

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего  
профессионального образования  
«ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ СИСТЕМ УПРАВЛЕНИЯ И  
И РАДИОЭЛЕКТРОНИКИ» (ТУСУР)

Кафедра радиоэлектронных технологий и экологического мониторинга (РЭТЭМ)

Е.Г. Незнамова

Методические указания к выполнению лабораторных работ по

дисциплине «Экологическая токсикология»

для направлений подготовки бакалавров 022000 «Экология и природопользование» и  
280700 «Техносферная безопасность»

## Лабораторная работа 1. Определение степени повреждения листовой пластинки токсичными выбросами автотранспорта

Задание: 1. Ознакомиться с методом диагностики здоровых и поврежденных тканей растений.

2. Собрать материал.

3. Определить степень повреждения листьев.

4. Провести сравнительный анализ повреждений листьев по видовой принадлежности растений и месту сбора материалов.

5. Оценить асимметрию листовой пластинки собранных листьев.

6. Оформить работу, сделать выводы.

**Материалы и оборудование:** листья древесных растений (20 штук), емкости для вымачивания листьев в воде (25-30С°) и растворе соляной кислоты (0.2н), линейка, подносы для раскладывания листьев.

**Краткая теоретическая часть.** Растения, произрастающие вдоль дорог, в городской черте наиболее подвержены воздействию выбросов автотранспорта. Оксиды азота, монооксид углерода в большом количестве способны вызвать нарушения фотосинтетического аппарата растения, что выражается внешне в изменении окраски листовой пластинки. Поврежденные ткани обладают способностью к потемнению, образованию рыжих, коричневатых пятен. Если нарушения не столь значительны, то внешне они не проявляются, но при определенных методах изучения возможна диагностика и малых степеней нарушения.

**Сбор материала.** Сбор материала осуществляется группой по 3 человека непосредственно перед исследованиями. Исследователи набирают не менее 20 листьев с растения одного вида. При этом отмечают: 1) место произрастания растения (в условиях города отмечают названия ближайших улиц, в полевых условиях – ближайшие населенные пункты и удаленность от них); 2) рельеф местности; 3) удаленность растения от автодороги.

**Метод диагностики здоровых и поврежденных тканей растений.**

Простейшим методом диагностики является воздействие на листовые пластинки слабым раствором соляной кислоты.

Собранные листья вначале тщательно осматривают, отмечая наличие различного рода изменений нормального облика листовой пластинки. Затем листья вымачивают 20 минут в теплой (25-30 С°) воде для размягчения тканей, после чего помещают в 0.2н раствор соляной кислоты и выдерживают в нем 15-20 минут.

Листья достают, помещают на бумагу и проводят осмотр, отмечая вновь появившиеся бурые пятна. Затем определяют процент поврежденных листовых пластинок по формуле:  $N_{п}/N_{и} * 100\%$ ,

где:  $N_{п}$  - количество поврежденных листовых пластинок,  $N_{и}$  – количество исследованных листовых пластинок.

После этого визуальным методом оценивают площадь пораженной ткани

листовых пластинок, выражая ее также в процентах относительно всей поверхности листа. Площадь пораженной ткани: рассчитывают средний процент пораженной площади листовой пластинки по всей выборке.

Оценка асимметрии листовой пластинки проводится визуальным способом – лист растения складывается пополам по центральной жилке. При выраженной асимметрии при помощи линейки проводятся измерения от центральной жилки листа вправо и влево до боковых краев листовой пластинки. Можно замерить разницу между половинками листа при сгибании листа по центральной жилке. Таким образом, в каждом случае отмечается цифровые различия правой и левой части листа. Затем определяется средний размах отклонений ширины правой и левой частей листовых пластинок всей выборки: сумма всех отклонений делится на число всех исследованных листьев.

Результаты исследований заносят в общую таблицу (табл.1). Затем проводится сравнительная оценка всех результатов, полученных участниками работы. Исследователи оформляют работу, сопровождая ее соответствующими выводами.

Таблица 1. Характеристика древостоя центральной части г.Томска по степени повреждения тканей листовой пластинки

Место сбора	Вид растения	Доля пораженных листьев, (%)	Доля пораженной ткани, (%)	Среднее значение асимметрии листовой пластинки, мм

## Лабораторная работа №2. Токсикометрическая оценка биологической активности токсикантов

**Задание:** Ознакомьтесь с теоретической частью, разберите алгоритм оценки токсичности вещества по Спирмену — Керберу. По предложенному алгоритму с измененными данными показателя «Число погибших животных» (табл.1) рассчитайте генеральную среднюю дозу эффекта  $LD_{50}$ .

**Теоретическая часть.** При испытании инсектицидов, лекарственных, радиоактивных и других биологически активных веществ обнаруживается, что особи однородной группы реагируют на одну и ту же дозу по-разному, (т.е. имеет место индивидуальная изменчивость) и что разные дозы могут вызывать одинаковый эффект у целой группы индивидов. Отсюда следует, что о силе действия на организм биологически активных веществ можно судить лишь по среднему результату.

Дозы сильнодействующих веществ испытывают на однородных группах

(мыши, крысы и другие объекты) по 6 - 10 особей в группе. На каждой группе изучают одну дозу. Обычно применяют 5 - 9 доз в возрастающем по силе действия порядке. Опыт проводят одновременно на всех группах особей. При этом учитывают число особей, у которых обнаружился эффект, и число тех, у которых видимого эффекта от действия доз не обнаружено. О среднем результате судят по обнаружению эффекта действия доз у 50% подопытных индивидов.

Определить дозу, вызвавшую видимый эффект или летальный исход у 50% подопытных индивидов, можно разными способами - графически и аналитически. Установлено, что индивидуальные реакции подопытных животных на воздействие биологически активных веществ распределяются, как правило, нормально. Зависимость между дозой и эффектом действия графически выражается в виде S-образной кривой, или *кумуляты*. Кумулята, называемая *кривой эффекта доз*, может быть получена, если по оси абсцисс откладывают дозы вещества, а по оси ординат - эффект воздействия этих доз на подопытных животных. Центральная точка кумуляты совпадает с центром распределения. Опуская из этой точки перпендикуляры на оси координат, можно определить среднюю дозу эффекта. Проще, однако, среднюю дозу эффекта определить аналитическими способами, один из которых рассматривается далее.

**Способ Спирмена — Кербера.** Достоинство этого способа заключается в том, что он позволяет не только рассчитать среднюю дозу эффекта  $M$ , но и построить доверительный интервал для генеральной средней  $\mu$ . Среднюю дозу эффекта определяют по формуле:

$$M = m - d(P_1 - 0.5), \quad (1)$$

где  $m$  — минимальная доза, вызывающая эффект у 100% подопытных индивидов;  $d$  — разница между дозами;  $P_1$  — суммарная доля реагирующих на дозы индивидов.

Среднее квадратическое отклонение вычисляют по следующей формуле:

$$S_m = d \sqrt{2P_2 - P_1^2 - P_1 - 1/12} \quad (2)$$

Здесь  $P_2$  — сумма ряда накопленных долей реагирующих на дозы индивидов.

**Пример расчетов.** На группе, состоящей из десяти лабораторных мышей, испытывали действие ядовитого вещества. Дозы яда рассчитывали в миллиграммах на 1 кг массы тела подопытных животных. Эффект действия яда учитывали по летальным исходам. Результаты опыта приведены в таблице.

В данном случае  $n=10$ ,  $d=10$ ,  $m=180$  мг/кг,  $P_1=4,0$  и  $P_2=11,8$ . Подставляем известные величины в формулы (1) и (2):  $M=LD_{50}=180-10(4,0-0,5)=180-35=145$  мг/кг, получаем  $S_m=18,75$ .

Найденные величины  $M=145$  и  $S_m=18,75$  позволяют построить доверительный интервал для генерального параметра, т. е. истинной

средней дозы эффекта:  $M \pm \Delta_m$ , где  $\Delta_m = tSm$  — величина предельной ошибки средней  $m$ .

В данном случае  $S_m = S_m / \sqrt{n} = 18,75 / \sqrt{10} = 18,75 / 3,16 = 5,93$ . Отсюда для 5%-ного уровня значимости и соответственно  $t=1,96$  ( $t$  – статистический коэффициент Стьюдента) нижняя граница доверительного интервала составляет:

$M \pm \Delta_m$ :  $145 - 1,96 \cdot 5,93 = 145 - 11,62 = 133,38 \sim 133$  мг/кг и верхняя граница  $145 + 11,62 = 156,62 \sim 157$  мг/кг.

Это означает, что с вероятностью  $P = 0,95$  можно утверждать, что генеральная средняя доза эффекта  $LD_{50}$  находится в пределах от 133 до 157 мг/кг.

Таблица 1. Результаты опытов, используемые при расчетах

Доза, мг/кг	110	120	130	140	150	160	170	180	Сумма
Число погибших животных	0	1	3	4	6	7	9	10	-
Доля погибших животных	0	0,1	0,3	0,4	0,6	0,7	0,9	1,0	4,0
Накопленная доля погибших животных	0	0,1	0,4	0,8	1,4	2,1	3,0	4,0	11,8

## Лабораторная работа №3. Определение содержания нитритов и нитратов в пищевых продуктах (вариант1)

**Задание:** 1. Ознакомьтесь с понятием «нитратные загрязнения», сделайте краткий конспект. 2. Измерьте уровень загрязнения пищевых продуктов нитратами. 3. Сравните полученные результаты с предложенными теоретически и сделайте соответствующие выводы.

**Материалы и оборудование:** нитромер, набор пищевых продуктов (овощи, фрукты), скальпель.

**Теоретическая часть.** Проблема содержания нитратов в продуктах в настоящее время актуальна. Производство удобрений составляет сейчас около 23 кг в год на человека, причем половина всех удобрений содержат соединения азота.

Азот — элемент, который стимулирует рост растений, влияет на качество плодов и содержание в них белка. Органические, и минеральные удобрения, содержащие соединения азота, в почве превращаются в нитраты ( $\text{NO}_3$ ), вместе с водой поступающие в растения. В корневой системе, стеблях, листьях, плодах нитраты восстанавливаются под воздействием ферментов до иона аммония  $\text{NH}_4^+$ , который становится основой аминокислот и далее — белков. То есть минеральный азот превращается в безвредный органический азот — компонент природных соединений. Когда же удобрений поступает слишком много, растения не справляются с их переработкой, и нитраты скапливаются в плодах, попадающих к нам на стол.

Нитраты и нитриты используют для обработки и консервирования многих пищевых продуктов, в том числе ветчины, бекона, солонины, а также некоторых сортов сыра и рыбы.

Повышенные содержания нитратов в организме подавляют дыхание клеток, что выражается в снижении работоспособности, головокружении, потере сознания. Ученые полагают, что в организме человека нитраты превращаются в нитрозоамины, которые являются канцерогенами. Человек относительно легко переносит дозу в 150 — 200 мг нитратов в день; 500 мг - предельно допустимая доза; 600 мг в день — доза токсичная для взрослого человека, а для грудного ребенка даже 10 мг нитратов могут вызвать сильное отравление. В питьевой воде допускается до 45 мг/л нитратов.

Чтобы не допустить превышения этих доз, полезно знать некоторые правила:

- основными источниками нитратов являются растительные продукты. В незрелых овощах, а также в овощах раннего созревания нитратов больше, чем в достигших нормальной уборочной зрелости;

- внутри растения нитраты распределяются неравномерно. Например, в ранних тепличных огурцах количество нитратов от плодоножки уменьшается по длине огурца на каждый сантиметр в 1,5 — 2 раза. Больше всего нитратов в кожце огурцов и кабачков;

- содержание нитратов связано с особенностями и специализацией

отдельных органов растений: типом листьев, размером листовых черешков и жилок, диаметром центрального цилиндра в корнеплодах. У зеленых листовых овощей, например, нитраты накапливаются в основном в стеблях и черешках листьев, поскольку именно сюда идет основной транспорт соединений азота.

Самым простым способом снижения количества нитратов является очищение овощей от кожицы, не использование тех частей растения, в которых происходит максимальное накопление нитратов: например, кочерыжки в капусте, стебля петрушки.

Другой способ уменьшения количества нитратов - предварительное вымачивание овощей в водных растворах

**Ход работы.** Ознакомьтесь с устройством и принципами работы нитромера.

Определите количество нитратов в предложенных образцах с помощью нитромера. На основании измерений заполните таблицу 1.

По каждому измерению в соответствии с данными, приведенными в таблице 2, сделайте выводы о качестве продуктов с точки зрения содержащихся в них нитратов.

Укажите, какое количество продукта вы можете съесть, чтобы не превысить свою допустимую суточную норму нитратов, исходя из того, что допустимая суточная норма нитратов 5 мг на 1 кг веса человека. Обоснуйте свои выводы.

Таблица 1. Качество плодоовощной продукции

Наименование образца	Показание нитромера (% , мг/кг)	Заключение о качестве продукта

Таблица 2. Минимальные и максимальные количества нитратов в овощах (мг/кг)

Культура	Количество нитратов (мг/кг)	
	мин.	макс.
Арбуз	44	572
Баклажаны	88	264
Брюква	396	528
Горошек	22	88
Горчица	1320	1760
Дыня	44	484
Кабачки	369	704
Кориандр	44	748
Кресс-салат	1320	4840
Лук	44	1320
Лук	66	880

Морковь	176	2200
Огурцы	88	528
Патиссоны	176	880

На рисунке 1 показано распределение нитратов в корнеплодах столовой свеклы, моркови, клубне картофеля и кочане капусты. Сравните результаты своих измерений и сделайте практические выводы.

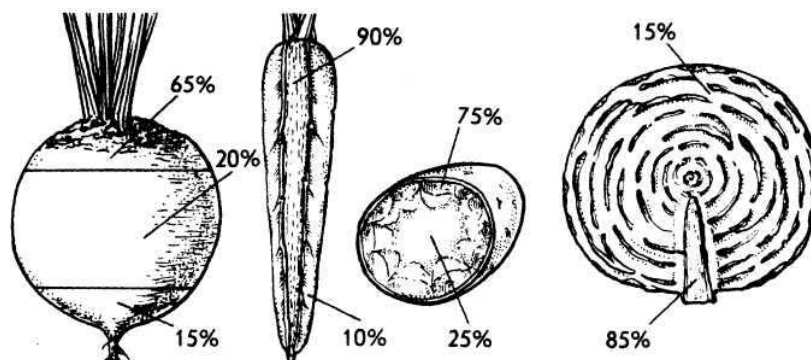


Рисунок 1. Распределение нитратов в овощах (свекле, моркови, картофеле, капусте)

### Лабораторная работа №3. Определение содержания нитритов и нитратов в пищевых продуктах (вариант2)

#### Цели работы:

1. Изучить литературу о нитратах.
2. Определить источники пищевых нитратов.
3. Рассчитать рациональный среднесуточный набор продуктов питания, не превышающий пределов допустимой концентрации питания.
4. Предложить рекомендации по рациональному питанию.

#### Краткое содержание:

Проблема нитратов активно обсуждается в настоящее время. Нитраты – соли азотной кислоты, например  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

Являются нормальными продуктами обмена азотистых веществ любого живого организма – растительного и животного, поэтому «безнитратных» продуктов в природе не бывает. Даже в организме человека в сутки образуется и используется в обменных процессах 100мг и более нитратов. Из нитратов, ежедневно попадающих в организм взрослого человека, 70% поступает с овощами, 20% - с водой и 6% - с мясом и консервированными продуктами.



Но почему же говорят об опасности нитратов? При потреблении в повышенных количествах нитраты в пищеварительном тракте частично восстанавливаются до нитритов (более токсичных соединений), а последние при поступлении в кровь могут вызвать метгемоглобинемию. Кроме того, из нитритов в присутствии аминов могут образоваться N-нитрозамины, обладающие канцерогенной активностью (способствует образованию раковых опухолей). При приеме высоких доз нитратов с питьевой водой или продуктами через 4 - 6ч появляются тошнота, одышка, посинение кожных покровов и слизистых, понос. Сопровождаются все это общей слабостью, головокружением, болями в затылочной области, сердцебиением. Первая помощь – обильное промывание желудка, прием активированного угля, солевых слабительных, свежий воздух. Какова же безопасная доля нитратов?

#### **Ход исследования:**

Допустимая суточная доза нитратов для взрослого человека составляет 320 мг в сутки.

В питьевой воде допускается присутствие нитратов до 45 мг/л. потребление питьевой воды (первые, третьи блюда, чай, кофе) составляет 1,5-2,0 л в день, т.е. с водой взрослый человек может употребить 67-90 мг нитратов в день. На продукты питания остается 230-253 мг нитратов. Для продуктов растениеводства установлены следующие предельно допустимые концентрации нитратов

**Таблица 1 Предельно допустимые концентрации нитратов в продуктах растениеводства**

<i>Продукт</i>	<i>Содержание, мг/кг</i>	<i>Продукт</i>	<i>Содержание, мг/кг</i>
Картофель	250	Лук репчатый	80
Капуста белокочанная ранняя	900	Листовые овощи (салат, петрушка, укроп)	2000
Капуста белокочанная поздняя	500	Перец сладкий	200
Морковь ранняя	400	Кабачки	400
Морковь поздняя	250	Дыни	90
Томаты	150/300	Арбузы	60
Огурцы	150/400	Виноград	60
Свекла столовая	1400	Яблоки, груши	60

Используя данные таблицы были проведены расчеты суточного набора продуктов питания и даны рекомендации по рациональному питанию.

**Результаты:**

С учетом потерь нитратов при варке овощей (до 40%) и очистке (до 10%) (т.е. до 50% нитратов теряется) был составлен рациональный среднесуточный набор продуктов питания. Содержание нитратов в наборе не превышает предельно допустимой дозы – 320 мг в сутки.

Продукт	Содержание нитратов, мг в 100 г.	Потребление, г в сутки	Содержание нитратов в порции, мг.
Картофель отварной	25	300	75
Свекла отварная	140	120	84
Капуста	50	85	43
Морковь отварная	25	80	10
Фрукты	6	200	12
Лук репчатый	8	100	8
Зелень	200	40	80

Итого: 312 мг

**Выводы:**

1. При рациональном потреблении овощей в свежем и отварном виде человек с продуктами питания практически не сможет превысить безопасную суточную дозу нитратов.
2. Если нарушить принципы рационального питания, например, питаться одними овощами, то тогда можно нарушить безопасную дозу питания почти в два раза.
3. Не рекомендуется постоянно потреблять одни и те же овощи и фрукты. Необходимо разнообразить питание.
4. Отказываться от овощей и фруктов в питании из-за опасности нитратного отравления не следует, т.к. это лишит человека необходимых витаминов.

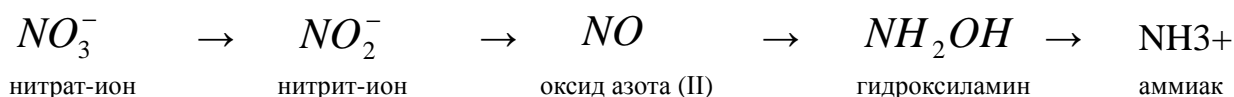
## Лабораторная работа №3. Определение содержания нитритов и нитратов в пищевых продуктах (вариант3)

### Цели работы:

1. Овладеть методикой определения нитратов.
2. Определить содержание нитратов в продуктах питания.
3. Дать рекомендации по уменьшения содержания нитратов в овощах.

### Краткое содержание:

В результате участия ферментов и углеводов в растениях происходит восстановление нитратов до аммиака через нитраты:



Образующийся аммиак взаимодействует с органическими кислотами, в результате получают аминокислоты:



Однако избыточное количество нитратов не восстанавливается и, попадая в организм человека, оказывает неблагоприятное воздействие на него. При попадании в желудочно-кишечный тракт человека нитраты превращаются в нитриты, которые вызывают отравление организма: появляется головокружение, снижается работоспособность, увеличивается содержание в крови молочной кислоты, холестерина, белков, блокируется гемоглобин, т.к. нитриты могут вступать во взаимодействие с ним, образуя метгемоглобин. В результате нарушается тканевое дыхание. При больших дозах развивается «синюха» и наступает смерть.

### Ход исследования:

На предметное стекло положить несколько срезов той или иной части растения. Затем на каждый срез нанести по одной капле 1% раствора дифениламина и следить за появлением синей окраски. Интенсивность этой окраски сравнить с таблицей и цветной шкалой, показывающей степень нуждаемости растений в азотных удобрениях. Содержание нитратов снижается с возрастом растений, а к цветению они почти исчезают.

**Таблица 1. Шкала потребности растений в азотных удобрениях**

Визуальные признаки окраски среза	Содержание нитратов
Бледно-голубоватая, очень быстро наступает обугливание	Низкое
Синяя, постепенно исчезающая	Среднее
Темно-синяя или темно-фиолетовая, быстро наступающая, устойчивая	Высокое

Бледно-голубая окраска среза от дифениламина свидетельствует об острой нужде растения в нитрат-ионах. Синяя окраска говорит о недостатке азота в растении, а темно-фиолетовая – в том, что растение обеспечено азотом.

### Результаты:

Для использования были взяты овощи и фрукты, купленные на рынке и выращенные на дачных участках. Обнаружено:

<i>Овощи, фрукты, купленные на рынке</i>	<i>Содержание нитратов</i>	<i>Овощи, фрукты, выращенные</i>	<i>Содержание нитратов</i>
Картофель	+	Картофель	+
Свекла	++	Свекла	+
Огурцы	-	Огурцы	-
Перец	+	Перец	-
Яблоки	+	Яблоки	-
Морковь	++	Морковь	+
Баклажаны	+++	Лук репчатый	+
Бананы	-	Капуста	+
Апельсины	+		

Избыток нитратов был обнаружен в овощах, купленных на рынке: баклажаны, морковь, свекла.

### Выводы:

1. Нежелательно употреблять в пищу купленные на рынке баклажаны, морковь, свеклу.
2. В продуктах питания выращенных на дачных участках содержание нитратов минимально.
3. Для уменьшения содержания нитратов в овощах и фруктах рекомендуется:
  - овощи нарезать мелкими кубиками, залить теплой водой, выдержать 10-15 минут;
  - отваривать овощи, т.к. варка снижает содержание нитратов на 40%;
  - уменьшают содержание нитратов маринование, квашение, засолка овощей.

## **Лабораторная работа №3. Определение содержания нитритов и нитратов в пищевых продуктах (вариант4)**

### **Цели работы:**

1. Изучить литературу об источниках нитратов в продуктах питания.
2. Ознакомиться с примером расчетов
3. Рассчитать массу нитратов, съеденных за обед одним человеком с продуктами питания (использовать материалы, выданные преподавателем).

### **Краткое содержание:**

Каковы же основные источники пищевых нитратов? Практически это исключительно растительные продукты. В животных продуктах (мясо, молоко) содержание нитратов весьма незначительно. Максимальное накопление нитратов происходит в период наибольшей активности растений при созревании плодов. Чаще всего максимальное содержание нитратов в растениях бывает перед началом уборки урожая. Поэтому незрелые овощи (кабачки, баклажаны) и картофель, а также овощи раннего созревания могут содержать нитратов больше, чем достигшие нормальной уборочной зрелости. Кроме того, содержание нитратов в овощах может резко увеличиться при неправильном применении азотистых удобрений (не только минеральных, но и органических). Например, при внесении их незадолго до уборки.

Известны «накопители» нитратов. К ним относятся зеленые овощи: салат, ревен, петрушка, шпинат, щавель, которые могут накапливать до 200-300 мг нитратов (это предельно допустимая концентрация), а некоторые сорта и больше. А вот в других овощах нитратов значительно меньше. Фрукты, ягоды и бахчевые содержат нитратов очень мало (меньше 10 мг в 100 г плода).

В растениях нитраты распределены неравномерно. В капусте, например, нитраты больше всего накапливаются в кочерыжке, в огурцах и редисе - в поверхностных слоях, в моркови - наоборот. В среднем при мойке и зачистке овощей и картофеля теряется 10-15% нитратов. Еще больше -- при тепловой кулинарной обработке, особенно приварке, когда теряется от 40% (свекла) до 70% (капуста, морковь) или 80% (картофель) нитратов. Поскольку нитраты химически довольно активные соединения, то при хранении овощей их содержание уменьшается за несколько месяцев на 30-50%.

### **Ход исследования:**

Рассчитать массу нитратов, съеденных с продуктами одним человеком за обед.

Обед состоял из:

Первое блюдо: борщ со свеклой и свежей капустой.

Второе блюдо: картофельное пюре и котлета.

Третье блюдо: яблочное пюре, чай с лимоном.

Мы учитывали при расчете, что овощи при варке теряют до 40%

нитратов, а так же, что овощи были очищены.

Результаты: представлены в таблице

<i>Продукт</i>	<i>Значение - <math>NO_3^-</math>, мг/кг</i>	<i>Масса продукта, съеденного 1-м человеком, мг</i>	<i>Масса <math>NO_3^-</math>, съеденного 1-м человеком, мг</i>
Свекла	1400	80	112
Капуста	500	70	35
Картофель (в борще и пюре)	250	350	87,5
Лук	80	50	4
Яблоки	60	150	9
Лимон	60	25	1,5

Итого: масса нитратов, съеденных за обедом одним человеком составила 249 мг.

#### **Выводы:**

1. За обед 1 человек съел 249 мг нитратов, что не превышает суточную норму потребления – 325 мг. Однако, нужно помнить, что есть еще завтрак и ужин.
2. Для того, чтобы предотвратить отравление нитратами необходимо:
  - овощи отваривать;
  - овощи очищать от кожицы;
  - удалять участки наибольшего скопления нитратов;
  - вымачивать овощи.

## Лабораторная работа №4. Взаимодействие белков с токсикантами (вариант 1)

**Цель:** Ознакомиться с универсальными реакциями на белки и специфическими реакциями на отдельные аминокислоты, содержащиеся в белковых растворах.

Осаждение белков солями тяжелых металлов следует отнести к необратимым реакциям осаждения, связанным с денатурацией белка. Осадки от солей тяжелых металлов, как правило, нерастворимы даже после удаления солей диализом или растворения водой. Свойством белков связывать тяжелые металлы пользуются в медицинской практике, употребляя белки (молоко, яйца) как противоядие при отравлении солями ртути (сулема), свинца (от недоброкачественной посуды) или меди (от окисления медной посуды), пока эти соли не успели всосаться. Реакции осаждения белков солями тяжелых металлов идут обычно полно (особенно в присутствии щелочных металлов), и ими пользуются не только для выделения белков из раствора, но и для освобождения жидкостей от белков.

**Задание:** 1 Ознакомьтесь с порядком выполнения работы.

2 Проведите реакции, опишите наблюдаемые явления

3 Сделайте выводы о воздействии веществ на белки с точки зрения экологической токсикологии

### 1 Осаждение белков солями тяжелых металлов

*Ход работы.* В три пробирки наливают по 1 мл 1%-го раствора белка и добавляют по 3-4 капли: в первую пробирку 7%-го раствора сульфата меди, во вторую 5%-го раствора ацетата свинца, в третью 5%-го раствора серебра. Во всех пробирках образуется осадок.

### 2. Осаждение белков органическими осадителями

Осаждение белка органическими кислотами

*Ход работы.* В 2 пробирки наливают по 2 мл 1%-го раствора белка и добавляют: в одну пробирку 4-5 капель 10%-го раствора сульфосалициловой кислоты, в другую 5-10 капель 10%-й трихлоруксусной кислоты (CCl<sub>3</sub>COOH). Выпадает осадок белка.

### 3. Осаждение белка органическими растворителями

*Ход работы.* К 1 мл 1%-го раствора белка добавляют 2 мл органического растворителя (96%-го этанола, хлороформа, ацетона или эфира) и перемешивают. Образование осадка можно усилить добавлением нескольких капель насыщенного раствора хлорида натрия.

### 4 Осаждение белков реактивами на алкалоиды

*Ход работы.* В три пробирки наливают по 1 мл 1%-го раствора белка, по 4-5 капель 1%-го раствора уксусной кислоты и по 2-3 капли: в первую пробирку 10%-го раствора пикриновой кислоты, во вторую насыщенного раствора танина, в третью 5%-го раствора железисто-синеродистого калия. Наблюдают выпадение осадка.

## **Лабораторная работа №4 Взаимодействие белков с токсикантами (вариант 2)**

### **Раздел № 1. Цветные реакции на белки и некоторые аминокислоты**

**Цель:** Ознакомиться с универсальными цветными реакциями на белки и специфическими реакциями на отдельные аминокислоты, содержащиеся в белковых растворах.

**Задание:** 1 Ознакомьтесь с порядком выполнения работы.

2 Проведите реакции, опишите наблюдаемые явления

3 Сделайте выводы о воздействии веществ на белки с точки зрения экологической токсикологии

Все многообразие цветных реакций на белки и аминокислоты можно свести к двум основным типам:

1) цветные реакции, характерные для всех белков, связанные с наличием в белках соответствующих функциональных групп или типов химической связи;

2) реакции, характерные для отдельных аминокислот, содержащих специфические функциональные группы. Сюда относится большое количество индивидуальных реакций, часть из которых будет рассмотрено.

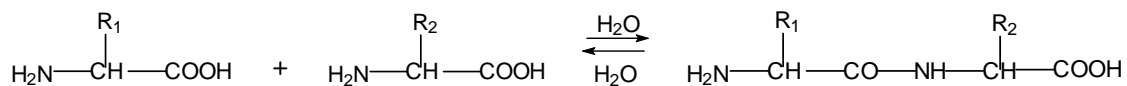
#### **1.1 Универсальные реакции на белки**

##### **а) Обнаружение в белках пептидных связей (биуретовая реакция)**

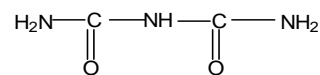
Эта реакция обусловлена наличием в белковой молекуле пептидных связей,



возникающих при взаимодействии молекул аминокислот.

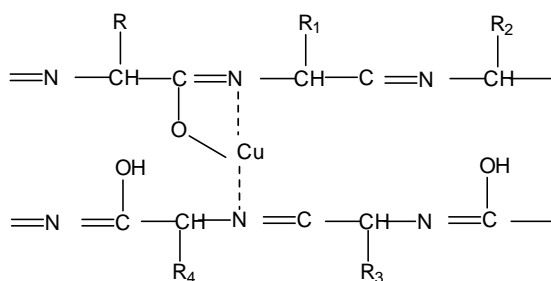


В результате взаимодействия ионов двухвалентной меди с пептидными связями в щелочной среде образуется комплексное соединение, окрашенное в красно-фиолетовый цвет. Название реакции обусловлено тем, что биурет



(продукт конденсации двух молекул мочевины в аналогичных условиях дает такой же комплекс. Биуретовую реакцию дают все соединения, содержащие в молекуле две и больше двух близкорасположенных пептидных связей.

Химизм реакции: Диенольные формы пептидных связей образуют комплексное соединение с гидроокисью меди, в котором ковалентные связи образованы за счет водорода



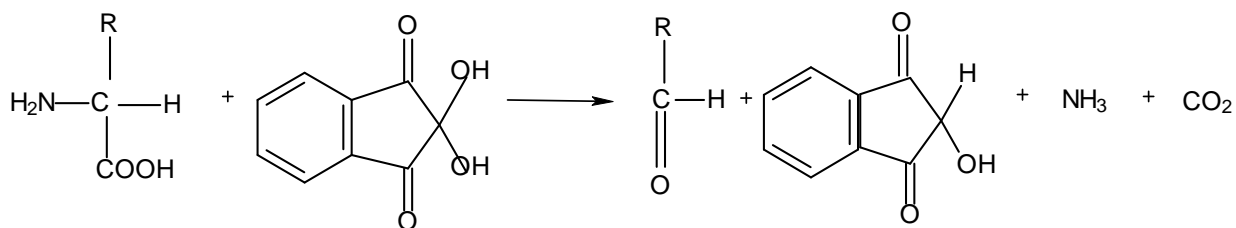
енольного гидроксила, а координационная – за счет электронных пар атомов азота иминных групп.

Ход работы: к 5 каплям исследуемого раствора белка и желатина добавляем 3 капли 10% р-ра NaOH и 1 каплю 1 % р-ра CuSO<sub>4</sub>. При наличии белка в пробирке появляется устойчивое сине-фиолетовое окрашивание.

### б) **Нингидриновая реакция на белки и природные α- аминокислоты**

Нингидриновая реакция является универсальной реакцией на все аминокислоты, имеющие группу в α-положении. Растворы белка и пептидов, имеющие свободную α-аминогруппу также как и α-аминокислоты при нагревании с нингидрином дают синее или фиолетовое окрашивание. В этой реакции α- аминокислоты и пептиды окисляются нингидрином и подвергаются окислительному дезаминированию, декарбоксилированию с образованием аммиака, альдегида и CO<sub>2</sub>. Нингидрин восстанавливается и связывается со второй молекулой нингидрина посредством молекулы аммиака, образуя продукты конденсации, окрашенные в синий, фиолетовый, красный, а в случае пролина – в желтый цвет.

Химизм реакции:

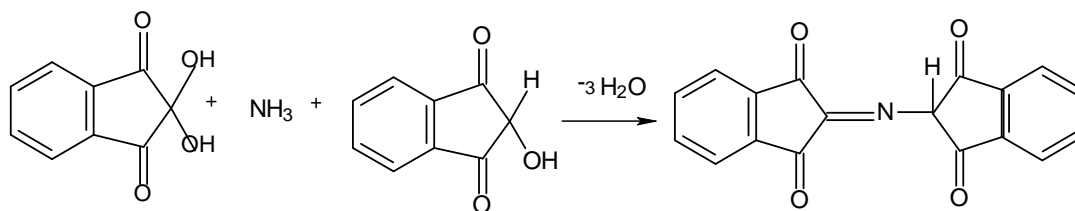


*α-аминокислота*

*нингидрин*

*альдегид*

*восстановленная форма нингидрина (гидриндантин)*



*продукт конденсации сине-фиолетового цвета*

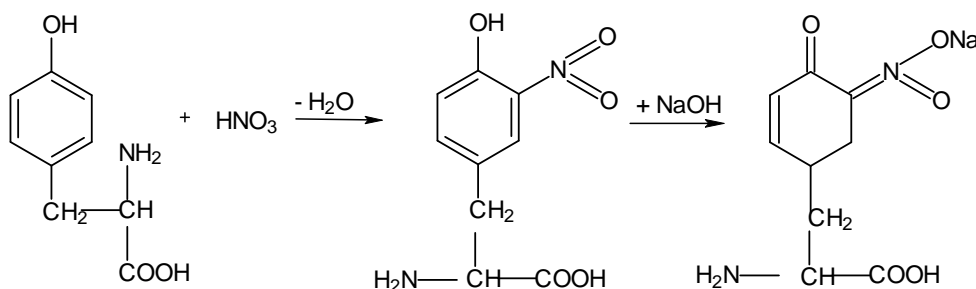
Ход работы: к 5 каплям исследуемого раствора белка и желатина добавляем 5 капель 0,1% водного раствора нингидрина и кипятим 1-2 мин. Появляется розово-фиолетовое или сине-фиолетовое окрашивание. При стоянии раствор синее. Окрашивание указывает на наличие α - аминокислот.

## 2.2 Цветные реакции на отдельные аминокислоты

### в) Ксантепротеиновая реакция на циклические аминокислоты

Эта реакция основана на образовании нитропроизводных ароматических аминокислот (фенилаланин, тирозин, триптофан). Нитропроизводные имеют желтую окраску в кислой среде и оранжевую – в нейтральной и щелочных средах (*ксантос* – по-гречески – желтый).

Химизм реакции:



*тирозин*

*нитропроизводное тирозина желтого цвета pH < 7,0*

*хиноидное производное оранжево-желтого цвета pH > 7,0*

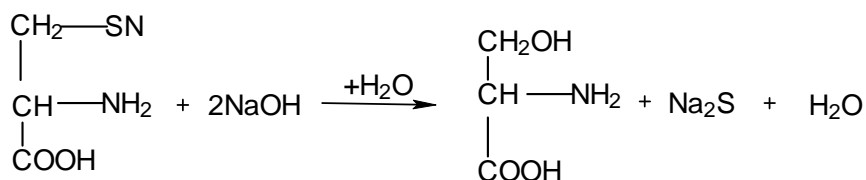
Ход работы: берут 2 пробирки и наливают в первую 5 капель раствора яичного белка, а во вторую – 5 капель раствора желатина. Затем в обе пробирки

добавляют по 3-5 капель концентрированной азотной кислоты. Выпадает осадок свернувшегося белка (осадочная реакция). Если осадок содержит ароматические аминокислоты, то при нагревании осадок будет желтеть и растворяться. После охлаждения в каждую пробирку добавляют по каплям 10 % р-р NaOH до появления оранжевого окрашивания вследствие образования натриевой соли динитротирозина.

### г) Реакция Фоля на аминокислоты, содержащие серу

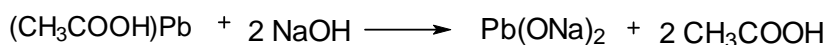
Реакция обусловлена наличием в белке серу содержащих аминокислот – цистеина, цистина. Она основана на отщеплении сероводорода от аминокислот при щелочном гидролизе белка с образованием сульфида натрия.

#### Химизм реакции:



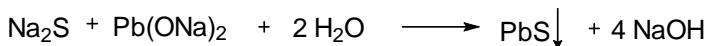
*цистеин*

*серин*



*ацетат свинца*

*плюмбит натрия*



*черный осадок*

Ход работы: берем 2 пробирки и наливаем в первую 5 капель р-ра яичного белка, а во вторую 5 капель желатина. Затем в обе пробирки добавляем по 5 капель реактива Фоля. Интенсивно кипятим обе пробирки. Через 1-2 мин после кипячения при наличии серосодержащих кислот появляется осадок черного цвета.

### 2.3 Практическая значимость работы

Практическое применение цветных реакций имеет следующие аспекты:

1. Универсальные реакции на белки (нингидриновая, биуретовая) используются для качественного обнаружения белков.
2. Универсальные реакции на белки используются также для количественного определения содержания белков в растворах, продуктах, биологических жидкостях, животных тканях.
3. Специфические цветные реакции применяются для идентификации аминокислотного состава исследуемого белка, а также для качественного обнаружения белка, если соответствующая группировка входит в его состав.

## 2.4 Оформление работы

*Результаты опытов занести в таблицу:*

Наименование реакций	Реагент	Субстрат	Наблюдаемое окрашивание	Чем обусловлена реакция
Биуретовая		а) яичный белок б) желатин		
Нингидриновая		а) яичный белок б) желатин		
Ксантопротеиновая		а) яичный белок б) желатин		
Реакция Фоля		а) яичный белок б) желатин		

### **Раздел № 2. Физико-химические свойства белков, реакции осаждения белков**

**Цель:** Изучить характер реакций осаждения белков в растворах. Объяснить механизм действия осаждающих агентов на основании знания физико-химических свойств белка.

Существует различное количество разнообразных реакций осаждения белков. В зависимости от применяемого осадителя они могут быть обратимыми и необратимыми. Реагенты, которые осаждают белки, могут оказывать:

4. дегидратирующее действие (разрушают гидратную оболочку), вследствие чего теряется один из факторов их устойчивости: частица белка легко коагулирует и выпадает в осадок;

5. снятие заряда белковой частицы (второй фактор устойчивости).

Максимальное осаждение белка происходит при уничтожении обоих факторов устойчивости. При этом осадки белков могут быть вновь растворены, т.е. белки сохраняют свои нативные свойства и осаждение будет обратимым.

**б.** образование нерастворимых комплексов. При необратимом осаждении происходит денатурация белка, сопровождающаяся деградацией пространственной конфигурацией молекулы белка (четвертичной, третичной и частично вторичной структуры) и осадок белка не может быть вновь переведен в раствор. К необратимым реакциям относятся осаждения белка: при кипячении ( $> 80^{\circ}\text{C}$ ); концентрированными минеральными ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$  и т.д.) и органическими (сульфосалициловая, пикриновая, трихлоруксусная) кислотами; солями тяжелых металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.).

## 2.1 Обратимое и необратимое осаждение белков

Ход работы: в 5 пробирок наливают по 5 капель раствора белка.

а) *в первой пробирке проводим денатурацию кипячением.* При кипячении белок денатурирует и выпадает в осадок в нейтральной или слабокислой среде. К белку прибавляют 1 каплю 1% раствора уксусной кислоты для слабокислой реакции и нагревают – наблюдаем выпадение осадка;

б) *во второй пробирке смотрим действие неорганических кислот (проба Геллера).* Реакция основана на деградации и денатурации белка при действии крепкой азотной кислоты. К белку добавляем по каплям до появления осадка концентрированную азотную кислоту;

в) *в третьей пробирке проводим осаждение белка органической кислотой.* К белку добавляем 1 – 2 капли 20% раствора сульфасалициловой кислоты. Выпадает осадок, при небольшом количестве белка появляется муть или опалесценция;

г) *в четвертой пробирке проводим денатурацию солями тяжелых металлов.* Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов адсорбируют их, образуя нерастворимые солеобразные и комплексные соединения. Способность некоторых аминокислот и белков прочно связывать ионы тяжелых металлов используется в медицинской практике как противоядие при отравлении солями ртути, меди, свинца и др. К белку добавляем по каплям 2% раствор сернокислой меди до осаждения белка.

д) *в пятой пробирке проводим обратимое осаждение белка (высаливание).* Высаливанием называется осаждение белков с помощью больших концентраций нейтральных солей:  $\text{NaCl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KCl}$  и др. (соли щелочных и щелочно-земельных металлов). Реакция обусловлена дегидротацией макромолекул белка с одновременной нейтрализацией электрического заряда. При высаливании белок почти не теряет своих нативных свойств. Этот метод нашел широкое применение для получения белков в кристаллическом состоянии. К белку добавляем равный объем (5– 6) капель насыщенного раствора сульфата аммония и хорошо перемешивают; выпадает осадок.

Во все 5 пробирок с осадками добавляем дистиллированную воду в объеме, равном содержимому пробирок, перемешиваем и проверяем, растворились ли осадки. Соли тяжелых металлов, минеральные и сильные органические кислоты необратимо денатурируют белки, поэтому осадки не растворяются в воде. Сульфат аммония, как водоотнимающее средство, высаливает белок обратимо, и осадок растворяется при добавлении воды.

## 2.2 Практическая значимость работы

1) На явлениях денатурации белков основаны приемы и методы асептики и антисептики, дезинфекции в лечебной и практической медицине; пастеризация и консервирование продуктов в пищевой промышленности;

2) Фракционированное осаждение белков лежит в основе приготовления лечебных сывороток и биологических препаратов в иммунологии и фармации; разделения и очистки белков в препаративной биохимии.

## 2.3 Оформление работы

Записать осадочные реакции белков. Результаты опытов занести в таблицу.

№ пробирки	Субстрат	Осаждающий реагент	Характер и цвет осадка	Обратимое или необратимое осаждение	Чем обусловлена реакция и ее особенности

## Использованная литература:

1. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. вузов — 4-е изд., перераб. и доп. - М.: Высш.шк., 1990. 332с.

2. Незнамова Е.Г. Экологическая токсикология: учебное пособие.- Томск: ТУСУР, 2007. 133с.

3. Резяпкин В.И., Слышенков В.С., Заводник И.Б. и др. Лабораторный практикум по биофизике и биохимии.- Режим доступа:  
[http://edu.grsu.by/books/lab\\_pr\\_bio/index.php/belki/laboratornaya-rabota-2-reaktsii-osazhdeniya-belkov](http://edu.grsu.by/books/lab_pr_bio/index.php/belki/laboratornaya-rabota-2-reaktsii-osazhdeniya-belkov)