....	49
2.2.5. Определение числа рефракции .....	51
2.3. Фосфолипиды, стеринны и терпены .....	54
2.3.1. Качественная реакция на лецитин .....	54
2.3.2. Качественная реакция на холестерол .....	54
2.3.3. Качественная реакция на ментол .....	55
2.3.4. Качественная реакция на камфору .....	56
2.3.5. Качественная реакция на терпингидрат.....	56
2.4. Фракционирование липидов методом тонкослойной хроматографии .....	57
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	60

Шлейкин Александр Герасимович  
Скворцова Наталья Николаевна  
Бландов Александр Николаевич

## **БИОХИМИЯ. ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ**

### **Часть 3. Углеводы. Липиды**

#### **Учебное пособие**

*Ответственный редактор*

Т.Г. Смирнова

*Редактор*

Р.А. Сафарова

*Компьютерная верстка*

Н.В. Гуральник

*Дизайн обложки*

Н.А. Потехина

---

Подписано в печать 17.12.2015. Формат 60×84 1/16

Усл. печ. л. 3,72. Печ. л. 4,0. Уч.-изд. л. 3,88

Тираж 100 экз. Заказ № С 64

---

Университет ИТМО. 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

Издательско-информационный комплекс  
191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

