

**Учреждение образования
«БЕЛОРУССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»**

Кафедра химии

ХИМИЯ

Лабораторный практикум

**Лабораторная работа
Обмен липидов.**

Лабораторная работа

Липиды – большая группа природных соединений, обладающих гидрофобными свойствами. В нее входят нейтральные жиры и свободные жирные кислоты, фосфолипиды, гликолипиды, воска, терпены, стероиды.

По химическому составу и месту расположения в организме различают резервные (запасные) и структурные (протоплазматические) липиды. Резервные липиды представлены на 90 % смесью триацилглицеринов и накапливаются прежде всего в подкожной клетчатке, соединительнотканых капсулах органов и соединительной ткани мышц.

В организме выполняют защитную, энергетическую, резервную функции. Состав резервного жира относительно постоянен в пределах одного вида животных и насыщен ровно настолько, чтобы находиться в жидком состоянии при температуре тела.

Протоплазматические липиды представлены в основном фосфолипидами. В комплексе с белком фосфолипиды образуют матрикс практически всех мембран клетки, где составляют до 50 % от всех липидов биологических мембран.

В процессе пищеварения жиры расщепляются до глицерина высших жирных кислот и частично образуются моно-, и диацилглицерины. Всасываясь, часть этих веществ уже в эпителии кишечника ресинтезируется в специфические жиры данного организма. Другая часть поступает в ткани и подвергается биологическому окислению до углекислого газа и воды с выделением энергии. Окисление 1 г жира составляет организму 39 кДж энергии, что в два раза больше, чем окисление 1 г углеводов. Поэтому с энергетической точки зрения жиры превосходят другие питательные соединения.

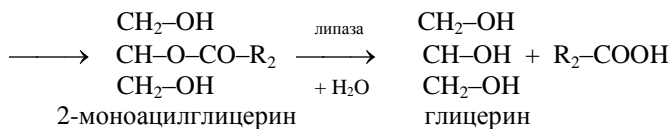
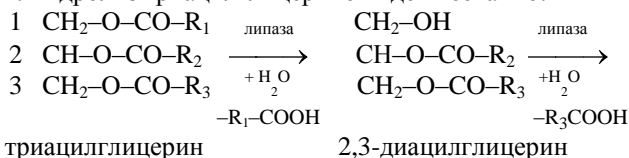
Цель занятия. Изучить процессы переваривания жиров у различных видов животных. Обнаружить продукты ферментативного гидролиза жиров. Исследовать мочу на содержание кетоновых тел и количественно определить содержание свободных жирных кислот в сыворотке крови.

Материалы и оборудование. Фенолфталеин, 0,1 % спиртовой раствор; гидроксид натрия, 0,1 н. и 10 % раствор; нитропруссид натрия, 10 % раствор; концентрированная уксусная кислота; пероксид водорода, 3 % раствор; гидроксид аммония, 25 % раствор; хлороформ;

медный реактив (состоит из 10 объемов 6,45 % раствора $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 9 объемов 1 моль/л раствора триэтаноламина и 1 объема моль/л раствора уксусной кислоты); диэтилдитиокарбомат натрия, 0,1 % раствор; стандартный раствор пальмитиновой кислоты (25,6 мг доводят хлороформом до объема 100 мл); растительное масло; раствор желчи (1:10); моча животных; сыворотка крови. Колбочки на 30 мл, пробирки с притертыми пробками, центрифужные пробирки, центрифуга, фотоэлектроколориметр, пипетки, штативы, стеклянные палочки.

Опыт1. Ферментативный гидролиз жира. Жиры, попадая в желудочно-кишечный тракт животных расщепляются в конечном итоге до глицерина и высших жирных кислот при участии панкреатических и кишечных липаз (оптимум pH 7,0-8,5). Но прежде чем подвергнуться гидролитическому расщеплению, жиры эмульгируются, образуя мелкие капельки, слипанию которых препятствуют желчные кислоты (холевая, дезоксихолевая, таурохолевая, литохолевая), выделяемые в составе желчи, соли жирных кислот, углекислый газ, образующейся в просвете кишки. Помимо эмульгирования жиров, желчные кислоты активизируют липазу и способствуют всасыванию жирных кислот, образуя с ними растворимые комплексы. В желудочном соке содержится желудочная липаза (оптимум pH 4,0-5,0), способная гидролизовать эмульгированный жир молока, она активна у молодых животных.

Гидролиз триацилглицеринов идет поэтапно:



Вначале отщепляется одна из крайних кислот и образуется диацилглицерин, затем отщепляется вторая крайняя кислота с образованием моноацилглицерина. Связи 1 и 3 гидролизуются быстро, а потом идет медленно гидролиз 2-моноголицерина.

Обнаружить свободные жирные кислоты, образующиеся в процессе ферментативного гидролиза жира, можно титрованием щелочью в присутствии фенолфталеина.

В четыре колбочки вносят компоненты согласно таблицы.

| Компоненты смеси, мл | № колбочки | | | |
|---------------------------------|------------|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Растительное масло | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Раствор желчи | - | - | 6 | 6 |
| Дистиллированная вода | 6 | 6 | - | - |
| Экстракт липазы | 2 | - | 2 | - |
| Экстракт липазы (прокипяченной) | - | 2 | - | - |

Встряхивают содержимое всех проб, предварительно закрыв их пробками. Затем прибавляют во все пробы по 2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н. раствором щелочи до появления устойчивого в течение одной минуты слабо-розового окрашивания. После титрования колбочки ставят в термостат при температуре 37–40°C на 50 минут.

По окончании времени термостатирования повторно титруют содержимое тех колбочек, где окрашивание исчезло.

Первое титрование производят, чтобы связать свободные жирные кислоты, образующиеся при хранении жира. Результаты второго титрования записывают в тетрадь и по ним судят о наличии жирных кислот, образовавшихся при гидролизе жира в различных условиях. Активность липазы определяется в мКмолях щелочи, израсходованной на титрование жирных кислот, образовавшихся под действием липазы за 1 час. Пересчет мл 0,1 н. NaOH на мКмоль производят исходя из того, что в 1000 мл 0,1 н. раствора NaOH содержится 0,1 г-экв NaOH или 100 мг-экв NaOH. Составляем пропорцию:

$$1000 \text{ мл} - 100 \text{ мг-экв NaOH}$$

$$A \text{ мл} - x \text{ мг-экв NaOH},$$

где A – это количество щелочи, израсходованной на титрование пробы.

Например: на титрование пробы в 1 колбе затрачено 1,5 мл 0,1 н. NaOH, тогда

$$x = \frac{1,5 \cdot 100}{1000} = 0,15 \text{ мг-экв.}$$

0,15 мг-экв или 150 мкг-экв, что соответствует 150 мкмоль в единицах системы СИ.

Перенести в тетрадь таблицу и оформить выводы.

1. В результате опыта установлено, что в колбочках ... и ... гидролиз жира не происходит вследствие отсутствия.....

Реакция не является специфичной, для ацетона и ацетоуксусной кислоты, так как креатинин мочи реагирует с нитропруссидом и дает аналогичное окрашивание, но в этом случае при добавлении концентрированной уксусной кислоты жидкость не окрашивается в темно-красный цвет.

В пробирку вносят 5 мл мочи, приливают 1 мл 10% раствора NaOH и 1 мл нитропруссид натрия. Содержимое пробирки перемешивают. При наличии ацетона или ацетоуксусной кислоты в растворе наблюдают оранжево-красный цвет. Добавление 2 мл концентрированной уксусной кислоты приводит к изменению окраски до темно-красной и подтверждает наличие в моче ацетона и ацетоуксусной кислоты.

Проба на β -оксимасляную кислоту. Мочу предварительно освобождают от ацетона и ацетоуксусной кислоты. Для этого в химический стаканчик наливают 10 мл мочи, 10 мл воды и несколько капель концентрированной уксусной кислоты. Содержимое стакана наполовину упаривают, вливают 1 мл 3% пероксида водорода, опять нагревают в течение 1 минуты и охлаждают. В результате такой обработки происходит окисление β -оксимасляной кислоты. Затем в стаканчик вносят 10 капель 10% раствора нитропруссид натрия и 2 мл 25% раствора NH_4OH . При наличии в моче β -оксимасляной кислоты через некоторое время в растворе образуется кольцо пурпурного цвета.

Вывод: в исследуемой моче обнаружены (не обнаружены) ацетон, β -оксимасляная и ацетоуксусная кислоты. Нужно отметить в выводе.

Опыт 3. Количественное определение свободных жирных кислот в сыворотке крови. Содержание свободных (неэтерифицированных) жирных кислот в крови в значительной степени варьирует от уровня кормления, времени приема корма, скорости утилизации и отложения жира.

Содержание неэтерифицированных жирных кислот в крови возрастает при использовании рационов с низкой энергетической ценностью, так как усиливается мобилизация жира из жировых депо организма. Повышение концентрации свободных жирных кислот в крови наблюдается при нарушении процессов окисления в печени (гепатиты), ожирении, кетозе. Снижение содержания свободных жирных кислот наблюдается при усилении почечной недостаточности. В норме содержание неэтерифицированных жирных кислот в сыворотке крови составляет для КРС 3,0–60,0 мг%, овец 20,0–40,0 мг%, лошадей 18,0–

32,0 мг%. Норма в единицах СИ рассчитывается путем умножения значения в мг% на коэффициент пересчета 0,01 и измеряется в г/л.

Метод определения свободных жирных кислот основан на том, что медные соли неэтерифицированных жирных кислот способны образовывать с диэтилдитиокарбоматом натрия окрашенные комплексные соединения, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации свободных жирных кислот.

Готовят пробирки с притертыми пробками. В первую (опытную) вносят 0,5 мл сыворотки крови, в другую (стандартную) – 1 мл стандартного раствора пальмитиновой кислоты. В опытную пробирку вносят 5 мл, а в стандартную – 4,5 мл хлороформа и по 2,5 мл медного реактива. Параллельно готовят контрольные пробы, добавляя к 5 мл хлороформа 2,5 мл медного реактива. Пробирки закрывают пробками, встряхивают и содержимое переносят в центрифужные пробирки. Центрифугируют в течение 5 мин при 2000 об/мин. В результате центрифугирования смесь в пробирках распределяется следующим образом: хлороформ, белок, вода. Верхнюю водную фазу, содержащую избыток медного реактива, удаляют пипеткой, белковую пленку сдвигают в сторону на стенку пробирки. Хлороформный слой с экстрагированными в нем жирными кислотами, переносят в пробирки, куда наливают 0,5 мл раствора диэтилдитиокарбомата натрия и перемешивают содержимое пробирок. Опытную и стандартные пробы колориметрируют с синим светофильтром против контрольной пробы. Записывают показания фотоэлектроколориметра.

Молярную концентрацию свободных жирных кислот (мкмоль/л) рассчитывают по формуле

$$C = \frac{100}{E_{cm} \cdot V} = E_{on} \cdot \frac{1000}{E_{cm} \cdot V},$$

где E_{on} – экстинкция опытной пробы;

E_c – экстинкция стандартного раствора;

V – объем сыворотки (мл).

Методику выполнения оформляют в тетрадь. Вывод: биохимический анализ показал, что содержание свободных жирных кислот в крови исследуемого животного составило ... мкмоль/л.

ЛИТЕРАТУРА

Основная

1. Барковский, Е. В. Введение в химию биогенных элементов и химический анализ: учеб. пособие / Е. В. Барковский, С. В. Ткачев, Г. Э. Атрахимович и др. – М.: Высшая школа, 1997. – 126 с.
2. Биохимия животных: Учебник для студ. зооинженер. и ветеринарн. ф-тов с/х вузов / А.В. Четкин, И.Д. Головацкий, П.А. Калиман, В.И. Воронянский /Под ред. проф. А.В.Четкина. – М., Высш. школа, 1982. – 511 с.
3. Грандберг, И.И. Органическая химия: Учебник для студентов вузов обучающихся по агрономическим специальностям 6-ое изд, стереотипное. – Дрофа:– 2004. – 672 с.
4. Князев Д. А. Неорганическая химия/ Д. А. Князев, С. Н. Смарыгин. – М.: Высш. шк., 1990. - 425 с.
5. Кононский, А.И. Биохимия животных: учебник пособие для вузов/ А. И. Кононский. – Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1980. – 432 с.
6. Химия. Лабораторный практикум: учеб. пособие/А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная, И. В. Ковалева, Т. В. Булак.–Минск: ИВЦ Минфина, 2015. – 320 с.
7. Химия. Общая химия с основами аналитической : учебно-методическое пособие / А. Р. Цыганов [и др.]. – Горки : БГСХА, 2012. – 204 с. ISBN 978-985-467-393-6.
8. Цыганов, А.Р. Биохимия практикум: учебное пособие / А.Р. Цыганов, И.В. Сучкова, И.В. Ковалева. – Минск: ИВЦ Минфина, 2007. – 150 с.
9. Цыганов, А. Р. Сборник задач и упражнений по химии : учеб. пособие / А. Р. Цыганов, О. В. Поддубная. – Минск : ИВЦ Минфина, 2013. – 234 с.

Дополнительная

1. Алешин, В.А. и др. Практикум по неорганической химии - М.: Издат. Центр "академия", 2004. – 384 с.
2. Березов, Т.Т. Биологическая химия: учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 1998. - 704 с.
3. Белясова, Н.А. Биохимия и молекулярная биология: учеб. пособие. – Минск: Книжный дом, 2004. – 416 с.
4. Введение в лабораторный практикум по неорганической химии: Учеб. пособие / В.В. Свиридов, Г.А.Попкович и др. – Мн: Выш. шк., 2003. – 96с.
5. Зайцев, С.Ю. Биохимия животных. – Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004.- 382с.
6. Кудряшов Л. С. Физико-химические и биохимические основы производства мяса и мясных продуктов. - М.: ДеЛи принт, 2008. - 160 с.
7. Ленский, А. С. Введение в бионеорганическую и биофизическую химию / А. С. Ленский. – М.: Высшая школа, 1989.
8. Метревели, Т.В. Биохимия животных. Санкт-Петербург: Изд-во «Лань», 2004.- 295с.
9. Микробиологический анализ мяса, птицы и яйцепродуктов. /Под ред. Дж. К.Мида; пер. с англ. И.С.Горожанкиной.- М.: Профессия, 2009. - 384с.
10. Николаев, А.Я. Биологическая химия: учебник / А.Я. Николаев. – М.: Мед. информ. агенство, 2004. - 566 с.
11. Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов: учебник для вузов/ Ю.А. Ершов, В.А. Попков и др. 6-е изд.,стер. М.: Высш. шк., 2007. – 560с.
12. Слесарев, В. И. Химия: основы химии живого: учебник для вузов / В. И. Слесарев. – СПб: Химиздат, 2001.
13. Угай, Я. А. Общая и неорганическая химия: учеб. для вузов. 4-е изд. - М.: Высш. шк., 2004. – 440 с.

14. Хазипов, Н.З. Биохимия животных: учебник / Н.З. Хазипов, А.Н. Аскарова. – Казань: КГАВМ, 2003. – 312 с.

Справочники

1. Кольман, Я., Рем, К.-Г. Наглядная биохимия: Пер. с нем. — М.: Мир, 2000. - 469 с.

2. Лидин, Р.А. Химические свойства неорганических веществ/ Под ред. Р.А. Лидина. – 5-е изд., стер. – М.: КолосС, 2008, - 480 с.: ил.

Составители

Поддубная Ольга Владимировна

Ковалева Ирина Владимировна

Мохова Елена Владимировна