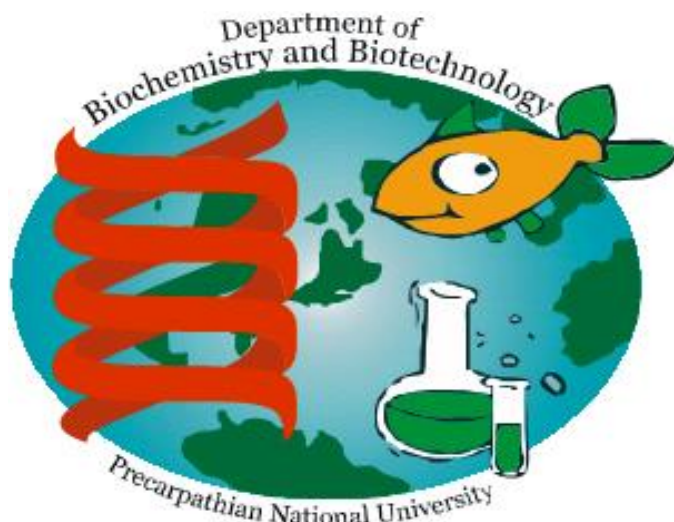


ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя  
Стефаника»  
Інститут природничих наук  
Кафедра біохімії та біотехнології



**МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ПРОВЕДЕННЯ  
ЛАБОРАТОРНИХ ЗАНЯТЬ З КУРСУ  
«БІОМОЛЕКУЛИ ЖИВОГО ОРГАНІЗМУ: ВІТАМІНИ  
ТА ПОЛІФЕНОЛИ»**



Івано-Франківськ  
-2015-

УДК 577.161+577.164+577.169+577.16.087

Методичні вказівки до проведення лабораторних занять з курсу «Біомолекули живого організму: вітаміни та поліфеноли» / під заг. ред. Н.М. Мосійчук // Методичні вказівки. 2015. – 16 с.

У посібнику викладені основні методичні рекомендації для проведення лабораторних занять з дослідження біомолекул живого організму. Наведено основні методи якісного та кількісного визначення вітамінів та фенольних сполук у лікарській рослинній сировині.

**Під заг. редакцією к.б.н. Мосійчук Н.М.**

**Автори-укладачі:** к.б.н. Мосійчук Н.М., к.б.н., доц. Байляк М.М., к.б.н., викл. Абрам О.Б., к.б.н., доц. Гусак В.В., к.б.н., доц. Господарьов Д.В.

**Схвалено до друку Вченою радою  
Інституту природничих наук**

**Рецензенти:**

Професор, завідувач кафедри та біохімії Інституту природничих наук ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника», доктор біологічних наук Луцак В.І.

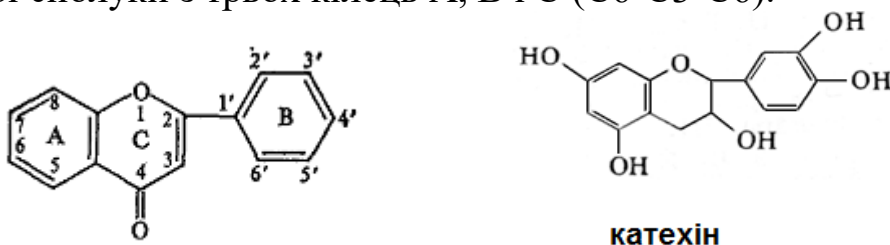
Старший лаборант кафедри біохімії та біотехнології Інституту природничих наук ДВНЗ «Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника», кандидат біологічних наук Дрогомирецька І.З.

## Лабораторна робота №1

### Якісні реакції на фенольні сполуки рослин

*Фенольні сполуки* – один з основних класів вторинних метаболітів рослин. Вони характеризуються наявністю у молекулі одного чи кількох ароматичних циклів, до яких приєднана одна чи більше гідроксильних груп. З рослин виділено понад 8 тисяч фенольних сполук, які накопичуються в глікозильованій (у формі ефірів з моносахаридами) або неглікозильованій формі у вакуолях, апопласті, сальних залозах або восковому шарі. Фенольні сполуки надають забарвлення та запах плодам та квіткам, забезпечують захист від ультрафіолету та стійкість до інфекційних захворювань.

Фенольні сполуки, в ароматичному кільці яких є більше однієї гідроксильної групи, називаються *поліфенолами*. В залежності від кількості ароматичних кілець і атомів вуглецю у бічному ланцюгу фенольні сполуки поділяються на: прості феноли, фенолокислоти, фенолоспирти, лігніни, флавоноїди та дубильні речовини. Прості феноли (наприклад, пірокатехін, гідрохінон та його ефіри) зустрічаються у рослинах рідко, зокрема вони виявлені у листках брусниці, чорниці та мучниці. Найпоширенішою групою фенольних сполук є флавоноїди, в основі структури яких лежить структура флавану – циклічної кисень-вмісної сполуки з трьох кілець А, В і С (С<sub>6</sub>-С<sub>3</sub>-С<sub>6</sub>).



Найвідомішими флавоноїдами є катехіни чаю, кверцетин яблука та цибулі, антоціанідини плодів та квіток, які надають останнім синьо-фіолетового забарвлення.

Поширеною групою поліфенолів у рослин є таніни, або дубильні речовини (названі за здатністю дубити шкіру). Найчастіше це продукти конденсації фенолкарбонових кислот (зокрема галлової) або катехінів, які утворюють поліефіри з вуглеводами (глюкозою).



Рослини з високим вмістом фенольних сполук мають широкий діапазон терапевтичного застосування, що обумовлено, насамперед, антиоксидантними властивостями фенольних сполук, тобто їх здатністю знешкоджувати вільні радикали. Препарати таких рослин укріплюють клітинні мембрани, зміцнюють капіляри, протидіють запаленню та росту мікробів.

Для якісного та кількісного визначення фенольних сполук у рослинах розроблено понад 100 методів (хроматографічні, титриметричні та фотоколориметричні методи).

### **Реактиви**

1%-ий розчин желатину в 10%-ному розчині хлориду натрію	Кристали сульфату заліза (II)
5%-ий розчин біхромату калію	5%-ний $\text{NaNO}_2$
Водні витяжки з лікарських рослин (відвари)	10%-ний $\text{AlCl}_3$
1%-ий розчин хлориду заліза (III)	1 M $\text{NaOH}$

### **Приготування відварів з рослинної сировини**

Водну екстракцію розвести у співвідношенні 1:20 (рослинний матеріал : вода). Для цього:

- 1) зважити 1 г подрібненого сухого рослинного матеріалу,
- 2) перенести наважку у колбу на 100 мл,
- 3) додати 20 мл гарячої кип'яченої води і поставити на киплячу водяну баню на 30 хв,
- 4) опісля охолодити протягом 10 хв,
- 5) профільтрувати отриману витяжку через складчастий фільтр та довести об'єм фільтрату до вихідного (до 20 мл) дистильованою водою.

Отримані відвари використати для якісного аналізу на вміст фенольних сполук. Зберігати відвари у холодильнику не більше двох днів.

### ***1) Виявлення танінів***

#### ***а) Реакція з желатином***

При взаємодії танінів з желатином утворюється білий осад або помутніння розчину внаслідок утворення желатинтанатів, які розчинні в надлишку реактиву.

### **Хід роботи**

1. У дві пробірки налити по 2 мл різних витяжок.
2. Додати по 3 краплі 1%-го розчину желатину в 10%-му  $\text{NaCl}$ .

3. Результати дослідження спостерігати на чорному тлі, порівнюючи з вихідною витяжкою.

4. Результати спостережень занести до таблиці.

#### *б) Реакція з біхроматом калію*

За наявності танінів у витяжці спостерігається потемніння розчину або випадання жовто-коричневого осаду за присутності біхромату калію.

#### **Хід роботи**

1. У дві пробірки налити по 2 мл різних витяжок.
2. Додати по 5 крапель 5%-го розчину калію біхромату.
3. Результати дослідження занести в таблицю.

#### **2) Виявлення дубильних речовин**

Всі дубильні речовини поділяють на дві групи: конденсовані і гідролізовані. При додаванні до витяжки розчину  $\text{FeCl}_3$  дубильні речовини, які піддаються гідролізу, утворюють комплекси чорно-синього забарвлення, а конденсовані – чорно-зеленого.

#### **Хід роботи**

1. У дві пробірки налити по 2 мл різних витяжок.
2. Додати по 3 краплі 1%-го розчину  $\text{FeCl}_3$ .
3. Результати спостережень занести до таблиці.

#### **3) Виявлення простих фенолів**

Прості феноли (наприклад, арбутин) у присутності заліза (II) переходять у сполуки червоно-фіолетового, а потім темно-фіолетового забарвлення.

#### **Хід роботи**

1. У дві пробірки налити по 1 мл різних витяжок.
2. Додати по одному кристалику сульфату заліза.
3. Результати спостережень занести до таблиці.

#### **4) Виявлення флавоноїдів**

Метод визначення базується на тому, що хлорид алюмінію  $\text{AlCl}_3$  утворює з кетонними або гідроксильними групами флавоноїдів стійкі, забарвлені в оранжевий колір комплекси.

#### **Хід роботи**

1. У дві пробірки налити по 0,5 мл різних витяжок.
2. Додати по 0,5 мл дистильованої води.

3. Додати по 2 каплі 5%-го  $\text{NaNO}_2$ . Інкубувати 5 хв.
4. Додати по 2 каплі 10%-го  $\text{AlCl}_3$ . Інкубувати 6 хв.
5. Додати по 0,5 мл 1 М  $\text{NaOH}$
6. Результати досліду занести в таблицю.

Рослинна сировина	Назва реактиву	Спостереження	Висновки
	Розчин желатину		
	Розчин $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$		
	Розчин $\text{FeCl}_3$		
	Крист. $\text{FeSO}_4$		
	Розчин $\text{AlCl}_3$		
	Розчин желатину		
	Розчин $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$		
	Розчин $\text{FeCl}_3$		
	Крист. $\text{FeSO}_4$		
	Розчин $\text{AlCl}_3$		

## ВІТАМІНИ

### Лабораторна робота № 2 Якісні реакції на вітаміни

Вітаміни – низькомолекулярні органічні речовини, що мають різноманітну хімічну природу та є вторинними метаболітами здебільшого рослин і грибів. Проте деякі вітаміни можуть утворюватися в організмі тварин. Розрізняють водорозчинні (вітаміни С, Р, групи В, РР) та жиророзчинні вітаміни (А, D, Е, К, F). Вітаміни відносяться до незамінних факторів харчування, оскільки не всі вони синтезуються організмом

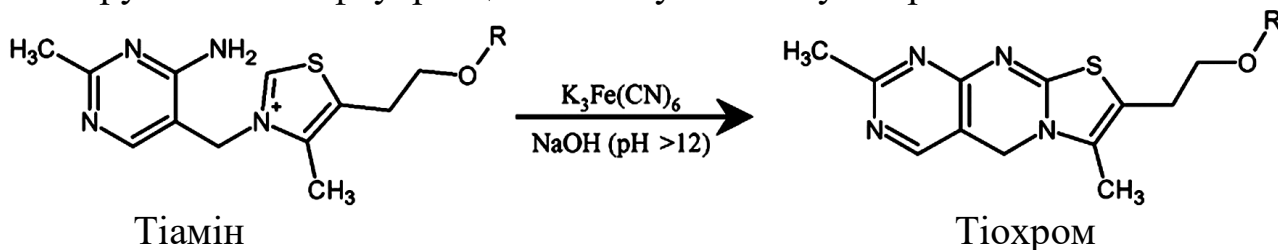
людини (окрім вітаміну D), але необхідні для нормальної життєдіяльності людського організму. Більшість вітамінів міститься в достатній кількості у звичайних продуктах харчування тваринного і рослинного походження – овочах, фруктах, соняшниковій олії, м'ясі, печінці, яйцях, різних крупах та ін. Для виявлення вітамінів у харчових продуктах і біологічних об'єктах використовуються якісні реакції.

### Реактиви

5%-ий розчин тіаміну	5%-ий розчин $K_3[Fe(CN)_6]$
5%-ий розчин піридоксину	10%-ий розчин HCl
1%-ий розчин аскорбінової кислоти	10%-ий розчин NaOH
Спиртова витяжка насіння соняшника	Льодяна оцтова кислота насичена $FeSO_4$
Спиртовий розчин вітаміну E	5%-ий розчин $FeCl_3$
0,1%-ий розчин вікасолу	1%-ий розчин $FeCl_3$
0,025%-ий розчин цистеїну	Витяжка з шипшини
Дріжджовий екстракт	Риб'ячий жир
М'ясний екстракт	

### *1) Виявлення вітаміну B<sub>1</sub>*

Вітамін B<sub>1</sub> (тіамін) відіграє важливу роль в організмі, регулюючи обмін білків, жирів і вуглеводів. У природі він зустрічається у вільному та зв'язаному станах. Продукти рослинного походження (дріжджі, злаки) багатші на цей вітамін, ніж продукти тваринного походження. Принцип реакції, яка лежить в основі наведеного методу визначення, полягає у здатності тіаміну в лужному середовищі за наявності гексаціаноферату калію ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) перетворюватись у тіохром – пігмент жовтого кольору. Останній флуоресцює в ізобутиловому спирті.

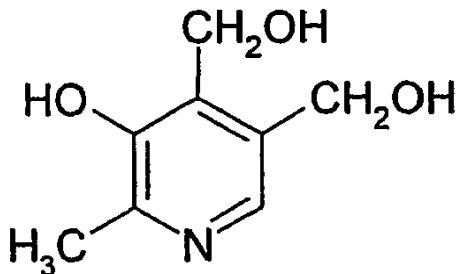


### Хід роботи

- У дві пробірки налити:
  - у першу – 0,2 мл 5%-го розчину тіаміну;
  - у другу – 0,2 мл дріжджового екстракту.
- До двох пробірок додати по 1 мл 10%-го розчину NaOH.
- Додати по 0,2 мл 5%-го розчину  $K_3[Fe(CN)_6]$ .

4. Пробірки нагріти.
5. Результати спостережень занести до таблиці.

## 2) Виявлення вітаміну B<sub>6</sub>



Вітамін B<sub>6</sub> (піридоксин) відіграє важливе значення в обміні речовин, оскільки необхідний для засвоєння білків і жирів та сприяє утворенню еритроцитів. Найбільше піридоксину міститься у м'ясі тварин, птахів, оселедці, палтусі, гречаній крупі, пшоні, хлібі з борошна грубого помелу,

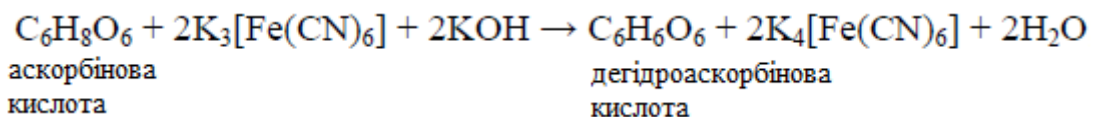
перловій і ячмінній крупах та ін. Наявність піридоксину визначають за його здатністю набувати червоно-оранжевого кольору в присутності хлориду заліза FeCl<sub>3</sub>. Реакція зумовлена утворенням комплексної солі червоного кольору типу феноляту заліза.

### Хід роботи

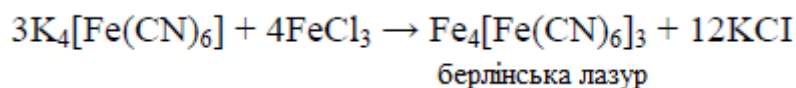
1. У дві пробірки налити:
  - у першу – 0,5 мл 5%-го розчину вітаміну піридоксину;
  - у другу – 0,5 мл екстракту з м'яса.
2. У дві пробірки додати по 0,1 мл 5 %-го розчину FeCl<sub>3</sub>.
3. Суміш струсити.
4. Результати спостережень занести до таблиці.

## 3) Відновлювальна здатність вітаміну С

Вітамін С (аскорбінова кислота) належить до водорозчинних вітамінів і відіграє важливе значення в імунному захисті та утворенні колагену – білка, який надає капілярам міцності. Аскорбінова кислота не синтезується в організмі людини і надходить лише з їжею. Багато вітаміну С міститься в лимонах, плодах шипшини, червоного перцю, смородини, зеленої цибулі. Виявлення вітаміну С ґрунтується на здатності аскорбінової кислоти відновлювати гексаціаноферат (III) калію до гексаціаноферату (II) калію. Останній утворює з ферум (III) хлоридом малорозчинну у воді сіль феруму (III) – берлінську лазур, яка випадає у вигляді темно-синього осаду.







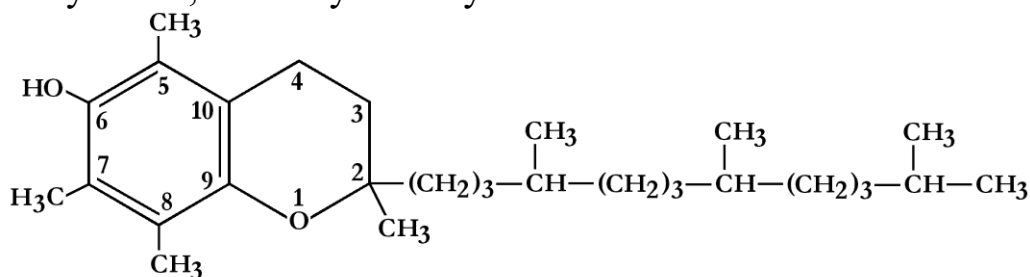
### Хід роботи

1. У дві пробірки додати:
  - у першу – 5 крапель 1%-го розчину вітаміну С;
  - у другу – 5 крапель витяжки з шипшини.
2. До двох пробірок додати по 1 краплі 10%-го NaOH.
3. До двох пробірок додати по 1 краплі 5%-го розчину  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Суміш струсити.
4. Додати по 3 краплі 10%-го розчину HCl.
5. Додати 1 краплю 1%-го розчину  $FeCl_3$ .
6. Результати спостережень занести до таблиці.

### 4) Якісна реакція на вітамін E

Вітамін E (токоферол, вітамін розмноження) є похідним циклічного спирту токолу. Відомі  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -токоферолі. Всі вони виділені в чистому вигляді з рослинних олій або отримані синтетичним шляхом. Відомо, що токоферолі виконують в організмі дві головні метаболічні функції. По-перше, вони є найбільш активними жирозчинними антиоксидантами, які захищають клітинні мембрани від окислення. По-друге, токоферолі відіграють специфічну, ще не повністю розкриту роль в обміні селену.

Найважливіші джерела вітаміну E – рослинні олії (соняшникова, бавовняна, соєва, кукурудзяна тощо), а також салат, капуста та насіння злаків. З продуктів тваринного походження вітамін E міститься в м'ясі, вершковому маслі, яєчному жовтку.



$\alpha$ -токоферол

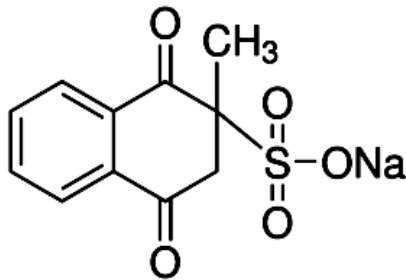
При взаємодії з  $FeCl_3$   $\alpha$ -токоферол окислюється до  $\alpha$ -токоферилхінону – сполуки, забарвленої в червоний колір.

### Хід роботи

1. У дві пробірки додати:
  - у першу – 0,5 мл спиртового розчину вітаміну E;
  - у другу – 0,5 мл спиртової витяжки насіння соняшнику.
2. До двох пробірок додати по 0,5 мл 1%-го розчину  $FeCl_3$ .
3. Вміст пробірок перемішати.

4. Результати спостережень занести до таблиці.

5) *Якісна реакція на вікасол*



Вікасол – це штучно синтезований водорозчинний аналог вітаміну К. Останній належить до групи жиророзчинних вітамінів, яка включає вітамін К<sub>1</sub> та вітамін К<sub>2</sub> – похідні хінонів, що відрізняються за хімічною будовою.

Вітамін К<sub>1</sub> (філохінон) міститься в рослинах і вперше його було виділено з люцерни. Вітамін К<sub>2</sub> (менахінон) вперше одержали із зіпсованого рибного борошна, де цей вітамін утворювався бактеріями. Вітамін К – антигеморагічний фактор, оскільки необхідний для згортання крові. За нестачі вітаміну К виникають геморагії (крововиливи).

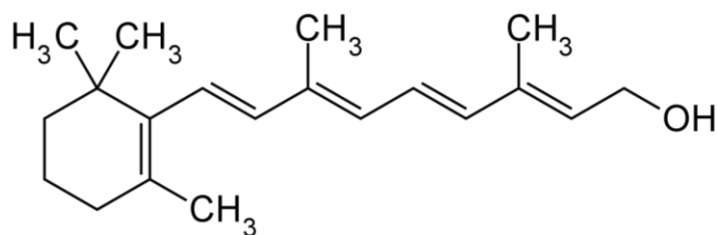
При взаємодії вікасолу з цистеїном у лужному середовищі з'являється лимонно-жовте забарвлення.

**Хід роботи**

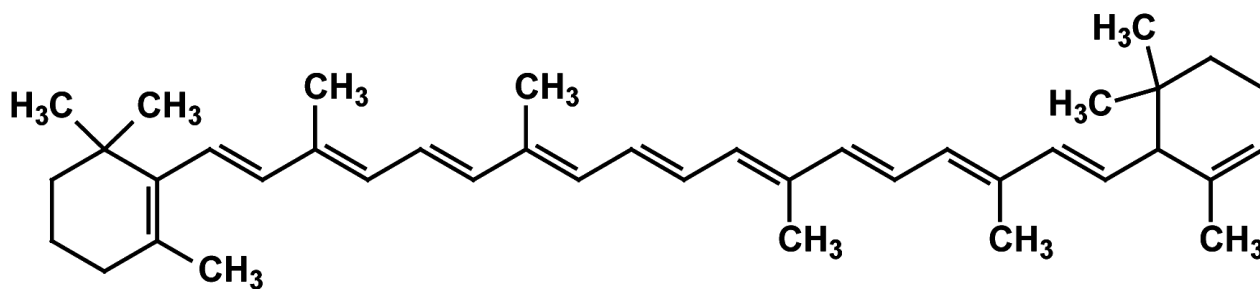
1. У пробірку додати 0,5 мл 0,1%-го водного розчину вікасолу.
2. Додати 2-3 краплі 0,025%-го розчину цистеїну.
3. Додати 1-2 краплі 10%-го розчину NaOH.
4. Результати спостережень занести до таблиці.

6) *Якісна реакція на вітамін А*

Вітамін А (ретинол, антиксерофтальмічний вітамін) належить до жиророзчинних вітамінів та в значній кількості міститься у свинячій та коров'ячій печінці, ячному жовтку, молоці, маслі, сметані, вершках. Особливо багато його в риб'ячому жирі, печінці морського окуня, тріски, палтуса. У рослинах вітамін А знаходиться у вигляді провітаміну –  $\beta$ -каротину.



ретинол



$\beta$ -каротин

**Хід роботи**

1. У пробірку додати 0,2 мл риб'ячого жиру.
2. Додати 5 крапель льодяної оцтової кислоти, насиченої сульфатом заліза (**кислоту додавати під витяжною шафою!**).
3. Результати спостережень занести до таблиці.

Досліджуваний вітамін	Спостереження	Чим зумовлена реакція
Вітамін В <sub>1</sub>		
Вітамін В <sub>6</sub>		
Вітамін С		
Вітамін Е		
Вікасол		
Вітамін А		

# Лабораторна робота № 3

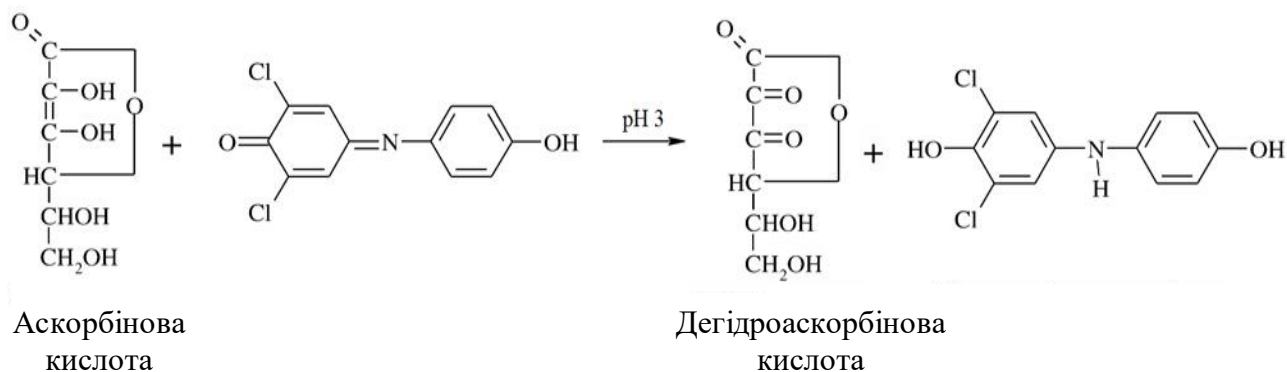
## Кількісне визначення вітамінів

### Реактиви

10%-ий розчин HCl	0,1 н розчин KMnO <sub>4</sub>
0,001 н розчин Na-солі 2,6-дихлорфеноліндофенолу	0,1%-ий розчин індигокарміну

### А) Кількісне визначення вітаміну С (за Тильманом) у овочах та фруктах

Метод кількісного визначення вітаміну С ґрунтується на його здатності відновлювати 2,6-дихлорфеноліндофенол (ДХФІФ). У лужному середовищі окислений ДХФІФ має синє забарвлення, у кислому – рожеве, а при відновленні – знебарвлюється. Досліджуваний розчин титрують у кислому середовищі (для запобігання руйнування вітаміну С) лужним розчином ДХФІФ. Доки аскорбінова кислота присутня в досліджуваному розчині, доти вона відновлює ДХФІФ, який при цьому знебарвлюється. Віддаючи електрони ДХФІФ, аскорбінова кислота окислюється і перетворюється в дегідроаскорбінову:



Після окислення всієї аскорбінової кислоти нові порції барвника, потрапляючи в кисле середовище, зумовлюють появу рожевого забарвлення. Барвник в цьому випадку не знебарвлюється, оскільки відновник (аскорбінова кислота) – відсутній.

### Хід роботи

Приготування препаратів: наважку досліджуваного матеріалу (1 г) розтерти у ступці з 2 мл 10%-го розчину HCl, додати 8 мл води і відфільтрувати.

Визначення вмісту вітаміну С у препаратах.

1. У колбу додати 2 мл фільтрату та 0,5 мл 10% розчину HCl.
2. Титрувати ДХФІФ до рожевого забарвлення, що зберігається протягом 30 сек.

3. Вміст аскорбінової кислоти у досліджуваних продуктах визначають за формулою:

$$x = \frac{0,088 \cdot A \cdot \Gamma \cdot 100}{B \cdot B}$$

де:  $x$  – вміст аскорбінової кислоти в міліграмах на 100 г продукту;  
0,088 – перерахунковий коефіцієнт (1 мл 0,001 н. ДХФІФ відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти);

A – результат титрування 0,001 н. розчином ДХФІФ, мл;

B – об'єм екстракту, взятий для титрування, 2 мл;

B – кількість продукту, взята для аналізу, 1 г;

Г – загальна кількість екстракту, 10 мл;

100 – перерахунок на 100 г продукту.

---

---

---

---

---

---

---

---

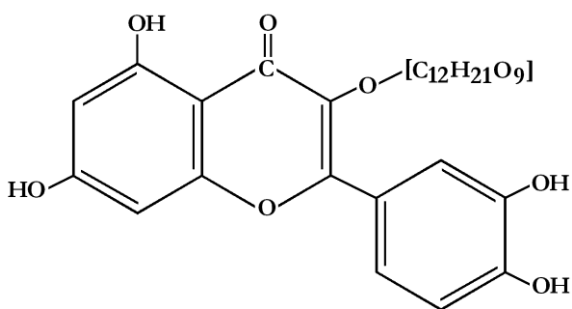
---

---

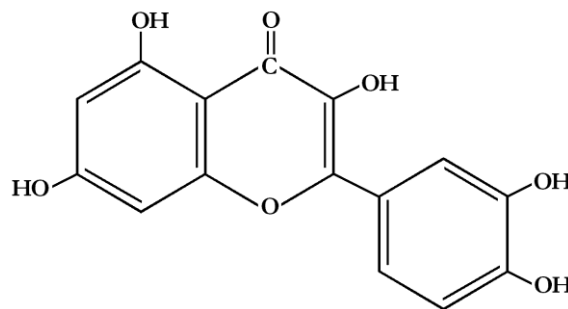
***Б) Кількісне визначення вітаміну Р за Левенталем у зеленому та чорному чаї***

Р-вітамінну активність мають більше десятка рослинних сполук, близьких за структурою, в основі якої знаходиться скелет флавану. Препаратами вітаміну Р є: цитрин (гесперидин) з цитрусових, катехіни та таніни з листя чаю, рутин з листя гречки.

В основі визначення катехінів лежить метод їх окислення перманганатом калію. Водні витяжки з листя чаю титрують 0,1 н.  $\text{KMnO}_4$  у присутності індикатора індигокарміну, який у відновленому стані має синє забарвлення, а в окисленому - жовте. Результати титрування порівнюють зі стандартним коефіцієнтом титрування за Левенталем, який дорівнює 6,4, оскільки експериментально встановлено, що 1 мл 0,1 н.  $\text{KMnO}_4$  окислює 6,4 мкг рутину.



Рутин



Кверцетин

Приготування препаратів: наважку зеленого чаю масою 0,125 г залити нагрітою до кипіння водою об'ємом 50 мл і кип'ятити протягом 5 хв у колбі зі зворотнім холодильником чи лійкою. Отриманий екстракт охолодити.

### Хід роботи

1. Для титрування дослідної проби у колбу додати 2 мл екстракту чаю.
2. Додати 25 мл дистильованої води та 2,5 мл 0,1%-го розчину індигокарміну. Після доливання індигокарміну вміст колби набуває інтенсивного синього забарвлення.
3. Ретельно перемішуючи рідину в колбі, вміст титрувати 0,1 н розчином  $\text{KMnO}_4$  до появи жовтого забарвлення через перехідні відтінки – від синього до зеленого і зеленувато-жовтого.
4. Провести титрування контрольної проби. До 27 мл дистильованої води у колбі додати 0,1%-го 2,5 мл розчину індигокарміну та титрувати 0,1 н. розчином  $\text{KMnO}_4$  як описано вище.

Різниця між об'ємами, які пішли на титрування дослідної і контрольної проби являє кількість мілілітрів 0,1 н.  $\text{KMnO}_4$ , які йдуть на окислення катехінів.

Вміст катехінів розраховують за формулою:

$$x = \frac{(a - b) \cdot 6,4 \cdot V_1 \cdot 100}{P \cdot V_2 \cdot 1000}$$

де:  $x$  – вміст вітаміну Р у препараті, %;

$a$  – кількість 0,1 н.  $\text{KMnO}_4$ , яка йде на титрування дослідного розчину препарату, мл;

$b$  – кількість 0,1 н.  $\text{KMnO}_4$ , яка йде на титрування контрольної проби, мл;

6,4 – стандартний розрахунковий коефіцієнт титрування;

$V_1$  – об'єм, в якому розчинено наважку чаю, 50 мл;

$V_2$  – об'єм розчину, взятого для титрування, 2 мл;

P – наважка, 0,125 мг.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## ЗМІСТ

<b>Лабораторна робота № 1. Якісні реакції на фенольні сполуки</b> .....	3
<i>Виявлення танінів</i> .....	4
<i>Реакція з желатином</i> .....	4
<i>Реакція з біхроматом калію</i> .....	5
<i>Виявлення дубильних речовин</i> .....	5
<i>Виявлення простих фенолів</i> .....	5
<i>Виявлення флавоноїдів</i> .....	5
<b>Лабораторна робота № 2. Якісні реакції на вітаміни</b> .....	6
<i>Виявлення вітаміну B<sub>1</sub></i> .....	7
<i>Виявлення вітаміну B<sub>6</sub></i> .....	8
<i>Відновлювальна здатність вітаміну C</i> .....	8
<i>Якісна реакція на вітамін E</i> .....	9
<i>Якісна реакція на вікасол</i> .....	10
<i>Якісна реакція на вітамін A</i> .....	10
<b>Лабораторна робота № 3. Кількісне визначення вітамінів</b> .....	12
<i>Кількісне визначення вітаміну C (за Тильманом)</i> .....	12
<i>Кількісне визначення вітаміну P за Левенталем</i> .....	13