

NGUYỄN QUANG VINH
BÙI PHƯƠNG THUẬN - PHAN TUẤN NGHĨA

Thực tập hóa sinh học



NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI

NGUYỄN QUANG VINH
BÙI PHƯƠNG THUẬN – PHAN TUẤN NGHĨA

THỰC TẬP
HÓA SINH HỌC
(In lần thứ 2)

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI

Mục lục

Lời nói đầu	v
Chương 1. Protein	1
1.1. Tính chất lưỡng tính của axit amin và protein.....	2
1.2. Tính chất keo của dung dịch protein	3
1.2.1. Phản ứng kết tủa thuận nghịch protein	4
1.2.2. Sự biến tính protein	5
1.3. Các phản ứng màu của axit amin và protein.....	9
1.3.1. Phản ứng biure	9
1.3.2. Phản ứng với ninhydrin	11
1.3.3. Phản ứng với axit nitơ	13
1.3.4. Phản ứng xantoprotein của các axit amin vòng	14
1.3.5. Phản ứng Pauli để phát hiện histidin và tirozin.....	15
1.3.6. Phản ứng Millon đặc trưng cho tirozin	16
1.3.7. Phản ứng Adamkiewicz đặc trưng cho triptophan:	17
1.3.8. Phản ứng của prolin với thuốc thử izatin	19
1.3.9. Phản ứng của các axit amin chứa lưu huỳnh (Phản ứng Folia)	20
1.3.10. Phản ứng Sakaguchi đặc trưng cho acginin	21
1.4. Định lượng axit amin và protein.....	23
1.4.1. Xác định nitơ amin (N-amin) bằng phương pháp chuẩn độ focmol.....	23
1.4.2. Định lượng protein	25

Chương 2. Enzim	33
2.1. Các thí nghiệm định tính một số enzym	33
2.1.1. Pepsin (peptit-peptidohidrolaz).....	33
2.1.2. Amilaz của nước bọt.....	34
2.1.3. Ureaz	35
2.1.4. Peroxidaz.....	36
2.2. Tính chất của enzym.....	36
2.2.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của amilaz nước bọt	36
2.2.2. Ảnh hưởng của pH môi trường đến hoạt độ của enzym - Xác định pH thích hợp của amilaz trong nước bọt.....	37
2.2.3. Ảnh hưởng của các chất kích thích và các chất kìm hãm.....	39
2.2.4. Tính đặc hiệu của enzym	39
2.3. Xác định hoạt độ của một số enzym.	40
2.3.1. Xác định hoạt độ catalaz.	40
2.3.2. Xác định hoạt độ α - amilaz theo phương pháp Wohlgemuth	42
2.3.3. Xác định hoạt độ ureaz theo phương pháp chuẩn độ.....	43
2.3.4. Xác định hoạt độ proteinaz theo phương pháp Anson cải tiến.....	45
2.3.5. Xác định hoạt độ của lipaz	47
Chương 3. Sacarit	48
3.1. Các phản ứng định tính	49
3.1.1. Các phản ứng của mono - và disacarit	49
3.1.2. Phản ứng định tính polisacarit.....	58

3.2. Định lượng sacarit	61
3.2.1. Định lượng đường khử theo phương pháp Bertrand	62
3.2.2. Định lượng tinh bột	64
Chương 4. Axit nucleic	66
4.1. Các tính chất lí - hoá của axit nucleic	66
4.1.1. Tính tan của axit nucleic	66
4.1.2. Các phản ứng màu của axit nucleic	67
4.2. Định lượng axit nucleic.....	70
4.2.1. Định lượng ADN	70
4.2.2. Định lượng ARN	72
Chương 5. Lipit.....	74
5.1. Mỡ trung tính (triacylglycerin)	74
5.1.1. Tính chất lý hoá của mỡ.....	74
5.1.2. Phản ứng phân biệt các thành phần cấu tạo của mỡ.....	75
5.1.3. Xác định các chỉ số của mỡ.....	78
5.2. Lipit.....	81
5.2.1. Tách lécitin từ lòng đỏ trứng.....	82
5.2.2. Một số tính chất của lécitin	82
5.3. Định lượng Lipit.....	83
Chương 6. Vitamin.....	86
6.1. Các phản ứng định tính của vitamin.....	86
6.1.1. Các vitamin hòa tan trong chất béo	86
6.1.2. Các vitamin hòa tan trong nước	90
6.2. Định lượng vitamin.....	96
6.2.1. Định lượng vitamin C theo phương pháp chuẩn độ.	96

6.2.2. Định lượng vitamin A.....	97
Chương 7. Hocmon	99
7.1. Hocmon động vật.....	100
7.1.1. Hocmon steroid.....	100
7.1.2. Hocmon là peptit và protein	102
7.1.3. Hocmon là dẫn xuất của axit amin	103
7.2. Hocmon thực vật	106
7.2.1. Các hocmon là dẫn xuất indol.....	106
7.2.2. Giberelin.....	109
Chương 8. Các chất thực vật thứ sinh	113
8.1. Glicozit	113
8.1.1. Định tính glicozit acbutin trong lá trúc đào	114
8.1.2. Glicozit trong lá đào (<i>Prunus persica</i> L. Batsch).....	115
8.2. Ankaloit	119
8.2.1. Một số phản ứng định tính.....	119
8.2.2. Định lượng ankaloit.....	120
8.3. Các hợp chất phenol.....	122
Phụ lục	126
1. Một số chất chỉ thị màu để đo pH	126
2. Chuẩn bị dung dịch Folin (để xác định protein)	127
3. Chuẩn bị giấy Picrô - sôđê	127
4. Bảng chuyển đổi lượng đồng thành lượng đường (mg) theo phương pháp Bectrand	128
Tài liệu tham khảo chính	129

Lời nói đầu

Giáo trình "Thực tập hóa sinh học" được biên soạn để dùng làm tài liệu thực hành của chương trình "Hóa sinh học đại cương" ở bậc đại học. Mục đích chính của các bài thí nghiệm trong giáo trình này là minh họa và củng cố phần kiến thức lý thuyết sinh viên đã được học. Ngoài ra, giáo trình cũng còn nhằm giúp sinh viên làm quen với một số phương pháp định lượng thường dùng trong các phòng thí nghiệm Hóa sinh.

Trên cơ sở giáo trình "Thực tập hóa sinh học" do tập thể các cán bộ giảng dạy của Bộ môn Hóa Sinh, Khoa Sinh học, trường Đại học Tổng hợp Hà Nội (nay là trường Đại học Khoa học Tự nhiên) biên soạn trước đây và qua thực tế sử dụng cùng với kinh nghiệm hướng dẫn thực tập và điều kiện phòng thí nghiệm hiện tại, chúng tôi đã chọn lọc và biên soạn lại giáo trình, có sửa đổi và bổ sung một số phần mới như: hocmon, các chất thực vật thứ sinh... nhằm đáp ứng yêu cầu đào tạo hiện nay.

Giáo trình được phân thành tám chương, giới thiệu về tám nhóm hợp chất quan trọng của các tế bào và cơ thể sống như: protein, enzym, sacarit, axit nucleic, lipit... Về cơ bản, mỗi chương bao gồm 2 phần chính: phần định tính và phần định lượng các nhóm chất trên. Trong đó, chịu trách nhiệm về: Chương I - Bùi Phương Thuận, Nguyễn Quang Vinh; Chương II - Phan Tuấn Nghĩa, Nguyễn Quang Vinh; Chương III - Bùi

Phương Thuận; Chương IV, VI - Phan Tuấn Nghĩa; Chương V, VII, VIII - Nguyễn Quang Vinh.

Chúng tôi hy vọng cuốn sách này cũng là tài liệu tham khảo tốt cho những người làm công tác thuộc lĩnh vực Hóa sinh học và các lĩnh vực liên quan khác.

Những thiếu sót của giáo trình là không thể tránh khỏi. Chúng tôi rất mong nhận được các ý kiến đóng góp từ các nhà chuyên môn, những người sử dụng và các bạn đọc để có thể cải tiến tốt hơn ở lần xuất bản tiếp theo.

Các tác giả

Chương 1

Protein

Protein là những hợp chất hữu cơ phân tử lớn do nhiều gốc α -L-axit amin kết hợp với nhau bằng liên kết peptit.

Trong cơ thể sống protein thực hiện nhiều chức năng quan trọng khác nhau như: là nguyên liệu chính tạo nên tế bào (vai trò cấu trúc), xúc tác sinh học, vận tải, chuyển động, điều hòa, bảo vệ...

Các protein được chia thành hai nhóm lớn: protein đơn giản và protein phức tạp. Thuộc loại protein đơn giản là những đại phân tử khi thủy phân chỉ nhận được các axit amin. Trong thành phần của các protein phức tạp, ngoài các axit amin, còn có các chất không phải protein như: axit nucleic, sacarit, lipit, sắc tố, ion kim loại...

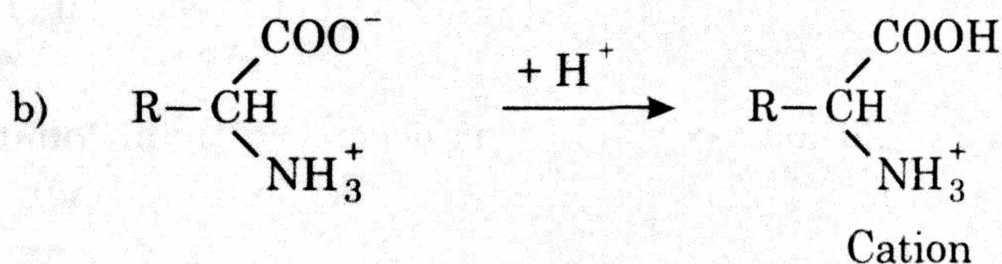
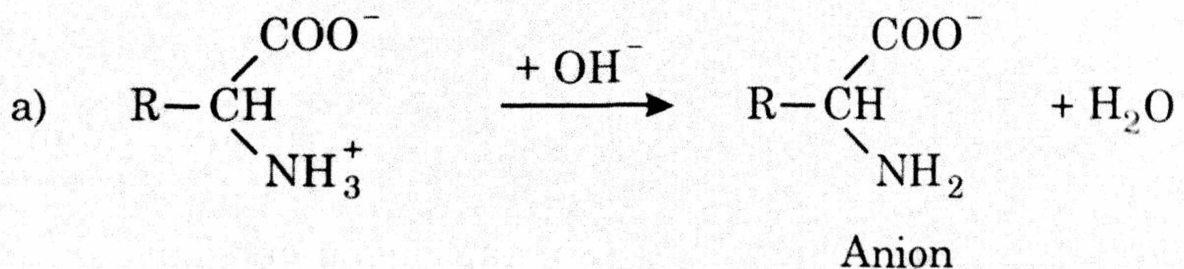
Có khoảng 20 loại axit amin tham gia vào thành phân tử của các protein khác nhau. Các axit amin khác nhau phân biệt bởi mạch bên (gốc R) của chúng.

Tính chất của một protein phụ thuộc vào thành phần, trình tự sắp xếp của các gốc axit amin và cấu hình không gian của nó. Tùy thuộc trong phân tử protein có những gốc axit amin nào, những nhóm hóa học nào mà chúng sẽ biểu hiện khác nhau trong dung dịch (về tính tan, khả năng tích điện), và khi tác dụng với những chất riêng biệt (thuốc thử) sẽ cho những sản

phẩm màu đặc trưng. Các tính chất trên được ứng dụng để định tính và định lượng protein.

1.1 Tính chất lưỡng tính của axit amin và protein

Trong phân tử của axit amin và protein có các nhóm cacboxyl và nhóm amin tự do nên chúng có tính chất lưỡng tính. Trong dung dịch nước, chỉ một số rất ít (0,1%) phân tử axit amin ở dạng không tích điện, còn phần lớn ở dạng ion lưỡng cực. Tùy thuộc vào pH môi trường mà axit amin sẽ có tính chất của một axit hay một bazơ. Trong môi trường kiềm, axit amin cho proton (tính chất của axit) và trở thành anion. Trong môi trường axit, nó nhận proton (tính chất bazơ) và trở thành cation. Sơ đồ phản ứng như sau:



Vì vậy, khi ở trong điện trường, tùy theo pH môi trường mà axit amin hoặc protein có thể di chuyển về anốt hoặc catốt. Giá trị pH mà tại đó chúng không di chuyển về cực nào cả được gọi là pH đẳng điện (pHi). Ở pH đẳng điện, dung dịch protein rất không bền, dễ dàng bị kết tủa. Tính chất này được ứng dụng để xác định điểm đẳng điện của protein.

Xác định điểm đẳng điện của casein

Hóa chất: Axit axetic (CH_3COOH) 0,1 N; dung dịch casein 0,4% trong natri axetat (CH_3COONa) 0,1 N.

Cách làm: Lấy 5 ống nghiệm sạch và khô. Đánh số thứ tự từ I đến V. Cho vào mỗi ống một lượng axit axetic và nước cất như được ghi trong bảng, lắc đều. Sau đó cho vào mỗi ống 1ml dung dịch casein 0,4% trong natri axetat 0,1 N. Sau khi đã hòa lẫn các dung dịch trên trong mỗi ống sẽ có một pH xác định. Quan sát ta thấy ở một số ống dung dịch vẫn đục, để một lúc kết tủa lắng xuống đáy. Ống nào có nhiều kết tủa nhất nghĩa là pH ở đây tương ứng với điểm đẳng điện của casein. Ghi mức độ kết tủa ở các ống bằng dấu +.

Số TT ống nghiệm	Số ml CH_3COOH 0,1 N	Số ml nước	Số ml casein 0,4% trong CH_3COONa 0,1 N	pH	Mức độ kết tủa
1	0,1	8,9	1,0	5,6	
2	0,2	8,8	1,0	5,3	
3	1,0	8,0	1,0	4,7	
4	4,0	5,0	1,0	4,1	
5	8,0	1,0	1,0	3,8	

1.2 Tính chất keo của dung dịch protein

Protein trong dung dịch là một loại keo ưa nước. Chúng bền vững được trong dung dịch là nhờ màng nước hay lớp vỏ hydrat bao quanh phân tử (được tạo thành do các nhóm phân cực tích điện trên bề mặt hấp phụ các phân tử nước lưỡng cực) và nhờ các phân tử tích điện cùng dấu có xu hướng đẩy nhau, do đó

ngăn chặn sự kết dính của các phân tử keo. Các yếu tố vật lý, hóa học có khả năng tác dụng lên màng nước hoặc làm ảnh hưởng đến trạng thái tích điện của các phân tử keo sẽ làm ảnh hưởng đến tính tan của protein, có thể làm chúng bị kết tủa.

Sự kết tủa này có thể là thuận nghịch hay không thuận nghịch. Người ta thường dùng phương pháp kết tủa thuận nghịch để tách protein và enzym ở dạng tinh thể hoặc dạng bột.

1.2.1 Phản ứng kết tủa thuận nghịch protein

Các dung môi hữu cơ (etanol, axeton) ở nhiệt độ thấp ($0^{\circ} - 4^{\circ}\text{C}$), các muối của kim loại kiềm và kiềm thổ (thường dùng là $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Na_2SO_4 , NaCl , MgSO_4) có tác dụng gây kết tủa thuận nghịch protein. Sau đó nếu loại bỏ nhanh các yếu tố gây kết tủa, protein trở về trạng thái dung dịch keo bền.

a) *Kết tủa bằng muối trung tính*

Các muối này vừa làm trung hòa điện (do các ion tác dụng tương hỗ với các nhóm tích điện trái dấu), vừa loại bỏ lớp vỏ hydrat của phân tử keo. Các protein khác nhau có thể bị kết tủa với nồng độ muối khác nhau, vì vậy có thể dùng muối để tách riêng các protein khỏi hỗn hợp của chúng. Ví dụ, dùng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ có độ bão hòa khác nhau để tách riêng anbumin và globulin trong lòng trắng trứng.

Nguyên liệu và hóa chất: Lòng trắng trứng không pha loãng, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa, NaCl bão hòa, tinh thể $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 5ml lòng trắng trứng, 5ml dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa, lắc đều, xuất hiện kết tủa globulin. Để 5 phút, lọc (thấm ướt trước giấy lọc bằng dung dịch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Cho vào dịch lọc 3g tinh thể $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (nếu dịch lọc là 4ml), lắc, anbumin kết tủa, lọc, thu lấy kết tủa. Cho riêng kết tủa của globulin và anbumin vào các ống nghiệm tương ứng, thêm vào mỗi ống khoảng 2-3ml nước cất, lắc, quan sát, so sánh sự hòa tan kết tủa.

b) Kết tủa bằng dung môi hữu cơ

Nếu tiến hành kết tủa protein ở nhiệt độ thấp ($0^\circ - 4^\circ\text{C}$) và lấy kết tủa nhanh ra khỏi dung môi, protein không bị biến tính (có thể hòa tan lại). Nếu nhiệt độ cao hơn ($20-30^\circ\text{C}$) và kết tủa bị giữ lâu trong dung môi hữu cơ, protein bị biến tính.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 1%, etanol 96%, axeton, NaCl bão hòa.

Cách làm: Lấy 2 ống nghiệm, cho vào mỗi ống 1ml dung dịch lòng trắng trứng 1%, làm lạnh trong nước đá. Thêm vào ống I: 2ml etanol 96% lạnh, ống II: 2ml axeton lạnh, quan sát; cho thêm vào cả hai ống vài giọt dung dịch NaCl bão hòa, kết tủa lắng xuống đáy ống nhanh hơn. Sau khi kết tủa đã lắng xuống đáy ống, gạn bỏ lớp dung môi, thêm nước vào, lắc đều, kết tủa sẽ tan.

Làm lại thí nghiệm ở nhiệt độ $20^\circ - 30^\circ\text{C}$, quan sát và so sánh với thí nghiệm trên.

1.2.2 Sự biến tính protein

Sự "biến tính" protein là thuật ngữ dùng để chỉ những sự biến đổi cấu trúc của phân tử protein (từ cấu trúc bậc 2 trở lên) dẫn đến thay đổi một số tính chất như tính tan, hoạt tính sinh học... Khi bị biến tính protein thường đông tụ thành dạng keo không hòa tan. Điều này được thấy rõ khi sự biến tính xảy ra ở pH đẳng điện. Nếu sự biến tính xảy ra ở các pH khác pH_i (trong

môi trường kiềm mạnh hoặc axit mạnh), phân tử protein ở dạng tích điện nên không bị đông tụ lại mà vẫn ở dạng hòa tan trong dung dịch. Tuy nhiên, nếu dùng muối trung tính để trung hòa điện, protein sẽ bị đông tụ thành kết tủa.

Các yếu tố có thể gây biến tính protein là nhiệt độ cao, axit vô cơ đặc, một số axit hữu cơ, kiềm đặc, muối kim loại nặng nồng độ cao... Một số chất khác như ure, guanidin... có tác dụng phá hủy liên kết hidro, do đó cũng phá hủy cấu trúc bậc 2, 3, 4 của phân tử protein.

a) Tác dụng của nhiệt độ cao

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 5% (đã được lọc qua giấy lọc nhiều lần), axit axetic 1% và 10%, NaOH 10%, NaCl bão hòa.

Cách làm: Cho vào 5 ống nghiệm, mỗi ống 2ml dung dịch lòng trắng trứng 5%.

Đun ống I và theo dõi sự kết tủa dần dần của protein.

Thêm vào ống II: 1 giọt axit axetic 1% và đun. Kết tủa protein sẽ hình thành nhanh và nhiều hơn.

Thêm vào ống III: 0,5ml axit axetic 10% và ống IV: 0,5ml NaOH 10%. Đun, quan sát thấy kết tủa protein không hình thành trong khi đun và ngay cả khi sôi.

Thêm vào ống V: 0,5ml axit axetic 10% và 3-4 giọt NaCl bão hòa. Đun, protein kết tủa nhanh nhiều.

So sánh và giải thích sự khác biệt về mức độ kết tủa trong các ống.

b) Kết tủa protein bằng axit vô cơ đặc

Các axit vô cơ đặc như axit nitric hay axit sunfuric có tác dụng lấy nước và thay đổi trạng thái tích điện của phân tử keo,

do đó gây kết tủa protein. Nếu kéo dài thời gian tác dụng, kết tủa bị hòa tan dần dần. Với axit nitric kết tủa bị hòa tan chậm.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 5%, HNO_3 đặc.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1ml HNO_3 đặc, sau đó cầm nghiêng ống, giở cẩn thận theo thành ống 2ml dung dịch lòng trắng trứng 5%. Ở mặt tiếp xúc của hai chất lỏng tạo thành kết tủa protein.

c) **Kết tủa protein bằng axit hữu cơ**

Khi cho axit tricloaxetic hay axit sunfosalisilic vào dung dịch protein thì protein kết tủa. Phản ứng này được ứng dụng rộng rãi trong thực tế: người ta thường dùng axit tricloaxetic để phát hiện hoặc để loại protein ra khỏi dung dịch, dùng axit sunfosalisilic để phát hiện protein trong nước giải (phản ứng có độ nhạy đến 0,0015%).

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 5%, axit sunfosalisilic, axit tricloaxetic (TCA) 10%.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch lòng trắng trứng 5%, thêm 5-10 giọt dung dịch axit sunfosalisilic hay axit tricloaxetic 10%. Xuất hiện kết tủa protein.

d) **Kết tủa protein bằng muối kim loại nặng**

Những muối kim loại nặng (Cu^{2+} , Fe^{3+} , Pb^{2+} ...) tác dụng với protein tạo thành kết tủa không tan. Nhưng nếu dư thừa muối, kết tủa lại tan ra do những phân tử kec hấp thụ ion kim loại nặng, trở nên tích điện. Ion có hóa trị càng cao kết tủa càng dễ hòa tan trở lại.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 5%, FeCl_3 5%, chì axetat $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}]$ 5%, CuSO_4 7%.

Cách làm: Lấy 3 ống nghiệm, cho vào mỗi ống 2ml dung dịch lòng trắng trứng 5%.

Thêm vào ống I: 1 giọt dung dịch FeCl_3 5%

ống II: 1 giọt chì axetat 5%

ống III: 1 giọt CuSO_4 7%

Quan sát kỹ. Sau đó cho thêm lượng muối kim loại nặng tương ứng vào từng ống, kết tủa sẽ tan nhưng lượng dung dịch muối chì và đồng phải thêm vào để làm tan kết tủa lớn hơn lượng dung dịch FeCl_3 rất nhiều.

e) **Kết tủa bằng các thuốc thử ankaloit**

Protein cũng như ankaloit đều có nhóm $-\text{NH}_2$ nên phần lớn các thuốc thử của ankaloit đều có tác dụng kết tủa protein (trong môi trường axit).

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 5%, axit picric 10%, dung dịch tanin bão hòa, axit axetic 1%, 10%; kali feroxianua $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 5%.

Cách làm: Cho vào 3 ống nghiệm mỗi ống 1ml dung dịch lòng trắng trứng 5%.

Thêm vào ống I: 2 - 5 giọt dung dịch axit picric 10% và 2 - 3 giọt axit axetic 1%: xuất hiện kết tủa và chuyển thành màu vàng.

Thêm vào ống II: 2 - 4 giọt dung dịch tanin bão hòa và 2 - 4 giọt axit axetic 1%: xuất hiện kết tủa màu xám (Tanin được dùng để kết tủa protein trong công nghiệp thuộc da).

Thêm vào ống III: 1 giọt axit axetic 10% và 3 - 5 giọt kali feroxianua 5%, xuất hiện kết tủa màu vàng.

Bảng tóm tắt các phản ứng kết tủa của protein

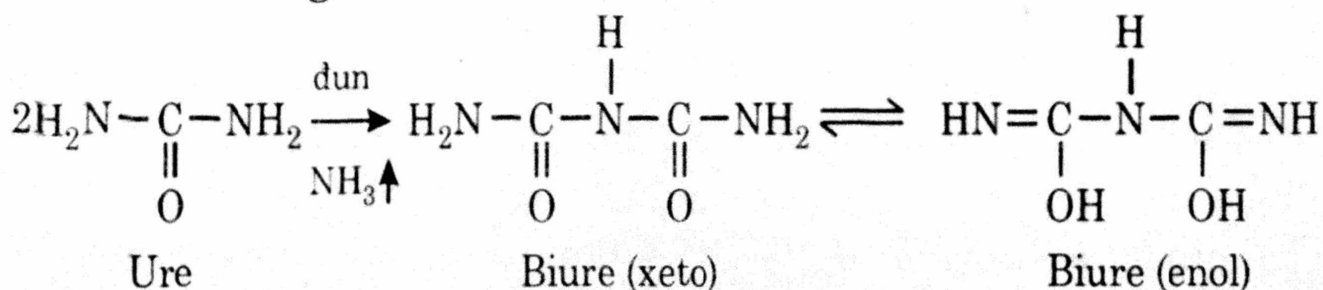
TT	Tên nhóm chất làm kết tủa protein	Hóa chất	Màu của kết tủa	Ghi chú
1	Dung môi hữu cơ			
2	Axit vô cơ			
3	Axit hữu cơ			
4	Muối kim loại nặng			
5	Thuốc thử ankaloit			

1.3 Các phản ứng màu của axit amin và protein

1.3.1 Phản ứng biure

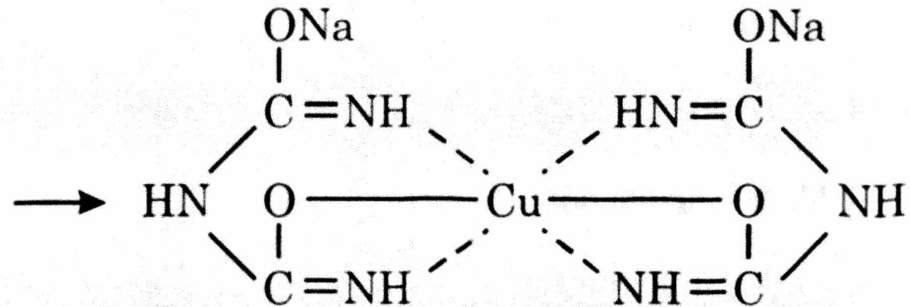
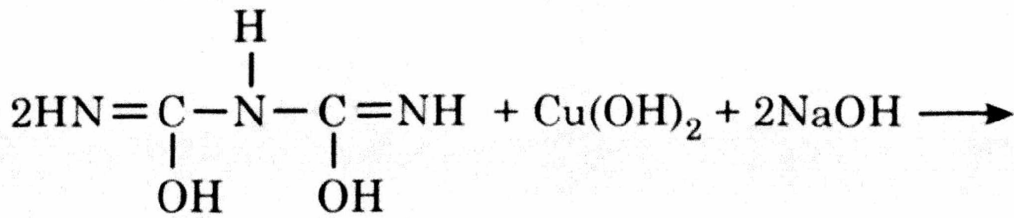
Đây là phản ứng đặc trưng của liên kết peptit. Trong môi trường kiềm, các hợp chất có chứa từ hai liên kết peptit trở lên có thể phản ứng với CuSO_4 tạo thành phức chất màu xanh tím, tím, tím đỏ hoặc màu tùy thuộc vào số lượng liên kết peptit nhiều hay ít. Hóa thức của phản ứng như sau:

- Phản ứng với biure



- Phản ứng với protein

Cũng tương tự như trường hợp của biure, các liên kết peptit ở dạng enol (trong môi trường kiềm) của các phân tử protein tạo phức với Cu^{2+} :



Dạng phức hợp như trên (với bốn nguyên tử nitơ tham gia tạo liên kết phối trí) thường có màu đỏ (hấp thụ cực đại ở bước sóng 520- 535nm). Trong trường hợp chỉ có hai hay ba nguyên tử N tham gia tạo liên kết thì phức sẽ có màu tím hoặc màu xanh (hấp thụ cực đại ở những bước sóng tương ứng là 540- 580nm và 615- 670nm). Vì vậy, thông thường sản phẩm phản ứng của các polipeptit khác nhau sẽ có màu thay đổi từ xanh tím đến đỏ tím. Phản ứng biure thường được ứng dụng để định lượng protein.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 1%, ure tinh thể, NaOH 10%, CuSO₄ 1%.

Cách làm:

- *Phản ứng với biure:* Cho vào ống nghiệm khô một ít tinh thể ure, đun trên ngọn lửa yếu. Lúc đầu ure nóng chảy, đến khi bắt đầu cứng lại thì ngừng đun. Quá trình này tạo ra biure, axit xianuric và amoniac (có thể ngửi mùi hoặc thử bằng giấy quỳ).

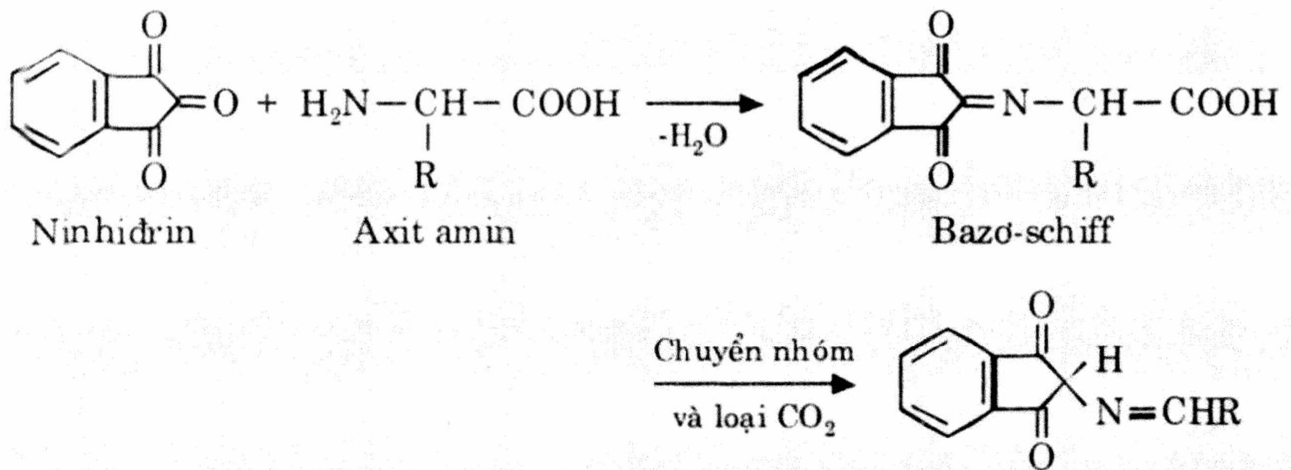
Để ống nguội, thêm vào 2ml NaOH 10%, lắc cho tan. Thêm vài giọt CuSO₄ 1%, quan sát màu. (Chú ý không cho quá nhiều CuSO₄ vì màu xanh của Cu(OH)₂ được tạo thành có thể lấn át màu của phản ứng).

- *Phản ứng với protein*: Cho vào ống nghiệm 3ml dung dịch lòng trắng trứng 1%, 1ml NaOH 10% và 1-2 giọt dung dịch CuSO_4 1%, lắc kỹ, quan sát màu.

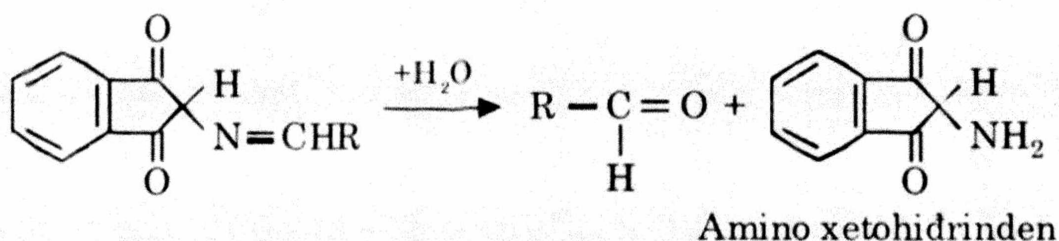
1.3.2 Phản ứng với ninhidrin

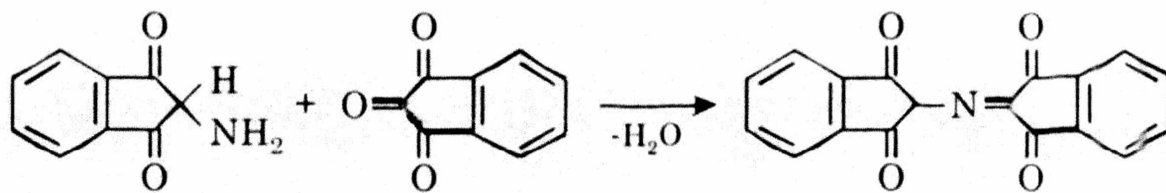
Các axit amin khi phản ứng với ninhidrin ở nhiệt độ cao cho sản phẩm có màu xanh tím (hấp thụ cực đại ở khoảng bước sóng 570nm). Đây là phản ứng chung cho tất cả các axit amin có chứa nhóm amin ở vị trí C_α . Ngoài α -axit amin, các peptit, protein, muối amôn, aminosacarit và amoniac cũng cho phản ứng này. Cơ chế phản ứng khá phức tạp như sau:

Đầu tiên do tác dụng của các axit amin với ninhidrin sẽ xuất hiện phức chất dạng bazơ -schiff. Sau đó xảy ra sự chuyển nhóm, tiếp theo là sự decarboxyl hóa và sự phân tách phức chất thành andehit và aminodixetohidrinden:



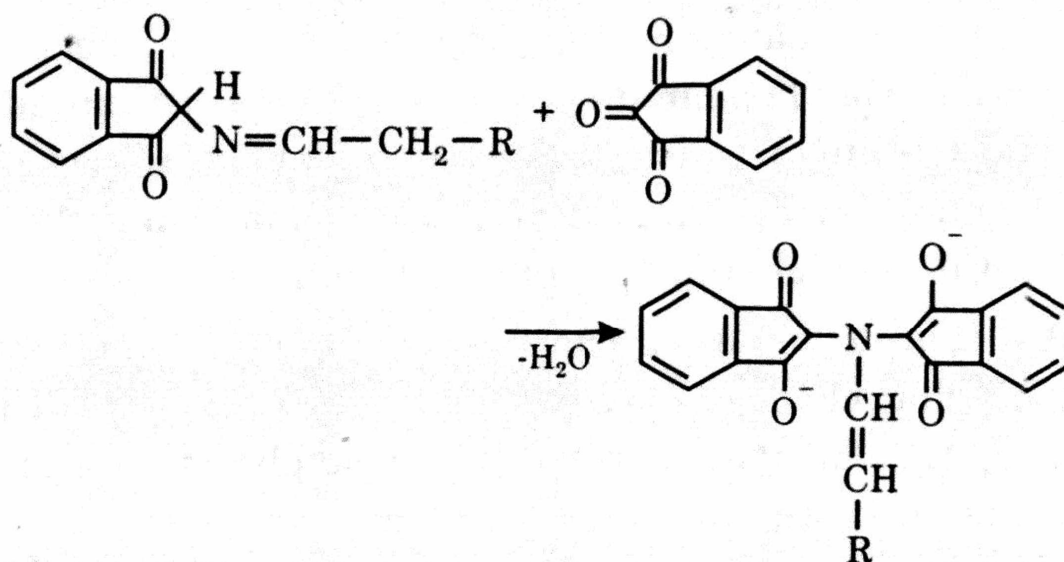
Aminodixetohidrinden lại ngưng tụ với một phân tử ninhidrin khác và hình thành nên một hợp chất mới, đồng thời bị enol hóa và chuyển thành dạng có màu.





(phức màu xanh tím)

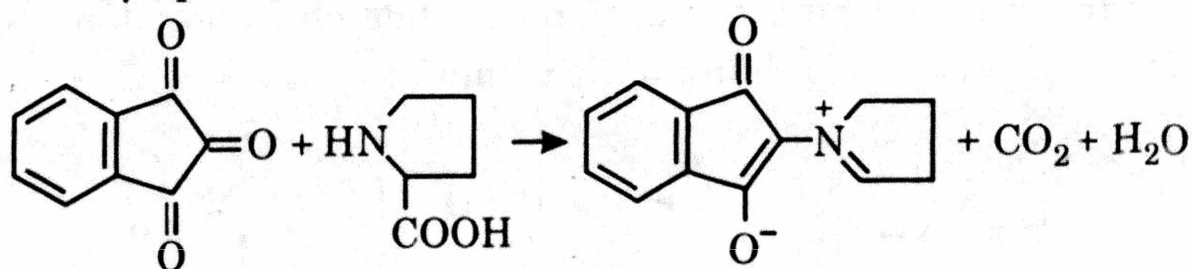
Khi có các dung môi hữu cơ (axeton, etanol, piridin... thường được dùng để pha ninhydrin) thì sẽ xảy ra phản ứng sau:



(phức có màu)

Sản phẩm của phản ứng này có chứa gốc R của axit amin ban đầu. Gốc này sẽ quyết định màu sắc khác nhau (xanh da trời, đỏ...) của các hợp chất khi phản ứng với ninhydrin.

Đặc biệt phức chất được tạo thành giữa prolin (có chứa nhóm imin) và ninhydrin có màu vàng tươi, khác biệt hẳn với màu do các axit amin khác tạo nên trong phản ứng. Do vậy, ninhydrin còn được sử dụng cho phản ứng màu đặc trưng để phát hiện prolin:



(phức màu vàng)

Phản ứng với ninhidrin có độ nhạy cao, do đó thường được dùng để định tính và định lượng axit amin.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 1%, prolin 1%, dung dịch ninhidrin 0,1% pha trong axeton 95%.

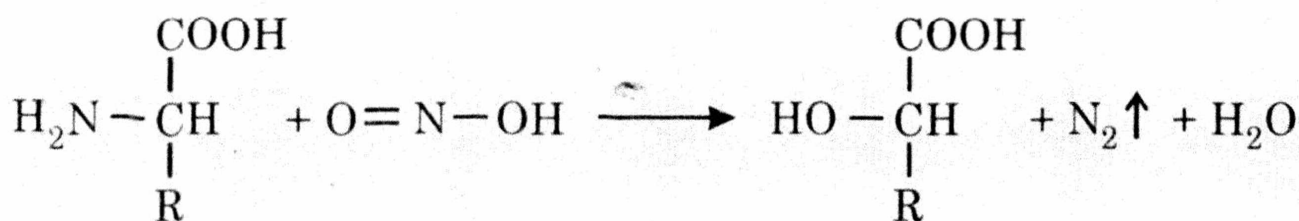
Cách làm: Lấy hai ống nghiệm, cho vào ống I: 1ml dung dịch lòng trắng trứng 1%, ống II: 1ml prolin 1%; thêm vào mỗi ống 1ml dung dịch ninhidrin, đun sôi trong 1-2 phút. Quan sát màu trong hai ống, giải thích kết quả nhận được.

Có thể làm phản ứng trên giấy lọc như sau: nhỏ 1 giọt dung dịch axit amin hoặc protein (lòng trắng trứng 1%) lên giấy, cho thêm 1 giọt thuốc thử ninhidrin, hơ nhẹ trên ngọn lửa đèn cồn. Quan sát màu tạo thành.

1.3.3 Phản ứng với axit nitơ

Dưới tác dụng của HNO_2 , axit amin bị dezamin hóa tạo thành nitơ ở dạng khí. Phản ứng này được sử dụng để định lượng các α - axit amin (phương pháp Van Slyke).

Phản ứng xảy ra như sau:



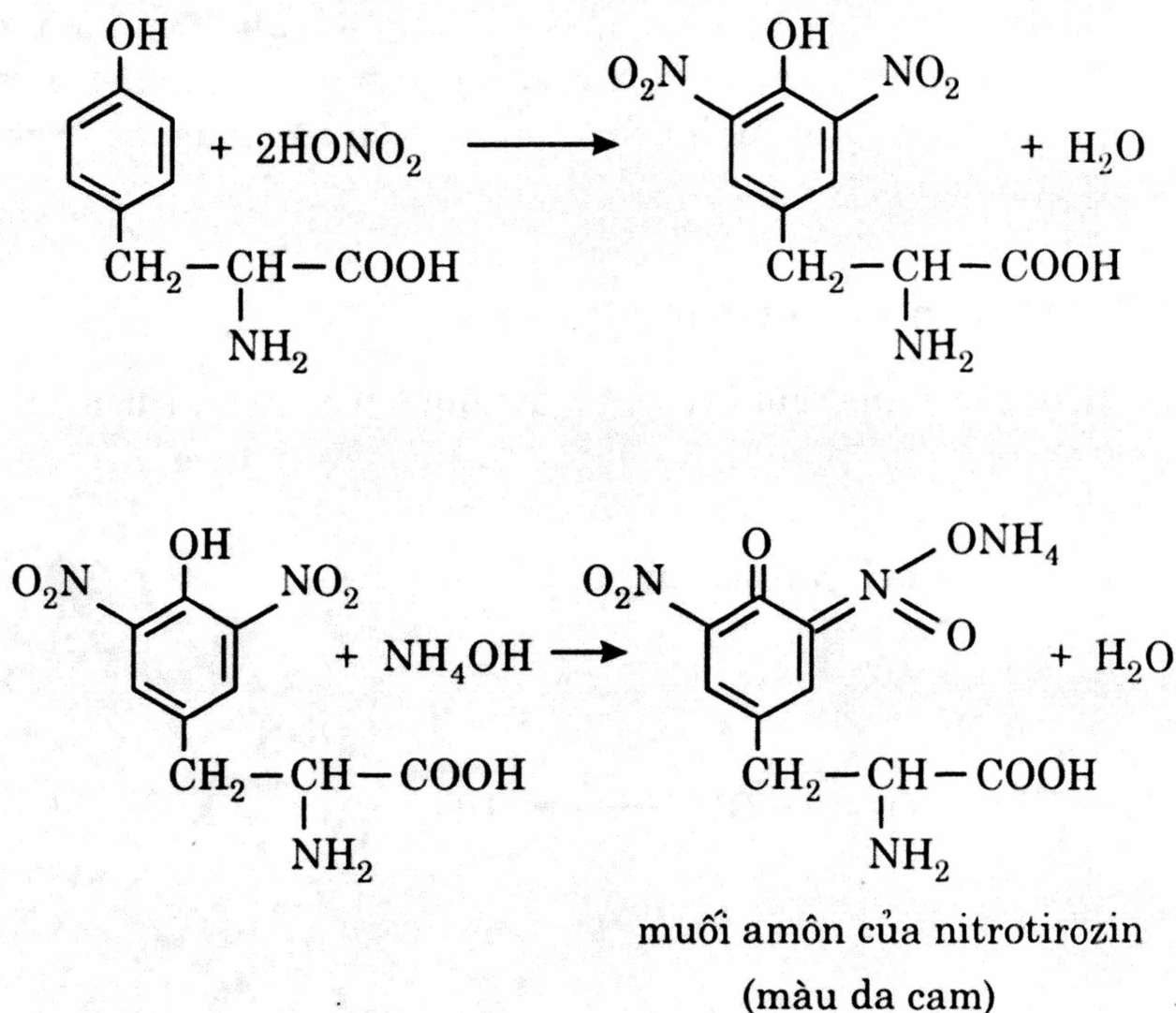
Hóa chất: Dung dịch glixin 0,5%, NaNO_2 10%, axit axetic 2N.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch NaNO_2 10%, 2ml axit axetic 2N và 0,5ml dung dịch glixin 0,5%. Quan sát sự xuất hiện của bọt khí (N_2).

1.3.4 Phản ứng xantoprotein của các axit amin vòng

Các axit amin vòng như phenylalanin, tirozin, triptophan khi tác dụng với HNO_3 đặc tạo thành dẫn xuất nitơ màu vàng. Khi thêm dung dịch kiềm vào sẽ tạo thành muối có cấu tạo kinoic màu da cam. Các protein không chứa axit amin vòng (gelatin) không cho phản ứng này.

Hóa thức của phản ứng với tirozin như sau:



Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 1%, dung dịch gelatin 1%, HNO_3 đặc, NH_4OH đặc

Cách làm: Lấy hai ống nghiệm, cho vào ống I: 3ml lòng trắng trứng 1%, ống II: 3ml gelatin 1%. Thêm vào mỗi ống

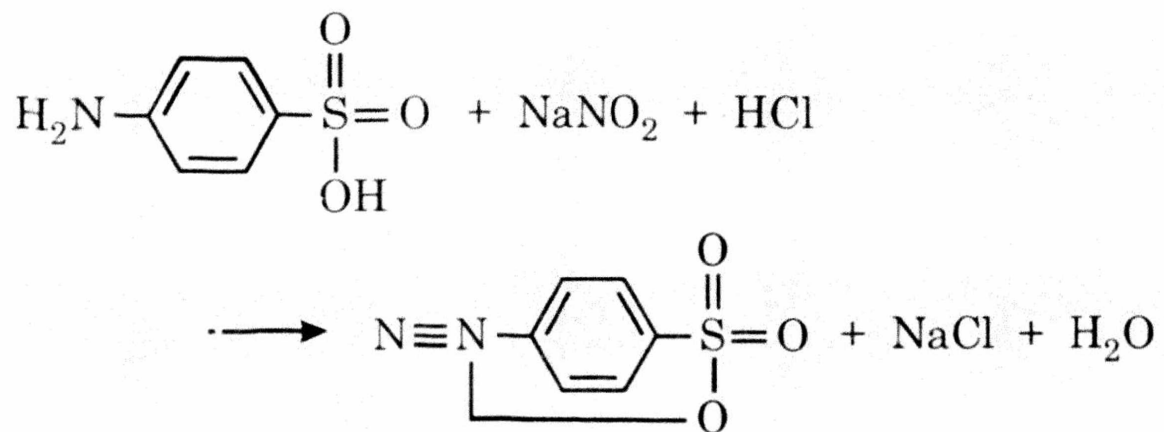
nghiệm 1ml HNO₃ đặc. Đun sôi hỗn hợp phản ứng một phút, làm nguội. Thêm từ từ vài giọt amoniac đặc. Quan sát sự chuyển màu trong 2 ống nghiệm.

1.3.5 Phản ứng Pauli để phát hiện histidin và tirozin

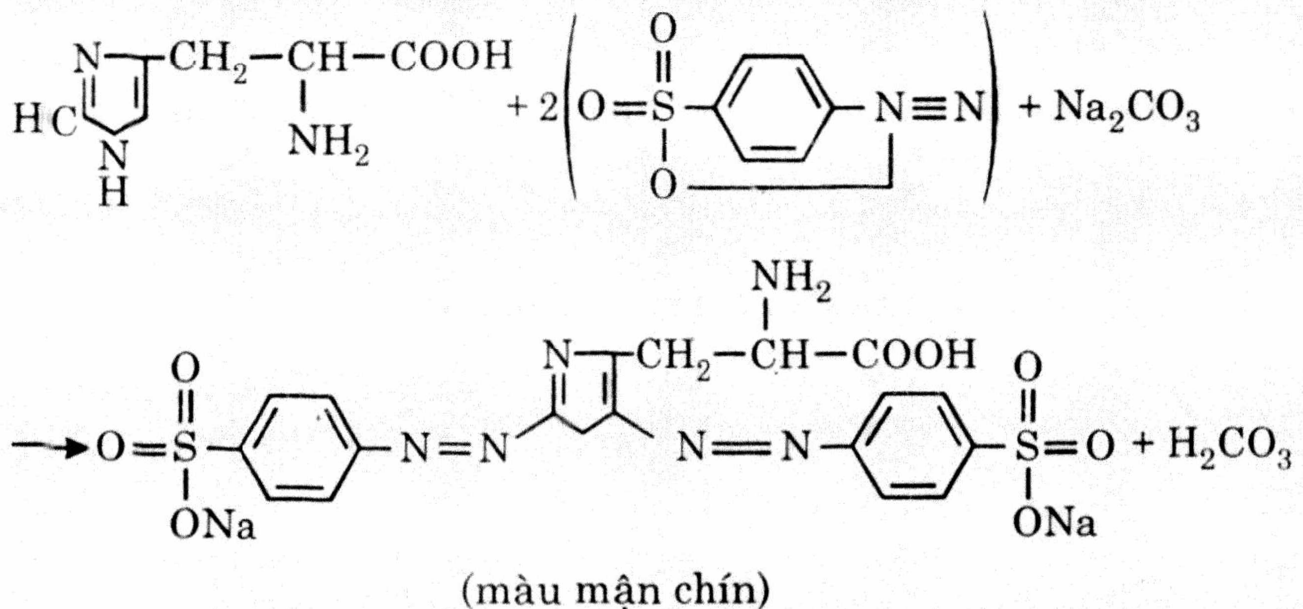
Khi tác dụng với axit diazobenzenesulfonic (thuốc thử diazo), histidin tạo thành phức chất màu mận chín, còn tirozin tạo phức màu da cam.

Hóa thức của phản ứng như sau:

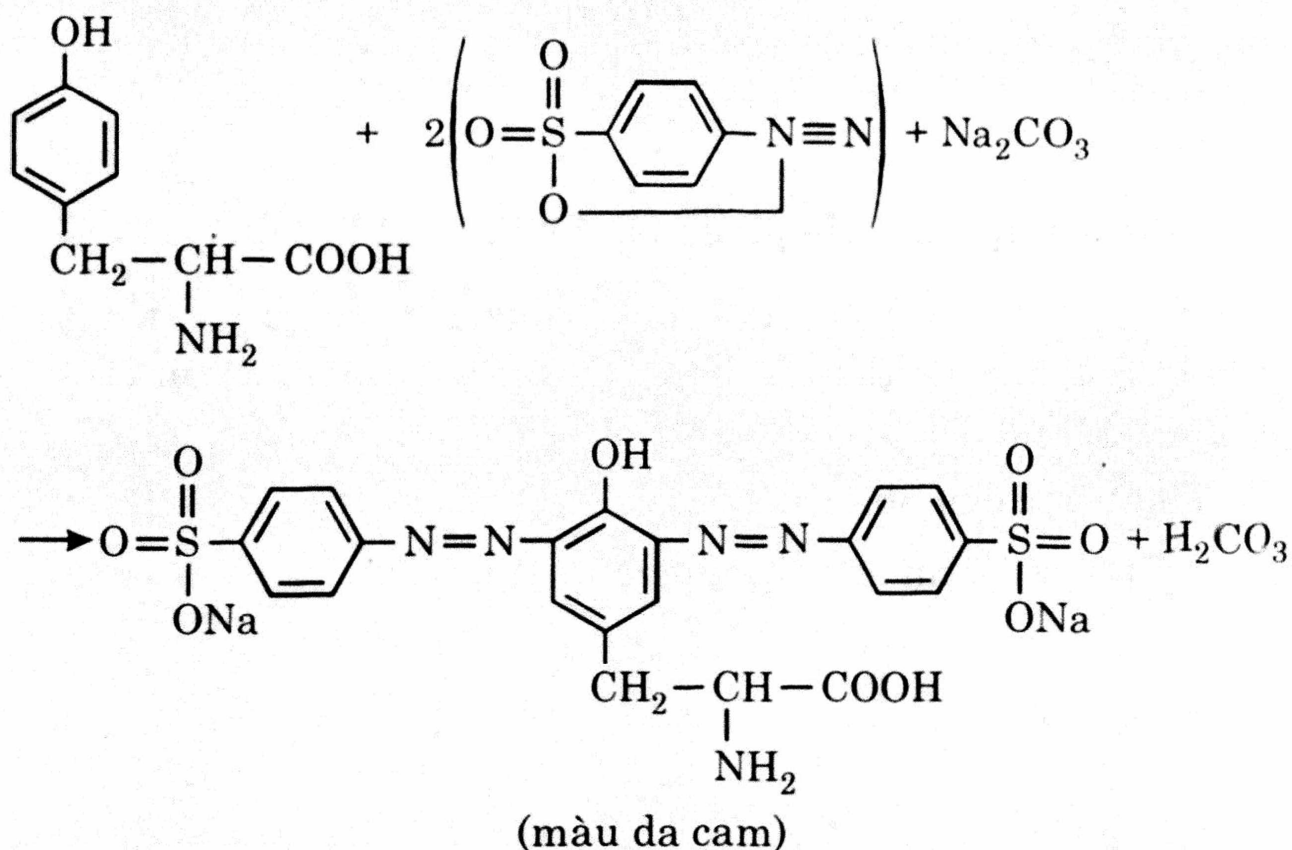
+ Sự tạo thành axit diazobenzenesulfonic:



+ Phản ứng của histidin:



+ Phản ứng của tirozin:

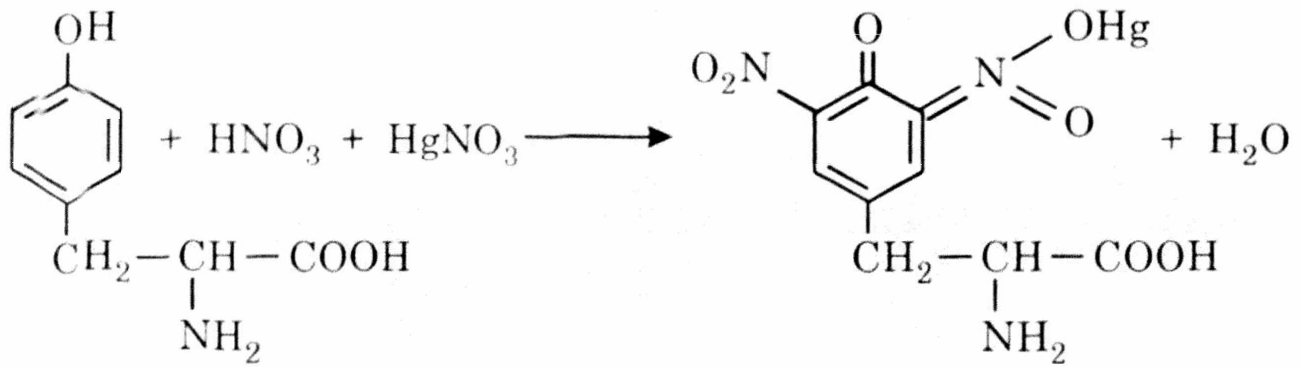


Hóa chất: Dung dịch histidin và tirozin chuẩn (0,1%), Na_2CO_3 10%. Chuẩn bị thuốc thử Pauli: hòa tan 1g axit sunfanilic trong 100ml HCl 1 N, sau đó trộn với 10ml dung dịch nitrit natri 0,7% trong nước cất.

Cách làm: Nhỏ dung dịch histidin hoặc tirozin lên giấy lọc, hơ nhẹ cho khô, sau đó phun thuốc thử Pauli lên, làm khô giấy. Cuối cùng phun lên giấy dung dịch Na_2CO_3 10%. Quan sát, so sánh và giải thích các kết quả nhận được.

1.3.6 Phản ứng Millon đặc trưng cho tirozin

Thuốc thử Millon là hỗn hợp của các muối nitrat và nitrit - oxit thủy ngân 1 và 2 được hòa tan trong HNO_3 . Khi thuốc thử tác dụng với nhân phenol của tirozin sẽ tạo nên hợp chất nitrotirozin - thủy ngân có màu đỏ. Hóa thức của phản ứng như sau:



Phản ứng Millon được sử dụng để phát hiện tirozin và các hợp chất phenol.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 1%, gelatin 1%. Chuẩn bị thuốc thử Millon: Hòa tan 40g thủy ngân trong 57ml HNO₃ đặc. Quá trình được tiến hành đầu tiên ở điều kiện lạnh, sau đó ở trong nồi cách thủy (50°C) cho đến khi thủy ngân tan hoàn toàn. Dung dịch được pha loãng gấp đôi bằng nước cất, thêm 1ml KNO₂ hoặc NaNO₂ 1%. Khuấy đều, để lắng, gạn lấy dịch trong. Chú ý thuốc thử Millon dễ lâu bị oxi hoá.

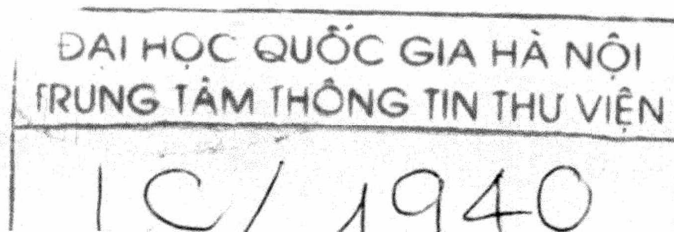
Cách làm: Lấy hai ống nghiệm. Cho vào ống I: 1ml lòng trắng trứng 1%, ống II: 1ml gelatin 1%. Thêm vào mỗi ống 1ml (hoặc 6 giọt) thuốc thử Millon, lắc đều, đun nhẹ cho đến khi xuất hiện màu trong ống I. So sánh kết quả trong hai ống, giải thích.

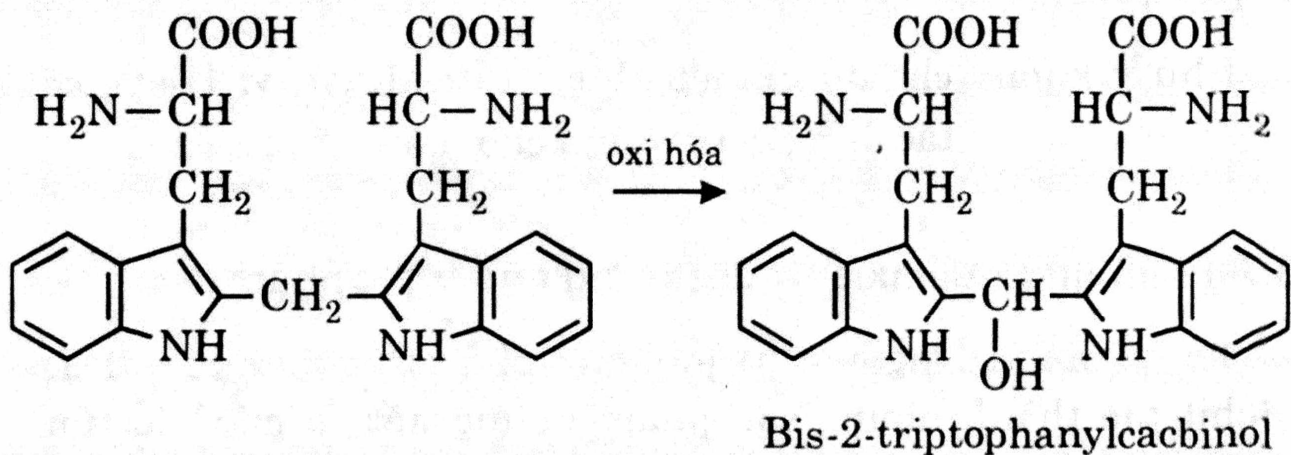
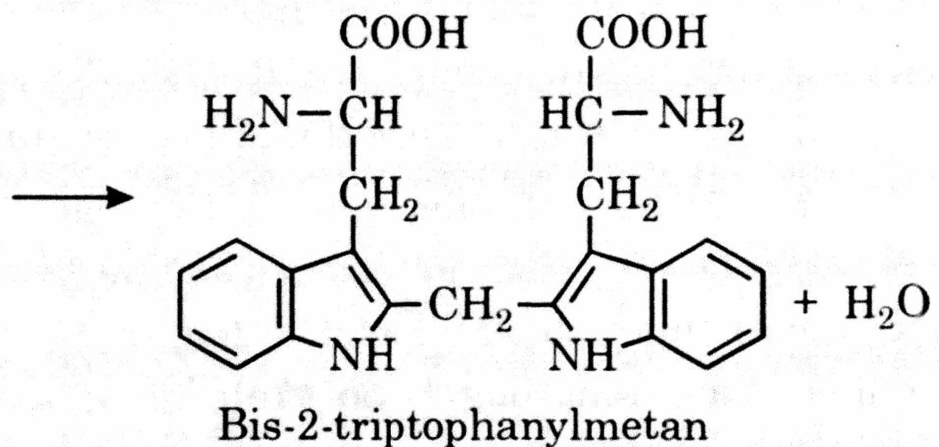
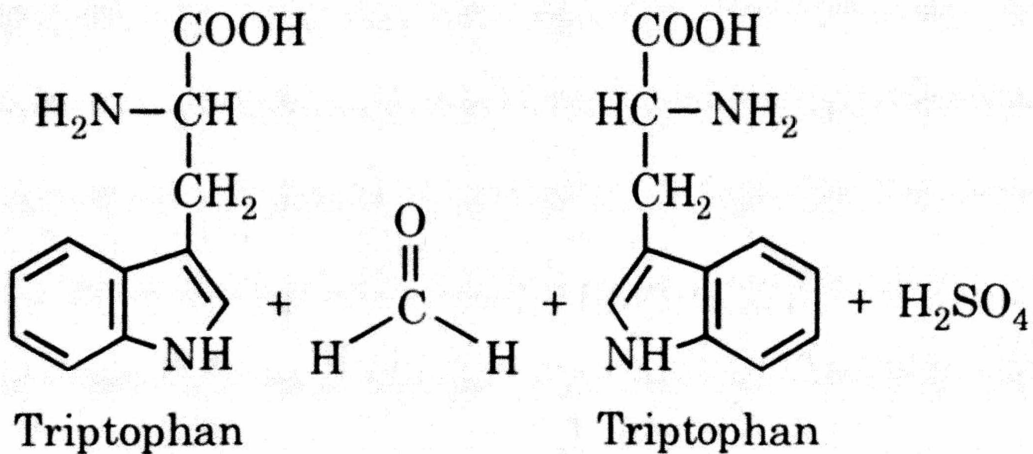
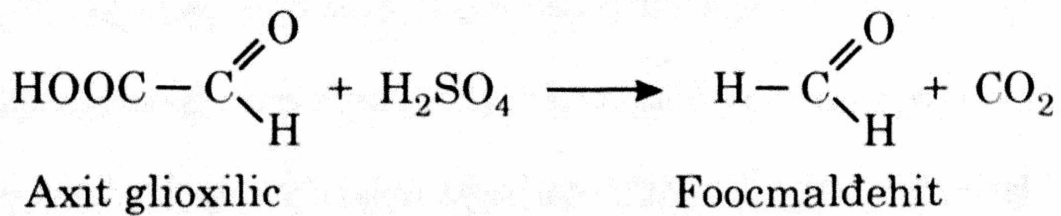
Chú ý không cho quá nhiều thuốc thử Millon vì HNO₃ có trong thuốc thử sẽ tác dụng với protein cho màu vàng.

1.3.7 Phản ứng Adamkiewicz đặc trưng cho triptophan

Trong môi trường axit, triptophan phản ứng với nhiều loại anđehit tạo thành những sản phẩm ngưng kết có màu đỏ tím đặc trưng

Hóa thức của phản ứng như sau:





Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 1%, gelatin 1%, axit axetic đặc, H₂SO₄ đặc, CuSO₄ 5%, focmandêhit, sacarozơ 1%.

Cách làm:

- Phản ứng với axit glioxilic ($\text{HOOC} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{H}$)

Lấy 2 ống nghiệm, cho vào ống nghiệm I: 1ml dung dịch lòng trắng trứng 1%, ống II: 1ml gelatin 1%, thêm vào cả 2 ống 1ml axit axetic đặc (có chứa axit glioxilic ở dạng vệt), lắc đều (có thể đun nóng đến khi tan, sau đó để nguội), thêm vài giọt CuSO_4 , lại lắc. Cầm nghiêng ống nghiệm, giở theo thành ống 1ml H_2SO_4 , cho chảy xuống từ từ. Quan sát sự xuất hiện vòng tím ở mặt phân cách hai chất lỏng ở ống I. Giải thích sự sai khác giữa 2 ống.

- Phản ứng với oximetilfucfurol (được hình thành do sacarozơ bị thủy phân và mất nước dưới tác dụng của H_2SO_4 đặc).

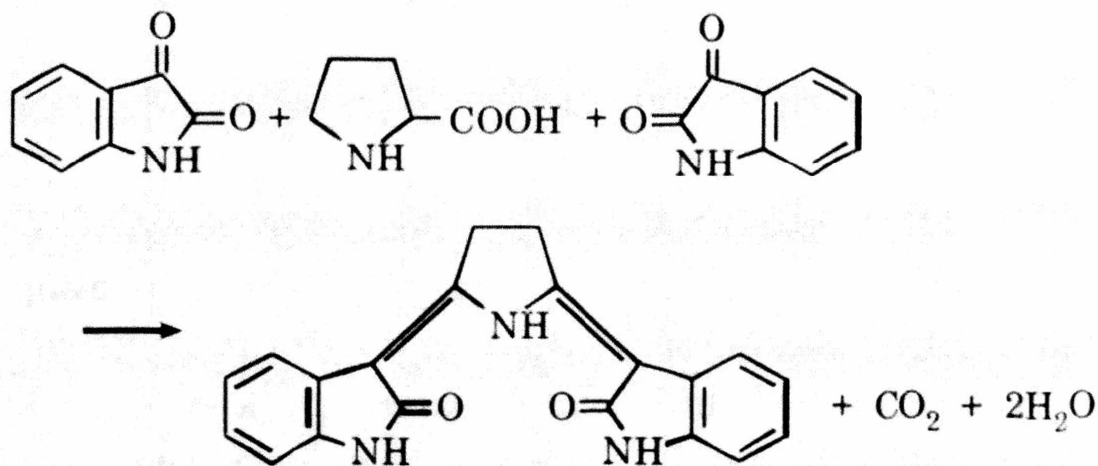
Cho vào ống nghiệm 2ml dung dịch lòng trắng trứng 1%, thêm vài giọt sacarozơ 1% và CuSO_4 5%, lắc đều. Nhỏ theo thành ống 1ml H_2SO_4 đặc. Quan sát sự hình thành sản phẩm có màu.

- Phản ứng với focmandehit

Cho vào ống nghiệm 2ml dung dịch lòng trắng trứng 1%, thêm vài giọt focmandehit loãng và CuSO_4 5%, lắc đều. Nhỏ theo thành ống 1ml H_2SO_4 đặc. Quan sát sự hình thành sản phẩm có màu. CuSO_4 có tác dụng làm tăng độ nhạy của phản ứng.

1.3.8 Phản ứng của prolin với thuốc thử izatin

Ngoài phản ứng màu đặc trưng với ninhidrin (mục 1.3.2.), prolin còn có thể phát hiện được dễ dàng nhờ phản ứng với thuốc thử izatin:

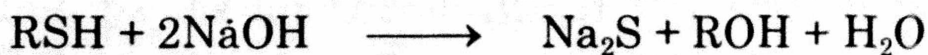


Hóa chất: Dung dịch prolin và oxiprolin 0,1% pha trong axit axetic đặc. Chuẩn bị thuốc thử izatin gồm hỗn hợp các dung dịch izatin 0,2%, CdCl_2 0,06% và axit axetic 4% trong axeton. Cũng có thể chuẩn bị một cách đơn giản hơn bằng cách pha dung dịch izatin 0,2 % trong axit axetic đặc.

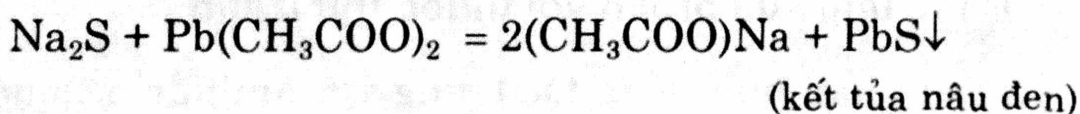
Cách làm: Chấm dung dịch prolin lên giấy lọc. Hơ nhẹ cho tới khô. Sau đó phun thuốc thử izatin lên giấy, sấy nhẹ, thấy xuất hiện màu xanh lơ đậm. Nếu chấm oxiprolin thì sẽ hiện ra màu xanh nhạt.

1.3.9 Phản ứng của các axit amin chứa lưu huỳnh (Phản ứng Folia)

Các axit amin chứa lưu huỳnh như xistin, xistein, metionin dưới tác dụng của kiềm bị phân hủy tạo thành natri sunfua (Na_2S):



Thêm chì axetat vào Na_2S sẽ phản ứng tạo thành kết tủa nâu đen của chì sunfua (PbS):

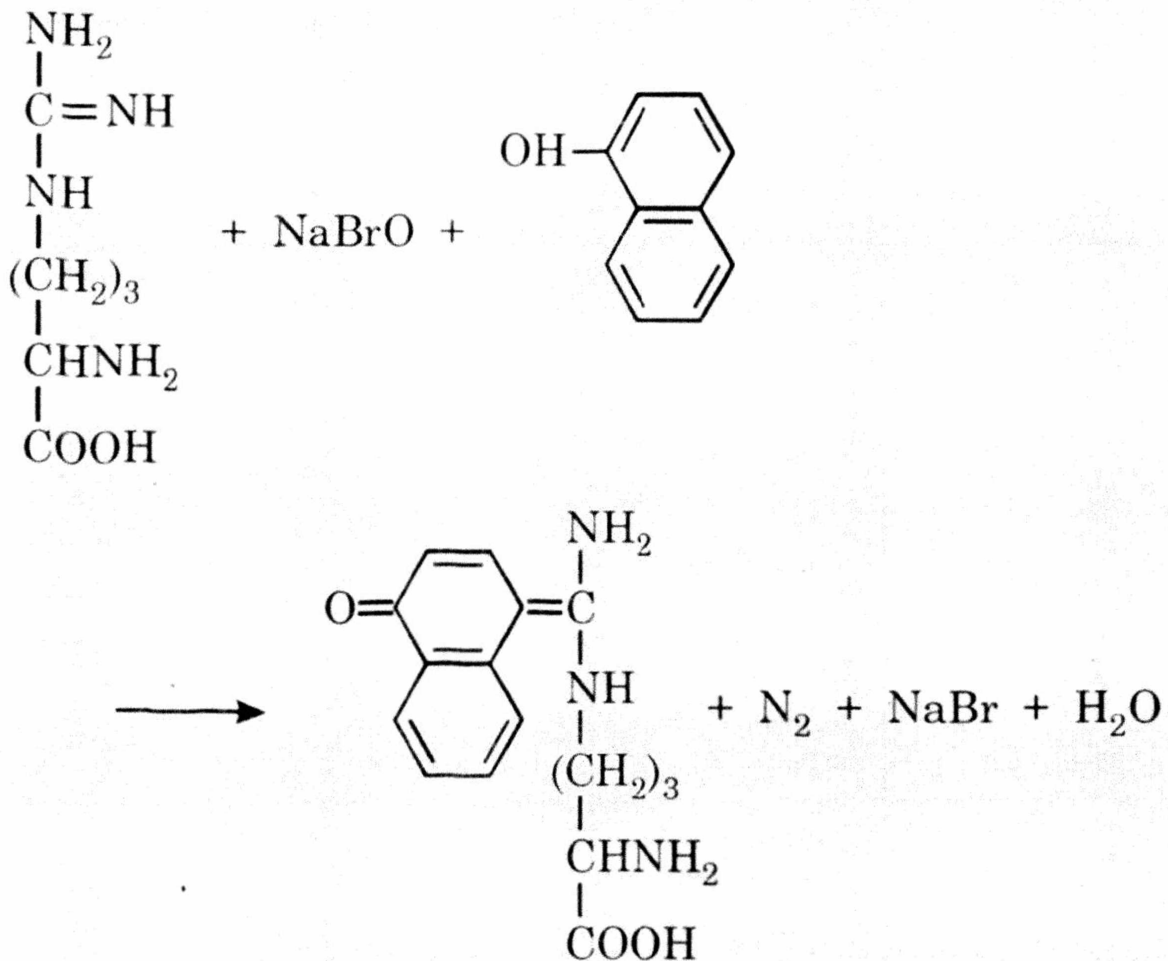


Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch lòng trắng trứng 1%, NaOH 10%, chì axetat 1%.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 2ml dung dịch lòng trắng trứng 1% và 2ml NaOH 10%. Đun sôi 3 phút. Lắc đều. Thêm vài giọt $Pb(CH_3COO)_2$ 1%. Quan sát sự tạo thành kết tủa.

1.3.10 Phản ứng Sakaguchi đặc trưng cho acginin

Đây là phản ứng phát hiện acginin: khi tác dụng với hipobromit ($NaBrO$) và α -naphthol, acginin sẽ tạo thành sản phẩm màu đỏ cam. Hóa thức của phản ứng có thể trình bày như sau:



Hóa chất: Acginin 0,01%, α -naphthol 2% pha trong etanol 96% (trước khi dùng pha loãng 10 lần bằng cùng loại dung môi), NaOH 5% và 10%, ure 40%.

Chuẩn bị dung dịch hipobromit ($NaBrO$): hòa tan 1g brom (Br_2) trong 50ml NaOH 5% (phản ứng tỏa nhiệt nên cần được làm lạnh bằng nước đá). Bảo quản thuốc thử trong tủ lạnh. Thời gian sử dụng: hai tuần.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 2ml acginin, thêm 2ml NaOH 10% và vài giọt α - naphthol, lắc đều, thêm 0,5ml dung dịch hipobromit, lại lắc, thêm ngay 1ml ure 40% để cố định màu. Quan sát, giải thích kết quả.

Bảng tóm tắt các phản ứng màu đặc trưng của axit amin và protein

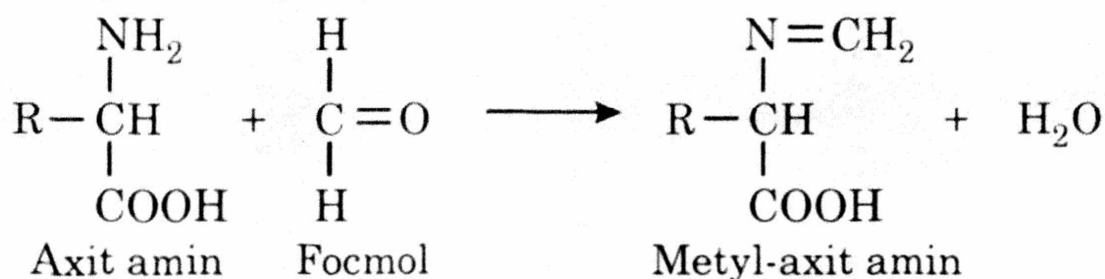
Số TT	Phản ứng	Hóa chất chính	Đối tượng phát hiện	Sản phẩm màu
1	Biure	Đồng sunfat trong môi trường kiềm	Liên kết peptit (- CO - NH -)	Xanh tím- đỏ tím
2	Ninhiđrin	Ninhiđrin	Các axit amin, prolin	Xanh tím, vàng
3	Axit nitơ	HNO ₂	Các axit amin	Bọt khí N ₂ bay ra
4	Xanto-protein	Axit nitric, sau cho thêm kiềm	Tryptophan, tirozin, phenylalanin	Vàng, chuyển thành da cam
5	Pauli	Axit điazobenzen-sunfonic	Histiđin, Tirozin	Mận chín. Da cam
6	Millon	Thủy ngân nitrat và nitrit trong HNO ₃ đặc	Tirozin	Đỏ
7	Adam-kievic	Axit axetic đặc, H ₂ SO ₄ đặc, focmandehit	Tryptophan	Vòng đỏ tím.
8	Izatin	Izatin	Prolin Oxiprolin	Xanh lơ đậm Xanh nhạt
9	Folia	Kiểm, chi axetat	Xistein, xistin, metionin	Tủa nâu đen
10	Saka-guchi	Natri hipobromit, α -naphthol	Acginin	Đỏ cam

1.4 Định lượng axit amin và protein

1.4.1 Xác định nitơ amin (N-amin)

bằng phương pháp chuẩn độ focmol

Nguyên tắc: Các axit amin có thể phản ứng với focmol trung tính để tạo thành methyl - axit amin. Focmol đã bao vây nhóm amin mang tính kiềm nên có thể chuẩn độ nhóm cacboxyl trong phân tử axit amin bằng kiềm. Dựa vào lượng kiềm đã dùng để chuẩn độ sẽ tính được lượng nitơ của axit amin. Hóa thức của phản ứng được biểu diễn như sau.



Nguyên liệu và hóa chất: Dịch mẫu có chứa axit amin cần xác định, NaOH 0,1N, H₂SO₄ 0,1N.

Chuẩn bị hỗn hợp focmol: trộn 10ml focmol với 2ml dung dịch phenolphtalein 0,5% pha trong etanol, dùng NaOH 0,1N để trung hòa đến khi có màu hồng nhạt (chỉ chuẩn bị trước khi dùng).

Dụng cụ: Bình nón (V= 100ml), buret.

Cách làm: Lấy 2 bình nón, bình I dùng làm bình thí nghiệm, bình II dùng làm bình kiểm tra.

Cho vào bình I: 10ml nước cất vô đạm, thêm vào đó 5ml dung dịch hỗn hợp focmol và 5ml dung dịch NaOH 0,1N. Sau đó, dùng H₂SO₄ 0,1N để điều chỉnh màu trong bình cho đến khi chỉ còn màu hồng nhạt, thêm 2 giọt NaOH 0,1N, màu đỏ tươi xuất hiện, ứng với pH = 8,8.

Cho vào bình II: 10ml dịch mẫu, thêm 5ml dung dịch hỗn hợp focmol và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH 0,1N đến khi có

màu đỏ tươi (màu cần đậm hơn màu ở bình kiểm tra). Dùng H_2SO_4 0,1N để điều chỉnh màu của dịch trong bình đến hồng nhạt, sau đó thêm vài giọt NaOH 0,1N để có màu đỏ tươi, tương đương với màu ở bình kiểm tra (pH = 8,8).

Thêm vào bình I: 4 giọt NaOH 0,1N, xuất hiện màu đỏ tươi ứng với pH = 9,1.

Thêm vào bình II: vài giọt NaOH 0,1N cho đến khi xuất hiện màu đỏ tươi giống như ở bình I (pH = 9,1).

Tính kết quả: Cộng toàn bộ lượng kiềm và axit đã cho vào mỗi bình trong quá trình thí nghiệm và kết quả tính theo công thức sau:

$$N \text{ (mg\%)} = \frac{[(V_1 - v_1) - (V_2 - v_2)] \cdot 1,4,100}{a}$$

trong đó:

V_1 - Tổng lượng kiềm dùng để chuẩn độ bình thí nghiệm (I).

v_1 - Tổng lượng axit dùng để chuẩn độ bình thí nghiệm (I).

V_2 - Tổng lượng kiềm dùng để chuẩn độ bình kiểm tra (II)

v_2 - Tổng lượng axit dùng để chuẩn độ bình kiểm tra (II)

a - Lượng mẫu (g) ứng với 10ml dịch mẫu dùng để xác định N

Có thể dùng timolphtalein thay phenolphtalein. Trong trường hợp đó cần chuẩn bị hỗn hợp focmol như sau: trộn 10ml dung dịch focmol 40% với 5ml etanol 95-96%, thêm 1ml dung dịch timolphtalein, thêm từ từ từng giọt dung dịch NaOH 0,1 N cho đến khi có màu xanh nhạt. Các bình thí nghiệm và kiểm tra sau khi thêm hỗn hợp focmol được chuẩn độ bằng NaOH 0,1N cho đến khi xuất hiện màu xanh rõ rệt. Tính kết quả theo công thức sau:

$$X(\text{mg } \%) = \frac{(V_1 - V_2)k.1,4.100}{a}$$

trong đó:

X- mg nitơ amin của mẫu thí nghiệm (tính theo %)

V_1 - số ml NaOH 0,1N đã dùng để chuẩn độ bình thí nghiệm (I).

V_2 - số ml NaOH 0,1N đã dùng để chuẩn độ bình kiểm tra (II)

k - hệ số điều chỉnh của dung dịch NaOH 0,1N.

1,4 - 1 ml NaOH 0,1N ứng với 1,4mg nitơ.

a - Lượng mẫu (g) ứng với 10ml dịch mẫu dùng để xác định N.

1.4.2 Định lượng protein

Hàm lượng protein có thể được xác định bằng các phương pháp khác nhau, tuy vậy, các phương pháp hoá lý là phổ biến hơn cả.

Dựa vào sự hấp thụ phổ ánh sáng ở vùng tử ngoại (278 - 280 nm) của một số axit amin chứa nhân thơm có trong protein như triptophan, tirozin và phenylalanin, người ta có thể định lượng protein bằng phép đo hấp thụ quang phổ.

Có thể định lượng protein bằng phương pháp Kjeldahl trên cơ sở xác định hàm lượng nitơ protein (thường chiếm khoảng 16% trong các protein khác nhau). Nhân giá trị nitơ xác định được với hệ số 6,25 (100 : 16) sẽ ra hàm lượng protein tổng số. Các protein thực vật có tỷ lệ nitơ lớn hơn, khoảng 16,8%, do vậy trong trường hợp này hệ số nhân sẽ là 5,95.

Cũng có thể được định lượng các protein hòa tan bằng phương pháp đo độ hấp thụ ánh sáng của phức chất tạo thành

sau khi cho protein phản ứng với một số thuốc thử đặc trưng. Sau đây giới thiệu một số phương pháp xác định protein thông dụng hiện nay.

a) Định lượng protein bằng phương pháp Kjeldahl

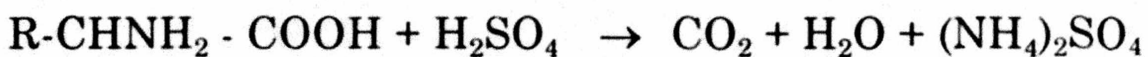
Phương pháp này dựa trên cơ sở định lượng nitơ protein, từ đó tính ra lượng protein bằng cách nhân với hệ số tương ứng. Để định lượng nitơ protein người ta thường xác định nitơ tổng số và nitơ phi protein theo phương pháp Kjeldahl, sau đó lấy hiệu số giữa hai dạng nitơ này.

Xác định nitơ tổng số theo phương pháp Kjeldahl (N tổng số)

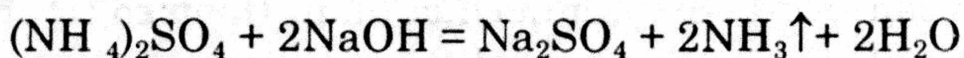
Nguyên tắc: Dưới tác dụng của H_2SO_4 đặc ở nhiệt độ cao, các hợp chất hữu cơ có chứa nitơ (N) bị phân hủy và bị oxi hóa đến CO_2 và nước, còn nitơ chuyển thành amoniac và tiếp tục kết hợp với H_2SO_4 tạo thành muối amoni sunfat.

Quá trình được tiến hành theo các bước sau:

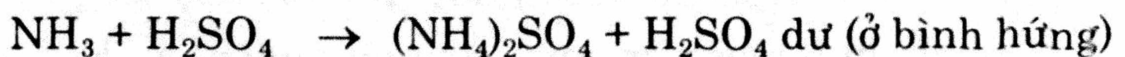
- Vô cơ hóa nguyên liệu:



- Cát đạm:



Phản ứng xảy ra trong bình hứng:



- Chuẩn độ H_2SO_4 dư ở bình hứng bằng NaOH có nồng độ 0,1N.

Nguyên liệu và hóa chất: Mẫu protein cần xác định hàm lượng, H_2SO_4 đặc, H_2SO_4 0,1N, NaOH 0,1N, NaOH 40%, H_2O_2 30% hoặc $HClO_4$ 57%. Dung dịch chỉ thị hỗn hợp: 50ml dung dịch xanh metylen (1g pha trong 800ml etanol 96°) và 100ml dung dịch đỏ metyl (1g pha trong 750ml etanol 96°).

Cách làm:

- *Vô cơ hóa mẫu:* Cân 0,2g protein cho vào bình Kjeldahl. Thêm vào bình 5-10ml H_2SO_4 đặc. Đậy bình bằng nút quả bông hoặc phễu thủy tinh nhỏ. Đun bình Kjeldahl trên bếp điện hay bếp dầu hỏa, lúc đầu đun nhẹ đến khi thấy SO_2 bay ra, có thể đun mạnh hơn, sau khi sôi 30 phút, nhắc bình ra khỏi bếp, để nguội, thêm 5 giọt H_2O_2 30% hoặc $HClO_4$ 57% (chất xúc tác), tiếp tục đun 20 phút. Nếu dịch trong bình chưa trắng cần thêm một lần xúc tác như trên rồi đun tiếp cho đến khi dịch trắng hoàn toàn. Quá trình vô cơ hóa kết thúc.

- *Cát đạm:* Quá trình cát đạm được tiến hành trên máy cát Kjeldahl. Chuyển toàn bộ dịch vô cơ hóa ở bình Kjeldahl sang bình cát của máy, tráng lại bình Kjeldahl bằng 10ml nước cất vô đạm và đổ chung vào bình cát. Thêm vào đó vài giọt dung dịch chỉ thị hỗn hợp, dịch trong bình sẽ có màu tím (môi trường axit), sau đó cho vào một lượng kiềm 30-40% đến khi màu dịch trong bình cát chuyển từ tím thành xanh lá mạ (môi trường kiềm).

Ở bình hứng có chứa sẵn một thể tích dư (A ml) H_2SO_4 0,1N, thêm vào đó vài giọt dung dịch chỉ thị hỗn hợp. Đặt bình hứng ở đầu ra của hệ thống làm lạnh, chú ý đầu ra này phải ngập trong dung dịch axit.

Hệ thống cát phải đảm bảo hoàn toàn kín. Bắt đầu cát, theo dõi màu trong bình hứng, nếu dung dịch đổi sang màu xanh lá mạ thì phải cho thêm vào 5ml H_2SO_4 0,1N nữa (lấy bằng buret và cần cho nhanh vào để khỏi mất nitơ).

Sau khi đun độ 45 phút, thử xem còn nitơ không bằng cách hạ bình hứng xuống, lấy ống nghiệm sạch hứng ở đầu ra của hệ thống làm lạnh khoảng 1ml, cho thêm vài giọt thuốc thử Nessler. Quá trình cát được xem là kết thúc nếu dịch trong ống nghiệm không có màu vàng (có thể kiểm tra bằng khả năng thay đổi màu của giấy quỳ).

- *Chuẩn độ*: Lấy bình hứng ra, chuẩn độ H_2SO_4 0,1N dư bằng dung dịch NaOH 0,1N đến khi vừa mất màu hồng.

Hiệu số giữa tổng thể tích dung dịch H_2SO_4 0,1N cho vào bình hứng và thể tích dung dịch NaOH 0,1N đã dùng để chuẩn độ sẽ cho biết lượng axit đã tác dụng với NH_3 , 1ml dung dịch H_2SO_4 0,1N tương ứng với 1,42mg Nitơ.

Tính kết quả:

Tính lượng nitơ tổng số trong 1 gam protein như sau:

$$N \text{ (mg)} = \frac{(A - B.1,42)}{0,2}$$

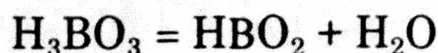
trong đó:

A - Tổng thể tích (ml) H_2SO_4 0,1 N cho vào bình hứng

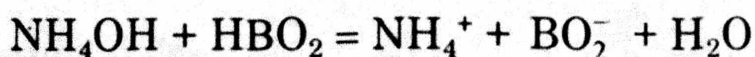
B - Thể tích (ml) NaOH 0,1 N chuẩn độ H_2SO_4 0,1 N còn lại trong bình hứng.

0,2 - Lượng mẫu (g) lấy nghiên cứu.

Ngoài hệ chuẩn H_2SO_4 -NaOH, người ta còn sử dụng hệ chuẩn H_2SO_4 - H_3BO_3 trong việc xác định hàm lượng nitơ để tránh những sai số về sự thay đổi nồng độ của kiềm trong không khí. Cách tiến hành như sau: cho vào bình hứng 20ml H_3BO_3 2%, thêm nước cất đủ để dung dịch ngập đầu ra của hệ thống làm lạnh. Trong bình hứng xảy ra quá trình phân ly của H_3BO_3 :

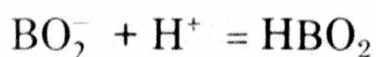


Khi cất đậm, NH_3 bị kiềm đẩy khỏi $(NH_4)_2SO_4$ sẽ phản ứng với HBO_2 :



Vì BO_2^- là một bazơ mạnh nên dung dịch trong bình hứng sẽ chuyển từ màu tím sang màu xanh lá mạ. Lượng BO_2^- được tạo thành tương đương với lượng NH_3 bị đẩy ra trong quá trình

cất đậm và được xác định bằng cách chuẩn độ ngược với H_2SO_4 0,1 N. Giai đoạn chuẩn độ kết thúc khi dung dịch chuyển từ màu xanh lá mạ sang màu tím:



Tính kết quả:

$$\text{N(mg)} = \frac{\text{C}.1,42}{0,2}$$

trong đó:

C - Lượng H_2SO_4 0,1 N (ml) dùng để chuẩn độ

0,2 - Lượng mẫu (g) lấy nghiên cứu

Xác định nitơ phi protein (N-phi protein)

Để xác định N- phi protein cần dùng các dung môi thích hợp để chiết rút tất cả các dạng N-phi protein, tuy nhiên trong dịch chiết vẫn còn lẫn một vài loại protein. Vì vậy cần dùng chất kết tủa để tách phần protein hòa tan trong quá trình chiết rút.

Dung môi chiết rút các dạng N- phi protein thường là etanol 70%. Cách làm như sau: cân 5-10g nguyên liệu đã nghiền nhỏ cho vào cối thủy tinh, nghiền lẫn với etanol 70% (tỷ lệ thể tích nguyên liệu là 1/4 nếu là mẫu tươi và 1/8 nếu là mẫu khô). Nghiền 20 phút, sau đó ngâm khoảng 40-80 phút, khuấy liên tục. Lọc tách bã. Bã được chiết lại bằng etanol một lần nữa theo tỷ lệ 1/4 và nhiều lần bằng nước cất vô đậm cho đến khi thử không còn phản ứng màu với ninhidrin. Đồn tất cả các dịch chiết lại và đem kết tủa protein.

Kết tủa protein có thể tiến hành theo nhiều cách như: bằng etanol, axeton, các muối kim loại nặng, axit, thẩm tích đối nước hoặc đun ở nhiệt độ cao v.v... nhưng thông dụng nhất là dùng các chất kết tủa sau đây: TCA 10-20%, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 10-15%, CuSO_4 10% trong hỗn hợp với NaOH 10%, tỷ lệ 1 : 1.

Sau khi loại bỏ kết tủa, dịch lọc chỉ còn chứa các dạng N - phi protein. Dem vô cơ hóa dịch này và tiếp tục tiến hành xác định hàm lượng nitơ theo phương pháp Kjeldahl.

Định lượng protein trong nguyên liệu

N-tổng số bao gồm N-protein và N-phi protein. Muốn xác định hàm lượng protein trong nguyên liệu phải xác định N-tổng số và N-phi protein. Hàm lượng protein trong mẫu được tính công thức sau:

$$\text{Protein(mg)} = (\text{N}_{\text{tổng số}} - \text{N}_{\text{phi protein}}) \cdot 6,25$$

b) Xác định protein theo phương pháp Lowry

Nguyên tắc: Protein tác dụng với thuốc thử Folin tạo thành sản phẩm màu xanh. Đây là sản phẩm khử của photphomolipđen-photphovolframmat bởi phức chất đồng-protein và có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 750nm. Dùng máy so màu để xác định cường độ màu trong các mẫu và so sánh với dịch protein chuẩn.

Phương pháp Lowry sử dụng kết hợp phản ứng biure (tác dụng lên liên kết peptit, mục 1.3.1) và phản ứng với thuốc thử Folin (tác dụng lên các gốc tirozin, triptophan, histidin) để tạo phức có màu đặc trưng. Phương pháp có độ nhạy tương đối cao, cho phép xác định được đến nồng độ vài chục μg protein, do vậy được sử dụng rộng rãi để xác định nhiều loại protein ở dạng tương đối tinh khiết. Tuy nhiên nó có nhược điểm là màu của phức chất bị ảnh hưởng nếu trong dung dịch có một số chất như EDTA, đệm Tris, sacarozơ hay một số chất khử như xistein, ditiotreitol...

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch nghiên cứu (trong đó có chứa khoảng 50-300 μg protein/ml)

Dung dịch A: Na_2CO_3 2% hòa trong NaOH 0,1 N.

Dung dịch B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5% pha trong dung dịch natri xitrat 1% (hoặc trong kali natri tetrat 1%).

Dung dịch C (chỉ pha trước khi dùng): trộn 1 thể tích dung dịch B với 49 thể tích dung dịch A.

Dung dịch Folin pha loãng 2 lần (xem phụ lục).

Thiết bị: Máy so màu quang điện.

Cách làm: Hút chính xác vào ống nghiệm sạch khô 0,5ml dung dịch nghiên cứu, thêm vào 2,5ml dung dịch C, lắc đều và giữ ở nhiệt độ phòng 10 phút. Sau đó thêm chính xác 0,25ml dung dịch Folin đã pha loãng 2 lần, lắc đều, sau 30 phút đem so màu trên máy với kính lọc ánh sáng màu đỏ.

Song song với mẫu thí nghiệm, làm ống đối chứng trong đó thay dung dịch protein bằng nước cất và tiếp tục làm như đã nói trên.

Lập đồ thị chuẩn protein: Chuẩn bị các dung dịch protein chuẩn (thường là anbumin tinh khiết) có các nồng độ pha loãng khác nhau chứa một lượng protein tương ứng là: 20, 50, 100, 150, 200, 300 và 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ protein từ một dịch gốc ban đầu có nồng độ 1mg/ml. Tiến hành làm phản ứng màu với các dịch chuẩn theo thứ tự, thành phần và tỷ lệ các hóa chất như với dịch nghiên cứu. Dựng đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa mật độ quang học và nồng độ protein.

Từ số đọc của mẫu thí nghiệm, đối chiếu với đồ thị chuẩn để tính ra hàm lượng protein trong 1ml dịch nghiên cứu, từ đó tính ra hàm lượng % protein trong nguyên liệu.

c) *Xác định protein theo phương pháp Bradford*

Nguyên tắc: Các protein khi phản ứng với xanh Coomassie (Coomassie Brilliant Blue - CBB) sẽ hình thành hợp chất màu có khả năng hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 595nm, cường độ

màu tỷ lệ với nồng độ protein trong dung dịch. Phương pháp có độ nhạy cao, cho phép phát hiện tới vài μg protein/ml, dễ thực hiện và tiết kiệm thời gian.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch mẫu protein cần xác định, dung dịch protein chuẩn (albumin huyết thanh bò) 1mg/ml.

Chuẩn bị thuốc thử Bradford: hòa tan 100mg CBB G250 trong 50ml etanol 95% và 100ml H_3PO_4 85%, bổ sung H_2O đến 1000ml.

Thiết bị: Máy so màu quang điện.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 200 μl dung dịch mẫu protein, 2ml dung dịch thuốc thử Bradford, lắc đều. Sau 2 phút đo độ hấp thụ ánh sáng ở $\lambda = 595\text{nm}$ (chú ý cần đo trước 1 giờ).

Dựng đồ thị chuẩn protein từ dung dịch albumin huyết thanh bò 1mg/ml: chuẩn bị 6 ống nghiệm sạch, khô, cho vào lần lượt các ống từ I-VI lượng dung dịch chuẩn tương ứng là 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 μl , thêm H_2O đến 200 μl , cho thêm 2ml thuốc thử Bradford, lắc đều và đo mật độ quang học như ở trên. Dựng đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa mật độ quang học và nồng độ protein.

Từ số đọc của mẫu thí nghiệm, đối chiếu với đồ thị chuẩn để tính ra hàm lượng protein.

Chương 2

Enzim

Enzim là những protein đơn giản hoặc protein phức tạp có khả năng xúc tác đặc hiệu cho các phản ứng hóa sinh. Để định tính hoặc định lượng enzim có thể dùng những phản ứng đặc trưng với cơ chất của enzim (chất bị chuyển hóa) hoặc với sản phẩm được tạo thành trong quá trình phản ứng.

Hoạt độ của enzim phụ thuộc vào các yếu tố vật lý và hóa học khác nhau như nhiệt độ, pH môi trường và một số chất có bản chất hóa học khác nhau. Các chất này có thể làm tăng hoặc làm giảm hoạt độ xúc tác của enzim và được gọi tương ứng là các chất kích thích hoặc các chất kìm hãm enzim.

2.1 Các thí nghiệm định tính một số enzim

2.1.1 Pepxin (peptit-peptidohidrolaz)

Để định tính enzim này có thể dựa vào khả năng làm đông sữa của nó. Quá trình làm đông sữa là do chuyển cazeinogen hòa tan thành casein không tan ở khoảng pH = 4,5 - 5,5.

Nguyên liệu và hóa chất: Dịch dạ dày đã lọc trong (chứa pepxin), hỗn hợp sữa-axetat (trộn lẫn một thể tích sữa tươi và một thể tích dung dịch đậm axetat 0,1N; pH = 5).

Dụng cụ: Tủ ấm hoặc nồi cách thủy ổn nhiệt (25°C), đồng hồ bấm giây.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 5ml hỗn hợp sữa-axetat, giữ ở 25°C, sau khi đạt đến nhiệt độ thêm 0,1ml dịch dạ dày, lắc đều, dùng đồng hồ bấm giây xác định thời gian xuất hiện kết tủa casein trên thành ống nghiệm.

2.1.2 Amilaz của nước bọt

Amilaz của nước bọt người thuộc loại α - amilaz, xúc tác cho phản ứng thủy phân tinh bột thành các dextrin khác nhau. Các dextrin này khác nhau về khối lượng phân tử, khả năng cho phản ứng màu với iôt và khả năng khử dung dịch Fehling.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch tinh bột 1% (xem mục 3.1.2.a), thuốc thử Liugôn (xem mục 3.1.2.a), thuốc thử Fehling (xem mục 3.1.1.b).

Dụng cụ và thiết bị: Nồi cách thủy ổn nhiệt (40°C), bản sứ để thử pH, phễu thủy tinh, bình nón (V= 100ml), ống đong (V= 50ml).

Cách làm: Chuẩn bị dung dịch nước bọt: súc miệng sạch, lấy 50ml nước cất để súc miệng nhẹ vài lần trong khoảng 3 - 5 phút. Lọc dịch nước bọt qua bông và dịch lọc dùng để thí nghiệm.

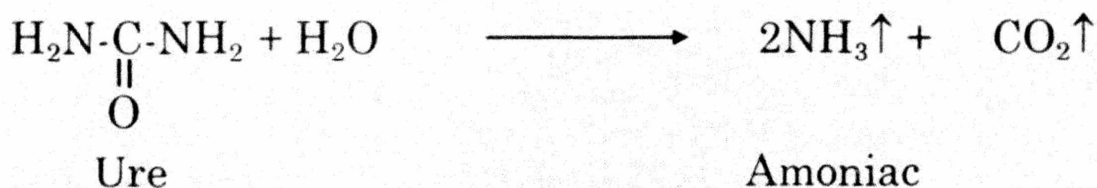
- Thủy phân tinh bột: chuẩn bị 2 ống nghiệm, cho vào mỗi ống 5ml dung dịch tinh bột. Thêm vào ống thứ I: 5ml dung dịch nước bọt, ống thứ II: 5ml nước cất, lắc đều. Đổ vào mỗi ống một chiếc đĩa thủy tinh, đặt cả 2 ống vào nồi cách thủy 40°C. Sau 1, 2, 4, 6, 8 phút dùng đĩa thủy tinh lấy từ mỗi ống nghiệm 1 giọt hỗn hợp phản ứng nhỏ vào các giếng trên bản sứ, thêm vào mỗi giếng 2 giọt thuốc thử Liugôn. Quan sát màu ta thấy ở dãy thí nghiệm (chứa nước bọt) có sự biến đổi màu các giọt trên bản sứ,

tùy theo thời gian phản ứng: từ màu xanh tím đến đỏ nâu, đỏ và cuối cùng là màu vàng. Ở đây kiểm tra, tất cả các giọt đều có màu xanh tím. Giải thích kết quả thu được.

Thử khả năng khử hỗn hợp Fehling: Thêm vào ống I và II mỗi ống 2ml hỗn hợp Fehling, đun sôi, ở ống có amilaz xuất hiện kết tủa đỏ nâu của Cu_2O .

2.1.3 Ureaz

Ureaz xúc tác cho phản ứng thủy phân ure tạo thành amoniac (NH_3) và khí CO_2 .



Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch ure 1%, dung dịch phenolphthalein 1% trong etanol và dung dịch ureaz được chuẩn bị qua các bước sau:

- Loại lipid khỏi nguyên liệu: cân 100g đậu tương khô, nghiền thật nhỏ, cho vào bình, lắc 10 - 15 phút với 200ml ete dầu hỏa để loại lipid, lọc qua phễu lọc Buchner. Lặp lại bước loại lipid 5-6 lần. Sau đó rải bột trên giấy lọc để làm bay hơi dung môi. Bột khô thu được dùng để tách ureaz.

- Chuẩn bị dung dịch ureaz: cho 20 - 30g bột đậu tương đã loại lipid vào cốc hoặc bình nón, thêm 5 lần thể tích nước cất, lắc đều, cho vài giọt toluen, để 15 - 20 giờ ở 5°C . Li tâm ở 3000 vòng/phút trong 20 phút, dung dịch trên kết tủa trong suốt nhận được chứa ureaz được dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

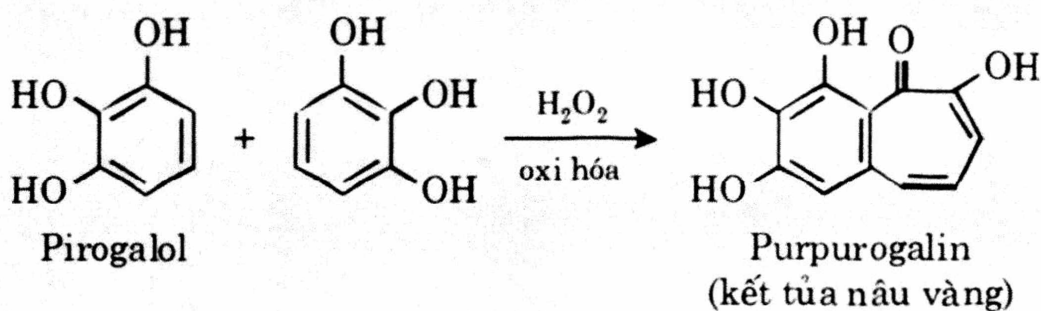
Thiết bị: Tủ ấm hoặc nồi cách thủy ổn nhiệt (37°C).

Cách làm: Lấy 2 ống nghiệm, cho vào mỗi ống 2ml dung dịch ureaz (đã pha loãng 10 lần). Đun sôi ống I để bất hoạt

enzim (ống II để nguyên). Thêm vào mỗi ống 2ml dung dịch ure và 2 giọt dung dịch phenolphthalein, lắc đều, giữ ở 37° trong 30 phút. Quan sát sự chuyển màu của hỗn hợp phản ứng, giải thích kết quả.

2.1.4 Peroxidaz

Peroxidaz xúc tác cho phản ứng oxi hóa pirogalol nhờ H_2O_2 tạo thành purpurogalin (kết tủa nâu - vàng).



Nguyên liệu và hóa chất: Khoai tây tươi, dung dịch pirogalol 1%, H_2O_2 2%.

Cách làm: Mài nhỏ khoai tây, lấy một ít cho vào ống nghiệm, thêm 1 - 2ml dung dịch pirogalol 1% và 1 - 2 giọt dung dịch H_2O_2 2%, xuất hiện kết tủa nâu vàng.

2.2 Tính chất của enzym

2.2.1 Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của amilaz nước bọt

Đa số enzym tách từ cơ thể động vật máu nóng hoạt động mạnh nhất ở 37 - 40°C (nhiệt độ thích hợp). Ngoài giới hạn nhiệt độ này, hoạt động enzym thường bị giảm. Ở nhiệt độ cao hơn 70°C hầu hết enzym bị mất hoàn toàn hoạt tính xúc tác.

Trong thí nghiệm này, dùng α -amilaz nước bột để thủy phân tinh bột ở các nhiệt độ khác nhau. Đánh giá hoạt động của enzym bằng phản ứng màu với iôt.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch nước bột pha loãng 10 lần (chuẩn bị theo phương pháp ở mục 2.1.2), dung dịch tinh bột 1%, thuốc thử Liugôn hoặc dung dịch iôt 0,3% trong KI 3%.

Dụng cụ và thiết bị: bản sứ thử pH, nồi cách thủy (100°C), tủ ấm (37°C), phích đá.

Cách làm: Chuẩn bị 3 ống nghiệm, cho vào mỗi ống 2ml dung dịch tinh bột 1%. Đặt ống I vào nồi cách thủy đang sôi, ống II vào tủ ấm 37°C, ống III vào nước đá. Giữ các ống 15 phút để dung dịch trong ống đạt đến các nhiệt độ tương ứng. Cho vào mỗi ống 0,5ml dung dịch enzym cũng đã đạt các nhiệt độ trên. Đặt các ống nghiệm vào các nhiệt độ cũ. Sau 1, 2, 4, 6, 8 và 12 phút lấy từ mỗi ống 1 giọt, nhỏ vào các giọt thuốc thử Liugôn đã chuẩn bị sẵn trên các giếng của bản sứ hoặc trên bản kính. Quan sát màu tạo thành, nhận xét sự sai khác giữa các mẫu và giải thích.

2.2.2 Ảnh hưởng của pH môi trường đến hoạt độ của enzym - Xác định pH thích hợp của amilaz trong nước bột

pH môi trường ảnh hưởng rất rõ rệt đến hoạt độ của enzym. Mỗi enzym hoạt động mạnh nhất ở một pH xác định, ở các pH khác hoạt độ của enzym bị giảm. pH thích hợp cho hoạt độ thủy phân tinh bột của α -amilaz nước bột ở vùng trung tính (gần bằng 7). Tuy nhiên pH thích hợp của enzym có thể thay đổi tùy thuộc điều kiện phản ứng.

Hóa chất: Dung dịch nước bột pha loãng 20 lần, Na_2HPO_4 1/15 M, KH_2PO_4 1/15M, dung dịch tinh bột 0,5% trong NaCl 0,1%, thuốc thử Liugôn.

Cách làm: Chuẩn bị 7 ống nghiệm sạch, đánh số thứ tự từ I - VII, cho vào mỗi ống các dung dịch Na_2HPO_4 và KH_2PO_4 theo các thể tích ghi trong bảng, lắc đều. Cho vào mỗi ống 1ml dung dịch tinh bột 0,5% trong NaCl 0,1%, lắc đều, thêm vào mỗi ống 1ml dung dịch nước bọt pha loãng 20 lần, lắc đều. Sau 3 phút lấy 0,2ml dung dịch của mỗi ống cho lên bản sứ để thử phản ứng màu với thuốc thử Liugôn. Cứ sau 5 phút lại thử 1 lần cho đến khi dung dịch của một ống nào đó cho phản ứng âm với thuốc thử Liugôn thì bắt đầu cho vào tất cả các ống 3 giọt thuốc thử Liugôn, lắc đều. Ghi màu của mỗi ống vào bảng. Xác định pH thích hợp của α - amilaz nước bọt (pH của ống cho phản ứng âm với thuốc thử Liugôn).

Bảng xác định pH thích hợp của α -amilaz nước bọt

Số TT	Na_2HPO_4 1/15M (ml)	KH_2PO_4 1/15M (ml)	pH dung dịch	Dung dịch tinh bột 0,5% (ml)	Dung dịch nước bọt (ml)	Màu với thuốc thử Liugôn
I	0,1	4,9	5,3	1	1	
II	0,3	4,7	5,6	1	1	
III	1,0	4,0	6,2	1	1	
IV	2,5	2,5	6,8	1	1	
V	3,5	1,5	7,2	1	1	
VI	4,5	0,5	7,7	1	1	
VII	4,9	0,1	8,4	1	1	

2.2.3 Ảnh hưởng của các chất kích thích và các chất kìm hãm

Ảnh hưởng của NaCl và CuSO₄ đến hoạt độ amilaz

Hoạt độ thủy phân tinh bột của α -amilaz nước bọt được kích thích bởi NaCl và bị kìm hãm bởi CuSO₄. Để nghiên cứu tác dụng của các chất này người ta cho enzym thủy phân tinh bột trong điều kiện có và không có NaCl hoặc CuSO₄. Đánh giá hoạt độ của enzym dựa theo màu của hỗn hợp phản ứng với iôt.

Hóa chất: Dung dịch nước bọt pha loãng 20 lần, dung dịch tinh bột 0,5%, NaCl 1%, CuSO₄ 1%, thuốc thử Liugôn.

Cách làm: Chuẩn bị 3 ống nghiệm, cho vào

Ống I : 1ml nước cất.

Ống II : 0,8ml nước cất và 0,2ml NaCl

Ống III : 0,8ml nước cất và 0,2ml CuSO₄.

Lắc đều, cho vào mỗi ống 1ml nước bọt đã pha loãng 20 lần và 1ml dung dịch tinh bột, lắc đều. Sau vài phút, thêm vào mỗi ống vài giọt thuốc thử Liugôn, lắc đều và quan sát sự khác nhau giữa các ống. Giải thích kết quả.

2.2.4 Tính đặc hiệu của enzym

Tính đặc hiệu của enzym thể hiện ở chỗ mỗi enzym chỉ có thể tác dụng lên một hoặc một số chất có cùng một kiểu cấu trúc và chuyển hóa cơ chất theo một kiểu phản ứng nhất định. Tuy nhiên, mức độ đặc hiệu có thể thay đổi tùy enzym: ví dụ ureaz được xem là enzym có tính đặc hiệu tuyệt đối vì ngoài ure hầu như nó không tác dụng hoặc tác dụng rất yếu lên các hợp chất khác, trong khi đó sacaraz không chỉ thủy phân liên kết β -glicozit của sacarozơ mà còn có thể thủy phân liên kết β -glicozit của các hợp chất khác như có trong rafinoz.

a) Tính đặc hiệu của ureaz

Hóa chất: Ureaz (bột đậu tương), dung dịch ure 5%, dung dịch axetamid 5%

Cách làm: Chuẩn bị 2 ống nghiệm sạch, cho vào ống I: 3 - 4ml dung dịch ure 5%, ống II: 3 - 4ml dung dịch axetamid 5%, thêm vào mỗi ống 1g bột đậu tương, lắc đều, đặt trên miệng mỗi ống nghiệm một mảnh giấy quỳ, đậy cả 2 ống bằng nút bấc. Sau một lúc ta thấy ở ống chứa ure giấy quỳ chuyển sang màu xanh. Ở ống II giấy quỳ không đổi màu. Giải thích sự khác nhau này.

b) Tính đặc hiệu tác dụng của α -amilaz nước bọt và sacaraz của nấm men

Hóa chất: Dung dịch α - amilaz nước bọt, dung dịch sacaraz của nấm men, dung dịch tinh bột 1%, dung dịch sacarozer 1%, dung dịch iôt 0,3% trong KI 3%, thuốc thử Fehling.

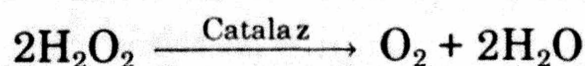
Thiết bị: Tủ ấm hoặc nồi cách thủy ổn nhiệt (38- 40°C).

Cách làm: Chuẩn bị 4 ống nghiệm, đánh số thứ tự từ I đến IV, cho vào các ống I và II mỗi ống 2ml dung dịch tinh bột, ống III và ống IV: 2ml dung dịch sacarozer. Thêm vào ống I và III: mỗi ống 0,5ml dung dịch nước bọt: ống II và ống IV - 0,5ml dung dịch sacaraz. Lắc đều các ống, giữ ở 38 - 40°C trong 10 phút, làm lạnh. Thêm vài giọt dung dịch iôt trong KI vào ống I và ống II. Quan sát màu và giải thích. Làm phản ứng với thuốc thử Fehling với ống III và ống IV. Quan sát, giải thích kết quả.

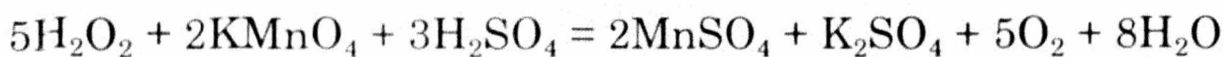
2.3 Xác định hoạt độ của một số enzym

2.3.1 Xác định hoạt độ catalaz

Catalaz xúc tác cho phản ứng sau:



Để định lượng catalaz có thể dùng dung dịch KMnO_4 0,1N để xác định lượng H_2O_2 trước và sau khi enzym tác dụng, từ đó tính được lượng H_2O_2 đã bị phân giải.



Từ phương trình phản ứng này ta tính được 1ml dung dịch KMnO_4 0,1N tương ứng với 1,7mg H_2O_2 .

Nguyên liệu và hóa chất: Khoai tây, cát thạch anh (hoặc bột thủy tinh), bột CaCO_3 , KMnO_4 0,1 N, H_2SO_4 10%, H_2O_2 0,1% trong đệm photphat pH = 7,0.

Dụng cụ và thiết bị: Cối, chày sứ, buret (V = 50ml), bình định mức (V = 100ml), bình nón (V = 250ml), nồi cách thủy (100°C).

Cách làm: Chuẩn bị dung dịch catalaz: cân 2g khoai tây cho vào cối, nghiền với cát thạch anh (hoặc bột thủy tinh). Thêm từ từ 2-3ml nước và một ít CaCO_3 để trung hòa dung dịch chiết (đến khi ngừng tạo thành bọt CO_2). Chuyển toàn bộ mẫu vật đã nghiền nhỏ trong cối vào bình định mức, thêm nước cất vào đến 100ml, lắc đều và để lắng khoảng 30 phút, lọc thu dung dịch trong.

Xác định hoạt độ catalaz của dung dịch lọc. Lấy 2 bình nón dung tích 250ml, cho vào bình I (bình thí nghiệm): 25ml dung dịch H_2O_2 0,1%, 20ml dung dịch enzym, giữ ở 30° trong 30 phút, thêm 5ml H_2SO_4 10% và chuẩn độ bằng KMnO_4 0,1N đến khi xuất hiện màu hồng bên trong 1 phút. Cho vào bình II (bình kiểm tra) 20ml dung dịch enzym và đặt vào nồi cách thủy đang sôi trong 5 phút để bất hoạt enzym, lấy ra để nguội. Thêm vào bình 25ml dung dịch H_2O_2 0,1% và tiếp tục làm như với bình I.

Tính kết quả: Số mg H_2O_2 bị phân giải bởi enzym trong 1g khoai tây (X) được tính theo công thức sau:

$$X = \frac{(A - B) \cdot 1,7 \cdot V_1}{V_2 \cdot a}$$

trong đó:

A - Thể tích KMnO_4 0,1N dùng để chuẩn độ H_2O_2 có trong bình kiểm tra (bình II).

B - Thể tích KMnO_4 0,1N dùng chuẩn độ H_2O_2 còn lại trong bình thí nghiệm (bình I).

V_1 - Thể tích dung dịch enzym ban đầu (trong thí nghiệm này = 100ml)

V_2 - Thể tích dung dịch enzym lấy để xác định (20ml).

a - Số gam nguyên liệu lấy nghiên cứu (2g).

Số đơn vị catalaz trong 1g khoai tây/ μmol H_2O_2 bị phân giải sau 1 phút là:

$$Y \text{ (đơn vị)} = \frac{X}{30 \times 0,034}$$

trong đó:

30: thời gian enzym tác dụng.

0,034: 1 micro đương lượng H_2O_2 bằng 0,034mg.

2.3.2 Xác định hoạt độ α – amilaz theo phương pháp Wohlgemuth

Nguyên tắc: Dùng dung dịch amilaz có độ pha loãng khác nhau tác dụng với một lượng tinh bột như nhau. Tìm nồng độ enzym nhỏ nhất có thể phân giải hoàn toàn lượng tinh bột đó. Biểu diễn hoạt độ bằng đơn vị Wohlgemuth.

Một đơn vị Wohlgemuth là lượng enzym có thể phân giải 1mg tinh bột thành các sản phẩm không có màu với iôt trong 30 phút ở 37°C khi có anion clo (Cl^-).

Nguyên liệu và hóa chất: Nước bọt pha loãng 10 lần, dung dịch tinh bột 0,1 % trong đệm photphat pH = 6,8 NaCl 0,9%, dung dịch iôt 0,02N (2g KI hòa tan trong 3- 5ml nước, thêm 0,25g iôt và dẫn nước đến 100ml).

Thiết bị: Tủ ấm hoặc nồi cách thủy ổn nhiệt (37°C).

Cách làm: Chuẩn bị 10 ống nghiệm, đánh số từ I - X. Cho vào mỗi ống 1ml NaCl 0,9%. Thêm vào ống thứ I: 1ml dịch enzym, lắc đều, lấy ra 1ml cho vào ống II, lắc đều, lấy ra 1ml cho vào ống III... Tiếp tục làm như thế cho đến ống X, lấy 1ml từ ống X bỏ đi. Sau đó cho vào mỗi ống 2ml dung dịch tinh bột 0,1%, lắc đều, giữ ở 37°C trong 30 phút. Khi thời gian hết, làm nguội ống nghiệm đến nhiệt độ phòng, cho vào mỗi ống 2 giọt dung dịch iôt 0,02N. Ghi ống có độ pha loãng lớn nhất vẫn còn khả năng phân giải hoàn toàn tinh bột (ống có màu vàng và ống tiếp sau đó vẫn còn màu đỏ nâu hoặc tím).

Tính kết quả:

Trong mỗi ống nghiệm có chứa 2ml tinh bột 0,1% (tương ứng 2mg tinh bột). Giả sử sau khi thêm iôt, từ ống I đến ống V dung dịch đều có màu vàng, ống VI có màu đỏ nâu thì hoạt độ của α - amilaz trong 1ml nước bọt chưa pha loãng đã dùng để thí nghiệm là:

$$2^5 \cdot 10 \cdot 2 = 32 \cdot 10 \cdot 2 = 640 \text{ đơn vị}$$

trong đó:

32.10- độ pha loãng ở ống V.

2 - là 2ml tinh bột.

2.3.3 Xác định hoạt độ ureaz theo phương pháp chuẩn độ

Nguyên tắc: Dùng phương pháp chuẩn độ để xác định lượng NH_3 được tạo thành từ ure dưới tác dụng của ureaz.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch ureaz (xem 2.1.3.), $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 5%, dung dịch ure 2%, HCl 0,1 N, dung dịch chỉ thị hỗn hợp.

Thiết bị: Tủ ấm (30°C).

Cách làm: Lấy hai bình nón dung tích 100ml. Cho vào mỗi bình 10ml ureaz. Bình I (bình thí nghiệm) để nguyên, bình II

(bình kiểm tra) đun sôi 2-3 phút, sau đó làm nguội đến nhiệt độ phòng. Cho vào mỗi bình 10ml ure 2%, lắc đều, để vào tủ ấm 30°C trong 30 phút. Khi thời gian hết, lấy ra, thêm vào mỗi bình 5ml $Pb(CH_3COO)_2$ 5%, 3 - 5 giọt dung dịch chỉ thị hỗn hợp, lắc đều. Chuẩn độ cả hai bình bằng HCl 0,1N đến khi dung dịch có màu tím nhạt. 1ml HCl 0,1N tương ứng với 1,4mg nitơ.

Hoạt độ ureaz là số mg nitơ được giải phóng từ ure dưới tác dụng của ureaz có trong lượng dung dịch enzym đã dùng trong 1 phút và được tính theo công thức sau.

$$X = \frac{(A - B).1,4}{30}$$

trong đó:

X - Hoạt độ ureaz.

A - Thể tích HCl 0,1N đã dùng để chuẩn độ bình thí nghiệm (I).

B - Thể tích HCl 0,1N đã dùng để chuẩn độ bình kiểm tra (II).

30 - Thời gian phản ứng (tính bằng phút).

1,4- Hệ số chuyển thành lượng nitơ.

Muốn tính hoạt độ của nguyên liệu ban đầu (trên gam mẫu), cần nhân kết quả trên với tổng thể tích dung dịch enzym chiết được, chia cho số gam mẫu. Ví dụ: từ 20 gam bột chiết được 100ml dung dịch enzym, đã lấy 10ml để xác định hoạt độ. Khi đó hoạt độ trên 1 gam mẫu là:

$$Y = \frac{X.100}{10.20}$$

trong đó:

Y - hoạt độ enzym tính trên 1 gam mẫu

X - hoạt độ enzym của lượng dung dịch đã lấy để xác định.

2.3.4 Xác định hoạt độ proteinaz theo phương pháp Anson cải tiến

Nguyên tắc: Cho proteinaz tác dụng với cơ chất casein hoặc hemoglobin đã bị biến tính, sau đó kết tủa protein dư thừa bằng TCA, xác định sản phẩm được tạo thành bằng phản ứng màu với thuốc thử Folin.

Biểu diễn hoạt độ bằng đơn vị hoạt độ. Một đơn vị hoạt độ là lượng enzym trong điều kiện tiêu chuẩn, sau 1 phút phân giải protein tạo thành các sản phẩm hòa tan trong TCA tương ứng với 1 μ mol tirozin.

Nguyên liệu và hóa chất: Thuốc thử Folin (pha loãng 5 lần), Na₂CO₃ 6%, TCA 5%. Dung dịch casein 1% trong đệm photphat 1/15M, pH = 8,0. Dung dịch enzym: dung dịch môi trường nuôi cấy vi sinh vật hoặc dịch proteinaz được chiết từ nguyên liệu nhất định (dung dịch chiết từ dứa tươi).

Thiết bị: Tủ ấm 37°C, máy quang phổ hoặc máy so màu quang điện.

Cách làm: Lấy hai ống nghiệm sạch, khô.

+ Cho vào ống I (ống thí nghiệm) 0,5ml dung dịch enzym, giữ 10 - 15 phút ở 30°C, thêm 1ml dung dịch casein (đã đạt 30°C), lắc đều, giữ ở 30°C đúng 10 phút. Sau đó cho ngay 2,5ml TCA vào, lắc đều và để lắng 30 phút ở nhiệt độ phòng. Lọc, dung dịch lọc trong suốt nhận được có chứa sản phẩm hòa tan trong TCA của phản ứng enzym. Hàm lượng của sản phẩm trong dung dịch lọc được xác định bằng phản ứng màu.

Phản ứng màu: Lấy 0,5ml cho vào ống nghiệm, thêm 2ml Na₂CO₃ 6%, lắc đều, thêm 0,5ml thuốc thử Folin pha loãng 5 lần, lắc đều. Sau 30 phút để ở nhiệt độ phòng đem so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 750nm hoặc trên máy so màu quang điện với kính lọc màu đỏ.

+ Ống II (ống kiểm tra): cho 0,5ml enzym, 2,5ml dung dịch TCA, lắc đều để bất hoạt enzym, thêm 1ml dung dịch casein, lắc đều để ở 30°C đúng 10 phút, sau đó để thêm 30 phút ở nhiệt độ phòng và tiếp tục làm như ống I.

+ Ống đối chứng: ống đối chứng thay 0,5ml dung dịch lọc bằng 0,5ml nước cất. Các bước tiếp theo thực hiện như với ống I và ống II.

Tính kết quả: Tính hiệu số giá trị mật độ quang học của mẫu thí nghiệm và mẫu kiểm tra, dựa vào đồ thị chuẩn tính lượng μmol tirozin tương ứng. Tính hoạt độ của 1ml dung dịch enzym theo công thức sau:

$$X = \frac{a.8.b}{t}$$

trong đó:

X - Số đơn vị hoạt độ trong 1ml dịch enzym

8 - Thể tích của hỗn hợp phản ứng và TCA (4ml : 0,5ml).

a - Số μmol tirozin tương ứng với hiệu số giá trị mật độ quang học của ống thí nghiệm và ống kiểm tra.

b - Độ pha loãng dung dịch enzym (nếu có)

t - Thời gian phản ứng (10 phút)

Ghi chú: Đồ thị chuẩn tirozin có thể làm song song hoặc làm trước.

Cách làm: Chuẩn bị dung dịch tirozin 1 $\mu\text{mol/ml}$ trong HCl 0,2 N rồi pha loãng dung dịch này với độ pha loãng khác nhau từ 0,01 - 0,1 $\mu\text{mol/ml}$ bằng HCl 0,2 N. Lấy 0,5ml từ mỗi dịch pha loãng và làm phản ứng màu như trên. Đo mật độ quang học của các ống. Dụng đồ thị chuẩn biểu diễn sự tương quan giữa mật độ quang học và nồng độ protein.

2.3.5 Xác định hoạt độ của lipaz

Có thể xác định được hoạt độ lipaz theo hàm lượng axit béo được giải phóng ra từ lipit dưới tác dụng của lipaz.

Nguyên liệu và hóa chất: KOH 0,1N, etanol tuyệt đối hoặc 96%, phenolphthalein 1%. Chế phẩm lipaz tụy tạng được chuẩn bị như sau: Cân 1 gam tụy tạng động vật cho vào cối sứ, thêm 5ml hỗn hợp nước - glixerin (tỷ lệ 3: 1), nghiền kỹ trong 3 - 5 phút. Sau đó lại thêm 5ml hỗn hợp nước - glixerin và nghiền tiếp 1 - 2 phút. Lọc vớt hỗn hợp qua hai lớp vải màn, sau đó lọc lại qua giấy lọc, thu được dịch lipaz để làm thí nghiệm.

Dụng cụ và thiết bị: Bình nón dung tích 100ml, buret, tủ ấm (37°C - 40°C).

Cách làm: Lấy hai bình nón dung tích 100ml, cho vào mỗi bình 10ml sữa tươi. Bình I (bình kiểm tra) được đun đến sôi, sau đó cho ngay 2ml lipaz vào và đun sôi tiếp 5 phút. Để nguội đến nhiệt độ phòng. Bình II (bình thí nghiệm) để nguyên, thêm vào 2ml lipaz, lắc đều. Để cả hai bình vào tủ ấm 37 - 40°C. Sau 1 giờ lấy hai bình ra, thêm vào mỗi bình 8ml etanol tuyệt đối hoặc 96%, vài giọt phenolphthalein và chuẩn độ cả hai bình bằng KOH 0,1 N. Hoạt độ lipaz được biểu thị bằng sốml KOH đã dùng để chuẩn độ axit béo tạo thành từ sự thủy phân lipit có trong 1 lít sữa và được tính theo công thức:

$$X = (a - b) \cdot k \cdot 100$$

trong đó:

a - Số ml KOH 0,1N đã dùng để chuẩn độ bình thí nghiệm (II)

b - Số ml KOH 0,1N đã dùng để chuẩn độ bình kiểm tra (I).

k - Hệ số điều chỉnh của dung dịch KOH.

Chương 3

Sacarit

Sacarit là một trong những thành phần quan trọng của cơ thể sinh vật, là thành phần chủ yếu trong thức ăn của người và nhiều động vật. Tuy nhiên chúng không chỉ có vai trò cung cấp năng lượng mà còn có vai trò cấu trúc và bảo vệ cơ thể.

Để phân loại sacarit người ta thường dựa vào bản chất hóa học của chúng; có thể phân thành hai nhóm lớn: monosacarit và polisacarit.

Monosacarit là những anđehit polioliol (các anđozơ) hoặc xeton polioliol (các xetozơ), vì vậy chúng có thể cho những phản ứng của các nhóm chức này. Phản ứng quan trọng và được dùng nhiều trong định tính và định lượng sacarit là phản ứng khử các muối kim loại. Ngoài phản ứng chung này, các monosacarit khác nhau có thể cho một số phản ứng màu đặc trưng, có thể dùng để nhận biết hoặc phân biệt các loại đường khác nhau (giữa pentozơ và hexozơ, giữa anđozơ và xetozơ).

Tùy theo số cacbon trong phân tử, người ta phân monosacarit thành các nhóm nhỏ: triozơ, tetrozơ, pentozơ, hexozơ, heptozơ, octozơ, nanozơ. Trong các nhóm này phổ biến nhất là pentozơ và hexozơ.

Polisacarit là do các monosacarit kết hợp với nhau tạo thành. Mức độ phức tạp của polisacarit là tùy thuộc vào số lượng và cách kết hợp giữa các monosacarit. Người ta dựa vào đặc điểm này để phân loại polisacarit. Các oligosacarit quan trọng và phổ biến nhất là sacarozơ, mantozơ, lactozơ. Các polisacarit bậc cao thường gặp là tinh bột, glicogen, xenlulozơ...

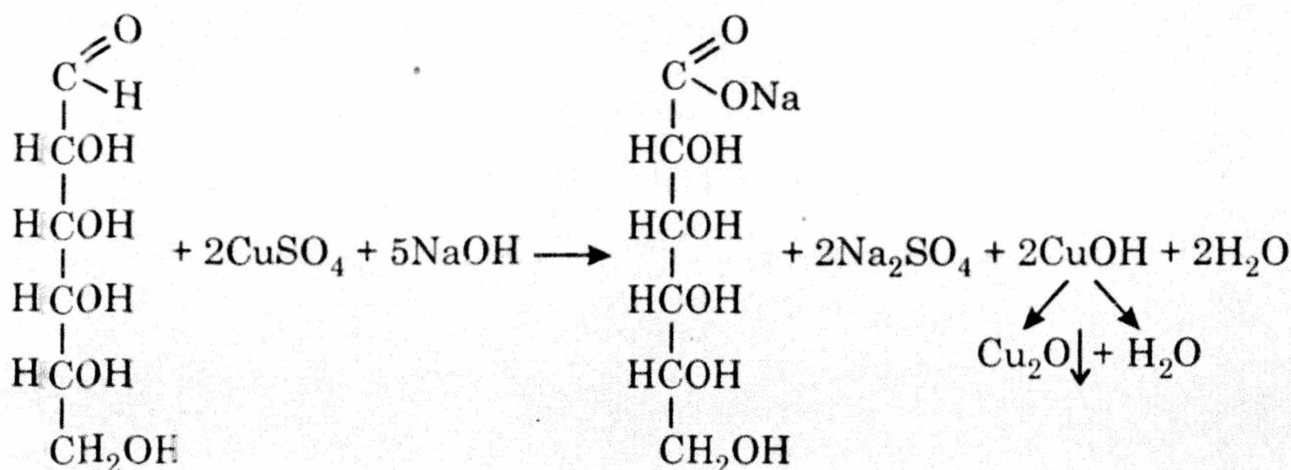
Dưới đây sẽ giới thiệu một số phản ứng định tính và định lượng quan trọng của sacarit.

3.1 Các phản ứng định tính

3.1.1 Các phản ứng của mono - và disacarit

a) Phản ứng Tromer

Dưới tác dụng của các mono - và một số disacarit trong môi trường kiềm Cu^{2+} bị khử thành Cu^+ , đồng thời nhóm chức anđehit hoặc xeton của đường bị oxi hoá thành các muối tương ứng. Phản ứng xảy ra như sau:



Hóc chất: Glucozơ 5%, NaOH 10%, CuSO_4 5%.

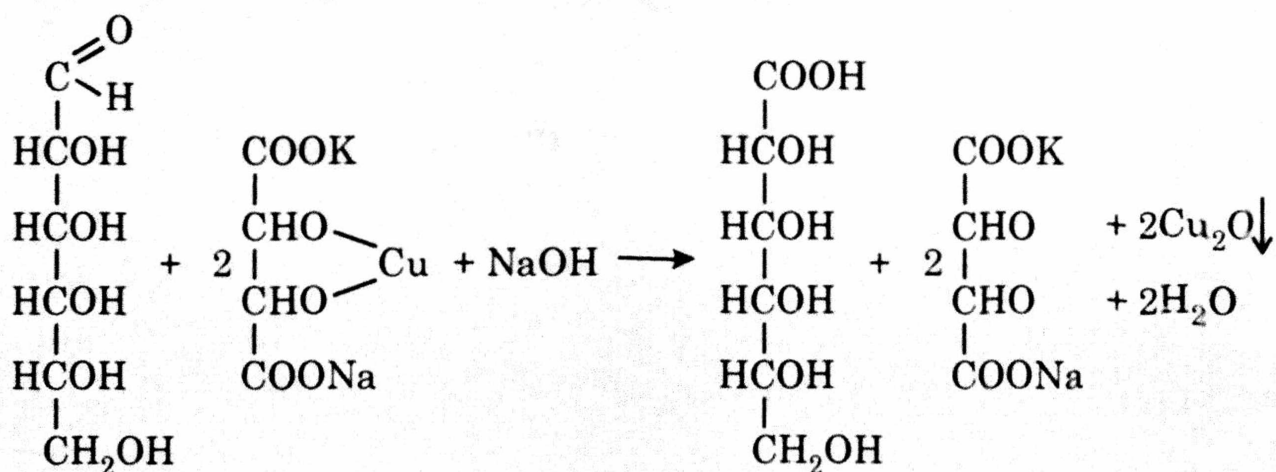
Cách làm: Cho vào ống nghiệm 2ml dung dịch glucozơ 5%, 2ml dung dịch NaOH 10%, sau đó thêm từng giọt dung dịch

CuSO₄ 5% vào đến khi xuất hiện kết tủa xanh của Cu(OH)₂. Đun đến sôi, quan sát, giải thích.

Chú ý không cho thừa CuSO₄ vì khi đun sẽ tạo ra kết tủa đồng (II) oxit (CuO) có màu đen làm mất màu của phản ứng.

b) Phản ứng với thuốc thử Fehling

Phản ứng với thuốc thử Fehling là phản ứng Tromer cải tiến: Cu²⁺ ở dạng kết hợp với muối kali natri tacrat sẽ bị các mono- và disacarit có tính khử khử thành Cu⁺ theo cách tương tự như phản ứng Tromer:



So với phản ứng Tromer, phản ứng Fehling có ưu thế hơn ở chỗ nếu có cho thừa thuốc thử cũng không tạo thành CuO.

Hóa chất: - Glucozơ 1%, mantozơ 1%, sacarozơ 1%.

- Chuẩn bị thuốc thử Fehling gồm hai thành phần:

+ Dung dịch Fehling A: hòa tan 40g CuSO₄.5H₂O trong 1 lít nước cất. Nếu dung dịch đục thì lọc.

+ Dung dịch Fehling B: hòa tan 20g kali natri tacrat (C₄H₄O₆NaK. 4H₂O) và 150g NaOH trong 1 lít nước cất.

Thuốc thử Fehling (chỉ pha ngay trước khi dùng): trộn lẫn 1 thể tích dung dịch Fehling A với 1 thể tích dung dịch Fehling B, lắc đều, nhận được dung dịch trong, màu xanh biếc.

Cách làm: Lấy 3 ống nghiệm, cho vào ống I: 1ml dung dịch glucozơ 1%; ống II: 1ml mantozơ 1%; ống III: 1ml sacarozơ 1%. Thêm vào mỗi ống 1ml thuốc thử Fehling. Lắc đều và đun cả 3 ống đến khi bắt đầu sôi. Quan sát, so sánh kết quả trong các ống giải thích.

Có thể dùng phản ứng này để tìm thấy đường trong lát cắt của mô, cách làm như sau: đặt lát cắt trên lam kính, nhỏ vài giọt thuốc thử Fehling, đặt lam kính lại, hơi nhẹ trên đèn cồn một lúc đến khi nước ở trong bắt đầu sôi. Quan sát dưới kính hiển vi. Nếu có đường sẽ thấy những chấm nâu nhỏ của Cu_2O trong lát cắt.

c) **Phản ứng Benedict**

Phản ứng này rất đặc trưng và nhạy đối với đường khử hơn phản ứng với thuốc thử Fehling. Trong thuốc thử Benedict dùng Na_2CO_3 thay cho NaOH, natri xitrat thay cho muối segnet của thuốc thử Fehling. Vì vậy trong phản ứng không tạo thành đồng hydroxit mà tạo thành đồng cacbonat. Độ nhạy của phản ứng rất cao, chỉ cần dùng dung dịch đường 0,1% cũng đã có thể làm thay đổi màu dung dịch phản ứng (từ xanh da trời đến xanh lục). Màu xanh lục là do màu của Cu_2O hòa lẫn với màu xanh của thuốc thử.

Hóa chất:

- Glucozơ 0,1%.
- Chuẩn bị thuốc thử Benedict: hòa tan 173g natri xitrat trong 700ml nước sôi, thêm 100g Na_2CO_3 khan, làm lạnh, thêm từ từ 100ml dung dịch $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 17,3%, thêm nước đến 1000ml.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 5ml thuốc thử Benedict và 8 giọt dung dịch glucozơ 0,1%. Đặt ống nghiệm vào nồi cách

thủy đang sôi trong 5 phút. Dung dịch chuyển thành màu xanh lục, hoặc có kết tủa đỏ tùy theo lượng glucozơ trong dung dịch.

d) Phản ứng với đồng axetat $[(CH_3COO)_2Cu]$ (Phản ứng Barfed)

Phản ứng này khác với các phản ứng trên ở chỗ không tiến hành trong môi trường kiềm mà trong môi trường gần trung tính, trong điều kiện này các disacarit không bị oxi hóa. Vì vậy đây là phản ứng để phân biệt disacarit và monosacarit có tính khử.

Hóa chất:

- Glucozơ 5%, mantozơ 5%.
- Chuẩn bị thuốc thử đồng axetat: Hòa tan 13,3g đồng axetat trong 200ml nước cất nóng, lọc, thêm vào dung dịch lọc 19ml axit axetic băng (đậm đặc).

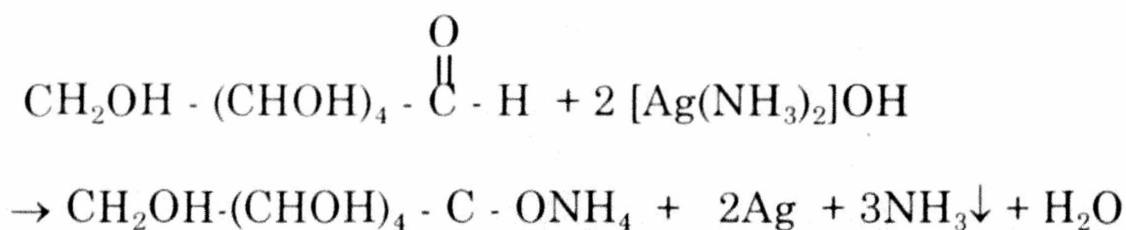
Cách làm: Lấy 2 ống nghiệm, cho vào ống I: 1ml dung dịch glucozơ 5%; ống II: 1ml mantozơ 5%. Thêm vào mỗi ống 1ml thuốc thử đồng axetat, sau đó để cả hai ống vào nồi cách thủy đang sôi trong 10 phút. Quan sát, so sánh và giải thích các kết quả nhận được. Viết phương trình phản ứng.

Chú ý không đun quá lâu, khi đó disacarit sẽ bị thủy phân thành monosacarit và sẽ cho phản ứng dương tính.

e) Phản ứng tráng gương (tạo thành bạc kim loại)

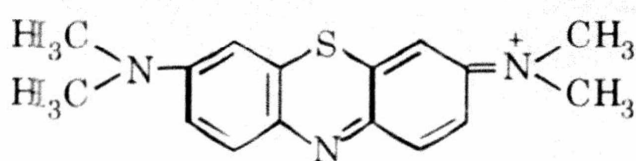
Các mono - và disacarit khử bạc ở dạng muối thành bạc kim loại ($Ag^+ \rightarrow Ag$).

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch $AgNO_3$ 5%. Thêm từng giọt amoniac, tạo thành kết tủa. Sau đó thêm amoniac đến vừa tan, cho tiếp vào 3ml dung dịch glucozơ 5% và đun. Quan sát. Phản ứng xảy ra như sau:

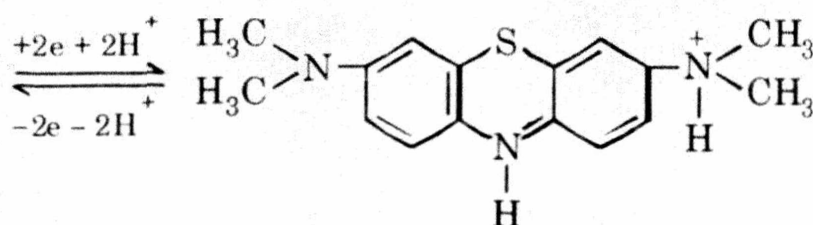


Phản ứng khử xanh metylen

Dưới tác dụng của glucozơ, xanh metylen bị khử thành chất không màu.



Xanh metylen
(Dạng oxi hóa, màu xanh)



Lợcơ metylen
(Dạng khử, không màu)

Hóa chất: Xanh metylen 1%, NaOH 5%, glucozơ 1%.

Cách làm: Lấy hai ống nghiệm:

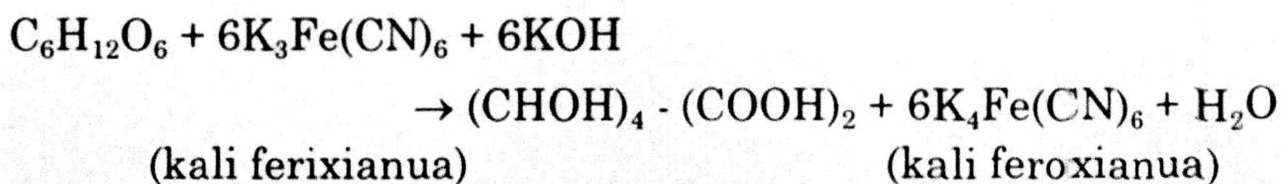
Ống I: cho 2ml nước, thêm 1 giọt xanh metylen 1% và 4 giọt NaOH 5%. Đun sôi - quan sát.

Ống II: Làm như trên nhưng thay nước cất bằng dung dịch glucozơ 1%. Quan sát.

Làm lạnh cả hai ống trong vài phút. Quan sát và giải thích.

g) Phản ứng khử kali ferixianua

Trong môi trường kiềm, glucozơ khử kali ferixianua thành kali feroxianua:



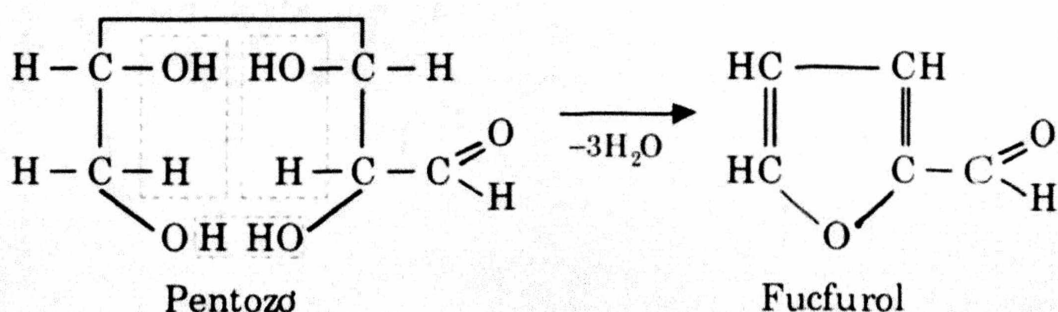
Phản ứng này có thể dùng để định lượng đường khử.

Hóa chất: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1%, KOH 5%, glucozơ 1%, xanh metylen 1%.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 5ml dung dịch $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1%, 2ml KOH 5%, 1ml glucozơ 1%. Đun, quan sát. Thêm 1 giọt xanh metylen, quan sát.

h) Sự tạo thành các hợp chất vòng và một số phản ứng màu đặc trưng của chúng

Dưới tác dụng của axit vô cơ đặc và nhiệt độ cao, các monosacarit có số cacbon trong phân tử lớn hơn 4 sẽ bị mất nước tạo thành hợp chất vòng: từ pentozơ tạo thành fucfurool, từ hexozơ tạo thành oximetylfucfurool:



Fucfurool và oximetylfucfurool đều có thể phản ứng với các hợp chất fenol như α -naftol, timol, antron để tạo thành các hợp chất màu đặc trưng. Ngoài ra, giữa chúng cũng khác nhau về khả năng phản ứng với một số chất. Do đó có thể dùng các phản ứng ấy để phân biệt andozơ và xetozơ, pentozơ và hexozơ.

1. Phản ứng Xêlivanôp (phản ứng của xetozơ với rezoxin)

Khi đun dung dịch fructozơ (hoặc một xetohexozơ khác) với HCl (có trong thuốc thử) sẽ tạo thành oximetylfucfurool, hợp chất này trong phản ứng với rezoxin sẽ tạo thành hợp chất có màu đỏ thẫm.

Trong điều kiện của thí nghiệm, andozơ cũng cho phản ứng nhưng rất chậm, ngược lại xetozơ cho phản ứng ngay sau 30 giây, nhanh gấp nhiều lần so với andozơ. Vì vậy phản ứng Xêlivanôp được coi là phản ứng đặc trưng của xetozơ và được dùng làm cơ sở cho phương pháp định lượng fructozơ. Có thể xác định cường độ màu của sản phẩm phản ứng trên máy so màu quang điện với kính lọc ở bước sóng 490nm.

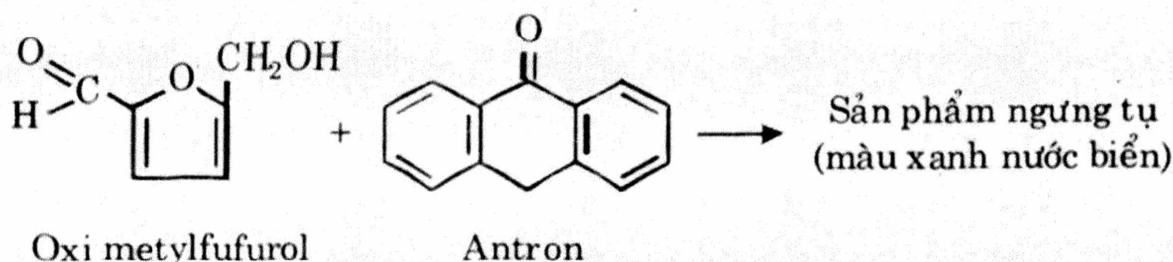
Hóa chất:

- Dung dịch fructozơ 0,5%, glucozơ 0,5%.
- Chuẩn bị thuốc thử Xêlivanôp: hòa tan 0,05g rezoxin trong 100ml dung dịch HCl 6 N.

Cách làm: Lấy hai ống nghiệm, cho vào mỗi ống 1ml thuốc thử Xêlivanôp. Thêm vào ống I: 1- 2 giọt dung dịch fructozơ 0,5%, lắc đều, đặt vào nồi cách thủy đang sôi, sau 30 giây lấy ra quan sát sự xuất hiện màu trong ống. Thêm vào ống II: 1- 2 giọt dung dịch glucozơ 0,5% và làm tiếp như ống I, theo dõi thời gian xuất hiện màu trong ống. Giải thích kết quả nhận được.

2. Phản ứng với antron

Khi kết hợp với antron, các hợp chất vòng được tạo thành từ hexozơ (dưới tác dụng của H_2SO_4 có trong thuốc thử) sẽ cho sản phẩm ngưng tụ có màu xanh nước biển đặc trưng:



Phản ứng với antron được dùng làm cơ sở cho một phương pháp định lượng glicogen rất thông dụng, trong đó glicogen được xác định một cách trực tiếp mà không cần phải qua thủy phân nên tiết kiệm được nhiều thời gian. Cường độ màu của sản phẩm phản ứng có thể xác định được trên máy so màu quang điện với kính lọc màu đỏ ($\lambda = 620\text{nm}$).

Hóa chất:

- Glucozơ 1%.

- Chuẩn bị thuốc thử antron: Hòa tan 1g thioure và 50mg antron (đã được kết tinh lại) trong 100ml H_2SO_4 66% trên nồi cách thủy 80- 90°C, lấy ra để nguội, cho vào lọ nâu và bảo quản trong tủ lạnh. Thời hạn sử dụng: 2- 3 tuần.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 0,5ml glucozơ, thêm 5ml thuốc thử antron, lắc đều, để ở nhiệt độ phòng trong 10- 15 phút, sau đó để trong nồi cách thủy đang sôi trong 15 phút (chú ý không để nước bắn vào sẽ làm đục dung dịch). Để nguội. Quan sát màu được tạo thành (có thể để thêm 30 phút ở chỗ tối cho cường độ màu đạt tới cực đại), giải thích.

3. Phản ứng Bial

Khi có muối sắt, fucfurol được tạo thành từ pentozơ (trong môi trường axit của thuốc thử) sẽ phản ứng với oxin tạo thành hợp chất màu xanh lục:

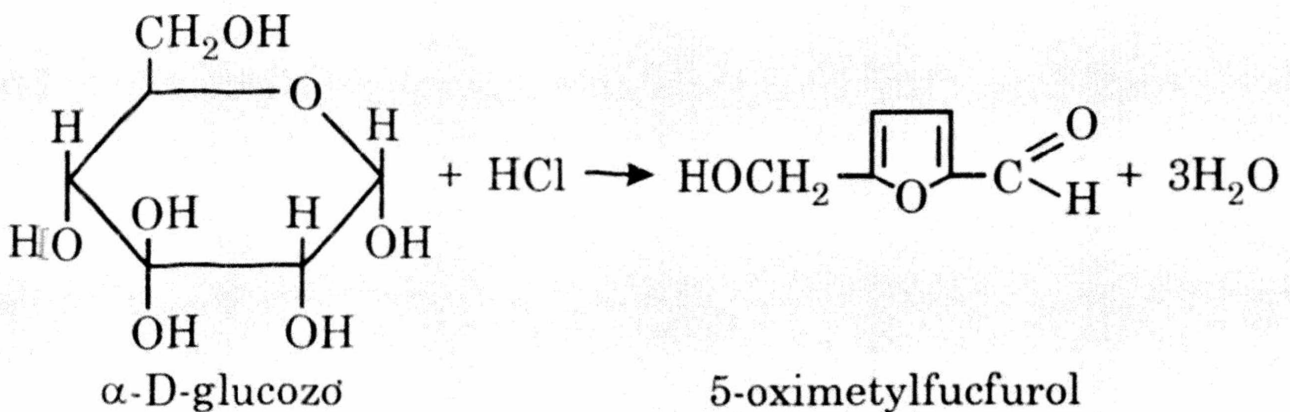
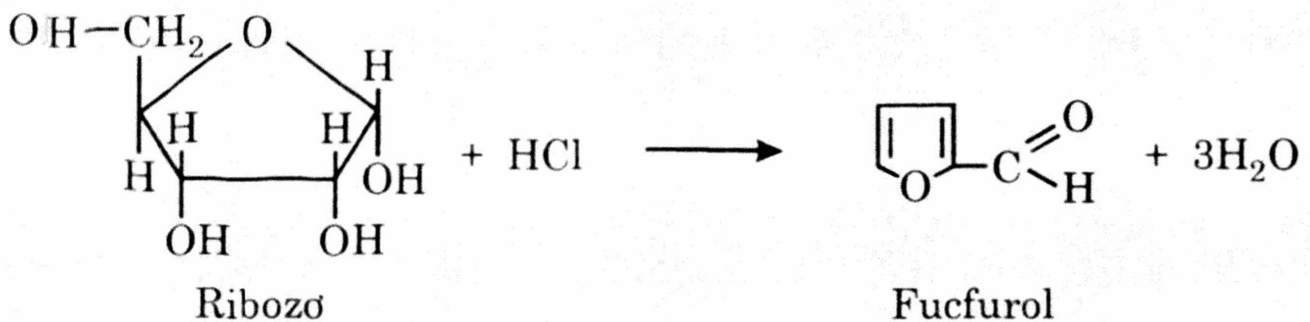
Phản ứng với oxin là phản ứng đặc trưng của pentozơ, và là cơ sở cho phương pháp định lượng pentozơ theo Meibaum. Cường độ màu của sản phẩm phản ứng có thể xác định được trên máy so màu quang điện với kính lọc ở bước sóng 660nm.

Hóa chất: Dung dịch pentozơ 1- 2%. Chuẩn bị thuốc thử oxin: hòa tan 0,2g oxin trong 100ml HCl 30%, thêm 0,1g FeCl_3 . Giữ thuốc thử trong lọ nâu đậy kín.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1-2ml thuốc thử oxin, đun đến sôi. Thêm vào thuốc thử đang nóng 4-5 giọt dung dịch pentozơ 1- 2%, để ống nghiệm trong nồi cách thủy đang sôi khoảng 20 phút. Quan sát sự chuyển màu của hỗn hợp phản ứng.

4. Phản ứng với α -naphtol

Fucfurol hoặc oximetylfucfurol khi kết hợp với α -naphtol sẽ tạo thành các hợp chất ngưng kết quinoit có màu tím đỏ đặc trưng. Phản ứng có độ nhạy cao nên được sử dụng để phát hiện các pentozơ và hexozơ trong thành phần các hợp chất hữu cơ (như axit nucleic).



Hóa chất: Glucozơ 1%, fructozơ 1%, α -naphtol 10% pha trong etanol 96%, H_2SO_4 đặc.

Cách làm: Lấy hai ống nghiệm, cho vào ống I: 1ml glucozơ 1%, ống II: 1ml fructozơ 1%. Thêm vào mỗi ống hai giọt

α -naphthol. Nhỏ theo thành từng ống nghiệm 1ml H_2SO_4 đặc. Quan sát sự xuất hiện vòng của sản phẩm màu ở mặt phân cách hai lớp chất lỏng, giải thích kết quả.

5. Phản ứng với ure

Hóa chất: Fructozơ 1%, glucozơ 1%, ure tinh thể, HCl đặc.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 0,5-1g ure tinh thể, thêm 5-6 giọt HCl đặc và 2-5 giọt fructozơ, lắc cẩn thận đến khi hòa tan ure. Đặt ống nghiệm vào nồi cách thủy đang sôi. Sau 10 - 15 phút xuất hiện vòng màu xanh.

Làm lại thí nghiệm với glucozơ 1%, sản phẩm có màu đỏ.

Trong cùng điều kiện thí nghiệm, ribozơ và các andopentozơ khác cho màu vàng.

k) Phản ứng của sacarozơ với muối coban

Trong môi trường kiềm, sacarozơ tạo thành hợp chất màu tím với muối coban.

Hóa chất: Dung dịch sacarozơ 1-2%, dung dịch coban nitrat hoặc sunfat 2%, KOH hoặc NaOH 5%.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 2ml dung dịch sacarozơ, 1ml dung dịch kiềm và vài giọt dung dịch muối coban, dung dịch chuyển sang màu tím.

3.1.2 Phản ứng định tính polisacarit

a) Phản ứng màu của tinh bột với iôt

Phản ứng đặc trưng nhất của tinh bột là tạo thành phức màu xanh với iôt. Màu xanh này là do thành phần amiloz của tinh bột quyết định. Màu có thể bị mất khi đun nóng và được hồi phục trở lại sau khi làm lạnh. Tuy nhiên, nếu đun mạnh đến

khi dung dịch trắng hoàn toàn thì sẽ không hồi phục được màu xanh dù có làm lạnh dung dịch.

Phản ứng màu của tinh bột với iôt có độ nhạy cao, vì vậy thường được sử dụng trong phương pháp chuẩn độ iôt (làm chất chỉ thị). Ngoài ra người ta cũng thường dùng phản ứng này để quan sát các hạt tinh bột trong mô thực vật.

Nguyên liệu và hóa chất:

- Dung dịch tinh bột 0,5%: hòa tan 0,5g tinh bột trong một ít nước cất, thêm nước cất đang sôi vào, khuấy đều, tiếp tục đun đến sôi, để nguội, thêm nước cất đến 100ml.

- Thuốc thử Liugôn: hòa tan 2,5g KI trong 20ml nước cất, thêm 1g iôt, lắc cho tan hết, thêm nước cất đến 100ml.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 2-3ml dung dịch tinh bột, thêm vài giọt thuốc thử Liugôn, quan sát màu. Đun nóng ống nghiệm đến khi dung dịch vừa mất màu. Làm lạnh dung dịch, quan sát. Lại đun ống nghiệm, lần này kỹ hơn đến khi dung dịch mất màu hoàn toàn. Làm lạnh, quan sát, giải thích.

Ghi chú: Phản ứng màu của tinh bột với iôt không xảy ra trong môi trường kiềm.

b) Kiểm tra tính khử của dung dịch tinh bột

Dung dịch tinh bột tinh khiết không có tính khử, nhưng sau khi bị thủy phân (dưới tác dụng của axit hoặc amilaz) tạo thành các sản phẩm có tính khử.

Nguyên liệu và hóa chất:

- Dung dịch tinh bột 1% (chuẩn bị theo phương pháp ở mục 3.1.2.a).

- HCl đặc, các hóa chất dùng cho phản ứng Tromer (xem mục 3.1.1.a)

Cách làm: Chuẩn bị hai ống nghiệm, cho vào mỗi ống 4-5ml dung dịch tinh bột. Thêm vào ống I: 3 giọt dung dịch HCl đặc; ống II: 3 giọt nước cất. Đặt cả hai ống khoảng 10 -15 phút trong nồi cách thủy đang sôi. Sau đó lấy cả hai ống ra, làm lạnh, trung hòa, thử phản ứng Trome. Trong ống I sẽ xuất hiện kết tủa nâu đỏ của Cu_2O , ống II cho phản ứng âm (nếu dung dịch tinh bột thật tinh khiết).

c) **Sự thủy phân tinh bột**

Dưới tác dụng của axit hoặc amilaz, tinh bột bị thủy phân tạo thành các sản phẩm trung gian gọi là dextrin và cuối cùng tạo thành mantozơ hoặc glucozơ. Có thể phân biệt các loại dextrin dựa vào sự khác nhau giữa chúng về khối lượng phân tử, khả năng khử và phản ứng màu với iôt. Amilodextrin cho màu tím, eritrodextrin cho màu đỏ nâu, acrodextrin và maltodextrin không cho phản ứng màu với iôt. Vì vậy có thể dựa vào phản ứng màu với iôt hoặc khả năng khử của sản phẩm được tạo thành để phán đoán mức độ thủy phân của tinh bột.

Nguyên liệu và hóa chất:

- Dung dịch tinh bột 1%.
- HCl đặc (12N) hoặc H_2SO_4 đặc (20N), dung dịch iôt 0,001N.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm hoặc bình nón ($V=50\text{ml}$) 15ml dung dịch hồ tinh bột, 3ml dung dịch HCl đặc (hoặc một lượng H_2SO_4 thích hợp sao cho nồng độ cuối cùng của axit trong hỗn hợp là 2N). Đặt vào nồi cách thủy đang sôi. Chuẩn bị 2 dãy ống nghiệm, cứ sau 10 phút cho vào mỗi cặp ống (1 ống của dãy I và 1 ống của dãy II) vài giọt dung dịch tinh bột đang thủy phân, sau đó thêm vào mỗi ống của dãy I: 1ml dung dịch iôt loãng (0,001N), quan sát màu. Dãy ống nghiệm II được trung hòa bằng kiềm và làm phản ứng Benedict hoặc phản ứng Trome - so sánh sự khác nhau giữa các ống.

d) Phản ứng màu của glicogen với iôt

Glicogen có cấu tạo gần giống amilopectin của tinh bột với các gốc α - D - glucozơ kết hợp với nhau bằng liên kết 1,4 và liên kết 1,6 (ở chỗ phân nhánh). Glicogen tạo thành dung dịch keo trong nước nóng, khi tác dụng với iôt cho màu đỏ nâu. Phản ứng màu này được sử dụng để phát hiện glicogen trong gan, cơ...

Nguyên liệu và hóa chất: Gan ếch (để tách glicogen), KOH 30%, ete etylic, etanol, thuốc thử Liugôn.

Dụng cụ và thiết bị: Cối, chày sứ, cốc (V=100ml), đĩa đồng hồ, máy ly tâm, nồi cách thủy (100°C).

Cách làm:

- Chuẩn bị glicogen: Cân 5g gan ếch (lấy ngay sau khi giết ếch), nghiền nhỏ trong cối sứ rồi chuyển vào ống ly tâm hoặc cốc. Thêm vào đó 10 thể tích dung dịch KOH 30% trong etanol đã đun nóng, khuấy đều, giữ 15 phút trong nồi cách thủy đang sôi. Sau đó để nguội và ly tâm 10-15 phút với vận tốc 3000 vòng/phút. Gạn lấy nước trong trên kết tủa, thêm từng giọt etanol 96% để kết tủa glicogen. Kết tủa thu được sau ly tâm được rửa bằng cồn 50%, 75%, 96% và cuối cùng bằng ete etylic. Kết tủa glicogen được cho vào đĩa đồng hồ và hong khô trong không khí.

- Phản ứng màu: Cho vào ống nghiệm một ít glicogen, 1ml nước cất nóng, lắc cho tan, để nguội, thêm 2 giọt thuốc thử Liugôn. Quan sát sự xuất hiện màu, giải thích.

3.2 Định lượng sacarit

Các dạng đường (mono-, oligo- và polisacarit) có thể định lượng được bằng nhiều phương pháp hóa học khác nhau: dùng phản ứng màu (như với antron hay phenol để xác định glicogen, hoặc xác định pentozơ bằng phản ứng màu với oxin...), dùng

phản ứng khử của đường hay sản phẩm sau khi thủy phân bằng enzym hoặc axit đối với oligo- và polisacarit. Các phương pháp thông dụng hơn cả sử dụng phản ứng khử của đường, trong đó phản ứng khử muối Cu^{2+} là phổ biến nhất.

3.2.1 Định lượng đường khử theo phương pháp Bertrand

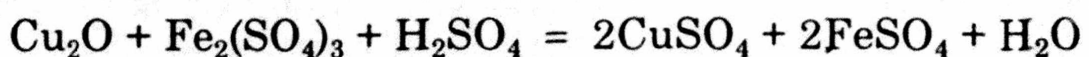
Tất cả các đường có nhóm andehit hay nhóm xeton tự do trong những điều kiện nhất định có khả năng tham gia vào phản ứng oxi hoá- khử với ion kim loại được gọi là đường khử.

Phương pháp Bertrand dựa vào khả năng khử dung dịch Cu^{2+} trong môi trường kiềm để định lượng các loại andozơ, xetozơ hay các disacarit có tính khử (như mantozơ, lactozơ).

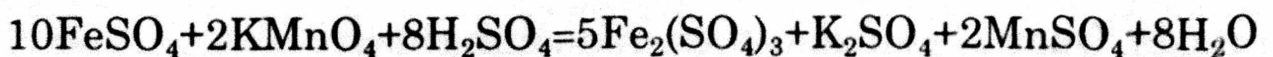
Quá trình định lượng đường khử được tiến hành lần lượt theo các bước:

- Đun dung dịch kiềm của Cu^{2+} (dung dịch Fehling) với dung dịch đường để tạo kết tủa Cu_2O (phản ứng với thuốc thử Fehling, mục 3.1.1).

- Sau khi rửa sạch, kết tủa Cu_2O được hòa tan bằng dung dịch sắt (III) sunfat, axit khi đó Cu^+ chuyển thành Cu^{2+} và Fe^{3+} chuyển thành Fe^{2+} :



- Chuẩn độ Fe^{2+} bằng dung dịch KMnO_4 0,1N:



Biết lượng KMnO_4 đã dùng để chuẩn độ, tính ra lượng đồng theo tỷ lệ: cứ 1ml KMnO_4 0,1 N tương ứng với 6,36mg Cu. Từ lượng đồng ấy đối chiếu với bảng sẽ biết được lượng đường tương ứng. Đối với mỗi loại đường có một bảng riêng. Bảng được thành lập trên cơ sở thực nghiệm, trong đó ghi rõ sự tương ứng giữa lượng đồng và lượng đường.

Nguyên liệu và hóa chất:

- Dung dịch mẫu (chứa đường khử cần xác định hàm lượng).

- Thuốc thử Fehling (chuẩn bị theo phương pháp ở mục 3.1.1.b), dung dịch $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ trong H_2SO_4 , dung dịch KMnO_4 0,1N.

Dụng cụ và thiết bị: Bình nón ($V=100\text{ml}$), buret, phễu lọc Buchner, bình Buchner, bơm hút chân không, bếp điện, lưới amiăng.

Cách làm:

- Cho vào bình nón 20ml dung dịch đường, thêm 20ml hỗn hợp Fehling. Đậy bình bằng nút thủy tinh và đun trên bếp có lưới amiăng. Đun sôi đúng 3 phút kể từ khi bắt đầu xuất hiện bọt đầu tiên. Kết tủa đỏ gạch của Cu_2O xuất hiện trong bình. Lấy bình ra để nguội.

- Rửa kết tủa Cu_2O vài lần bằng nước ấm đã đun sôi (mục đích loại O_2) cho đến khi dung dịch rửa không còn phản ứng kiểm trên giấy quỳ. Quá trình rửa kết tủa được tiến hành trên phễu lọc Buchner (được gắn liền với bình Buchner và bơm hút chân không) với giấy lọc dày; chú ý giữ kết tủa lại trong bình và trên lớp oxit (ở giấy lọc cũng như trong bình) phải luôn luôn có lớp nước để Cu_2O không bị oxi hóa bởi oxi không khí.

Để hòa tan kết tủa Cu_2O , đặt phễu lọc Buchner lên bình nón có chứa kết tủa. Đổ vào phễu 15ml dung dịch sắt (III) sunfat axit $[\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3]$ để cho chảy từ từ xuống bình, lắc. Quan sát xem kết tủa ở trong phễu và trong bình đã hòa tan hết chưa, nếu chưa thì cần phải thêm sắt sunfat. Sau khi đã hòa tan hết kết tủa, rửa phễu bằng nước nóng cho đến khi nước rửa không cho phản ứng axit trên giấy quỳ.

- Chuẩn độ dung dịch trong bình (Fe^{2+}) bằng dung dịch KMnO_4 0,1N cho đến khi xuất hiện màu hồng bền trong 30 giây.

Tính kết quả: Từ lượng KMnO_4 đã dùng để chuẩn độ tính ra lượng đồng. Từ lượng đồng tra bảng tìm lượng đường tương ứng.

Từ kết quả trên tính phần trăm đường trong dung dịch:

$$X(\text{mg}\%) = \frac{a.100}{20}$$

a - Số mg đường nhận được từ bảng (xem phần phụ lục).

3.2.2 Định lượng tinh bột

Để định lượng tinh bột có thể dùng nhiều phương pháp khác nhau. Phương pháp đơn giản và phổ biến nhất là dùng axit để thủy phân hoàn toàn tinh bột thành glucozơ. Dùng một trong các phương pháp định lượng đường khử để xác định lượng glucozơ tạo thành, từ đó suy ra lượng tinh bột bằng cách nhân với hệ số 0,9.

Nguyên liệu và hóa chất: Bột gạo hoặc khoai lang tươi, HCl 20 - 25%, NaOH 10%, hóa chất để định lượng đường khử theo phương pháp Bertrand.

Dụng cụ và thiết bị: Cối, chày sứ, bình nón hoặc bình cầu cổ ngắn ($V=250\text{ml}$) có lắp ống sinh hàn, phễu lọc, bình định mức ($V=250\text{ml}$), các dụng cụ và thiết bị để định lượng đường khử theo phương pháp Bertrand (xem mục 3.3.1).

Cách làm: Cân 1g bột gạo (hoặc 2g khoai lang tươi đã nghiền nhỏ), cho vào cối, thêm 100ml nước cất, khuấy liên tục trong khoảng 45-60 phút. Lọc qua giấy lọc, tráng cối cẩn thận để chuyển toàn bộ nguyên liệu vào phễu, rửa nguyên liệu trong phễu nhiều lần (8-10 lần) bằng nước cất, mỗi lần 20-30ml để loại

hoàn toàn đường khử (kiểm tra nước rửa bằng phản ứng Tromer hoặc phản ứng với thuốc thử Fehling).

Đặt phễu cùng với giấy lọc có chứa nguyên liệu trên bình nón hoặc bình cầu ($V=250\text{ml}$). Dùng đũa thủy tinh nhỏ chọc thủng giấy lọc, rửa toàn bộ nguyên liệu trên giấy lọc vào bình bằng nước cất (khoảng 80ml). Thêm vừa đủ một lượng HCl 20% vào bình để nồng độ axit cuối cùng trong dung dịch là 2%. Lắp ống sinh hàn, đặt bình vào nồi cách thủy sôi đun trong 3 giờ, thỉnh thoảng lắc. Sau khi thủy phân xong, lấy bình ra để nguội, trung hòa dung dịch thủy phân bằng NaOH 10% (thử bằng giấy quỳ để đạt môi trường axit yếu). Chuyển toàn bộ dung dịch sang bình định mức, dẫn nước cất đến vạch mức của bình (250ml). Khuấy đều, lọc, được dung dịch lọc trong suốt. Lấy 20ml để xác định đường khử theo phương pháp Bertrand.

Tính kết quả:

Lượng bột trong nguyên liệu được tính theo công thức:

$$X(\text{mg}) = \frac{a.0,9.V_1}{V_2}$$

a - Lượng glucozơ (mg) có trong V_2 ml dịch thủy phân.

V_1 - Tổng thể tích nguyên liệu sau khi thủy phân và trung hòa (250ml).

V_2 - Số ml dung dịch thủy phân đem định lượng đường khử (20ml).

Chương 4

Axit nucleic

Axit nucleic là thuật ngữ chung cho cả axit dezoxiribonucleic (ADN) và axit ribonucleic (ARN). Chúng là một trong những nhóm hợp chất chính, rất quan trọng của mọi tế bào và cơ thể sống. Cả ADN và ARN đều được tạo thành từ các mononucleotit thông qua liên kết 3',5'- photphodiester. Mỗi mononucleotit gồm bazơ nitơ hoặc là thuộc nhóm purin như adenin, guanin hoặc là thuộc nhóm pirimidin như timin, xitozin, uraxin liên kết với gốc đường 5 các bon (5C) và axit photphoric. Sự khác nhau căn bản giữa ADN và ARN là ở gốc đường 5C; trong trường hợp ADN đường 5C là dezoxiribozơ, còn trong ARN là đường ribozơ. Ngoài ra, các gốc timin trong ADN được thay bằng gốc uraxin trong ARN. Đây là những cơ sở để nhận biết cũng như định lượng các loại axit nucleic này.

4.1 Các tính chất lí - hoá của axit nucleic

4.1.1 Tính tan của axit nucleic

Axit nucleic hòa tan tốt trong môi trường kiềm, ít tan trong nước và không tan trong dung dịch axit axetic loãng. Trong

nước axit nucleic tạo thành dung dịch keo, do đó dễ dàng bị kết tủa dưới tác dụng của các chất lấy nước.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch ARN 0,1% từ nấm men, dung dịch ADN 0,1% tách từ gan động vật (có thể dùng chế phẩm ARN và ADN thương mại), HCl 0,1 N, axit axetic 0,1 N, NaOH 0,1N, etanol 96%, izopropanol)

Cách làm:

- Lấy 2 ống nghiệm, cho vào ống nghiệm I: 0,5ml dung dịch ADN 0,1%, ống II: 0,5ml ARN 0,1%, thêm vào mỗi ống 0,5ml HCl 0,1N, kết tủa trắng của axit nucleic được tạo thành. Thêm từng giọt dung dịch NaOH 0,1N, kết tủa lại hòa tan.

Có thể làm lại thí nghiệm này, thay HCl bằng dung dịch axit axetic 0,1N cũng nhận được kết quả tương tự như trên.

- Lấy 2 ống nghiệm, cho vào ống nghiệm I: 1ml dung dịch ADN 0,1%, ống II: 1ml ARN 0,1%, thêm vào mỗi ống 2 thể tích etanol 96% lạnh (2ml) hay 0,6 thể tích izopropanol (0,6ml), kết tủa trắng của axit nucleic xuất hiện.

4.1.2 Các phản ứng màu của axit nucleic

a) Sự tạo màu với xanh metylen

Trong môi trường axit, axit nucleic kết hợp với xanh metylen tạo kết tủa màu xanh.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch axit nucleic 0,1%, axit axetic 0,1N, dung dịch xanh metylen 0,1%

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch axit nucleic 0,1%, thêm từng giọt axit axetic 0,1N vào đến khi dung dịch hơi vẩn đục. Cho khoảng 5-6 giọt dung dịch xanh metylen 0,1% tạo thành kết tủa màu xanh da trời.

b) Phản ứng phân biệt ADN và ARN

Các phản ứng này chủ yếu dựa vào sự sai khác về thành phần đường giữa ARN chứa đường ribozơ và ADN chứa đường dezoxiribozơ. Hai loại đường này khác nhau về khả năng phản ứng với một số chất như oxin, diphenylamin, thuốc thử Schiff... Sự sai khác chủ yếu là ở độ nhạy của phản ứng. Vì vậy tiêu chuẩn để xác định phản ứng là dương tính hay âm tính chủ yếu là dựa vào thời gian xảy ra phản ứng.

Nguyên liệu và hóa chất:

- Dung dịch ARN năm men 0,1%, dung dịch ADN gan động vật 0,1%, HCl 1N,

NaOH 0,1N.

- Thuốc thử oxin (xem mục 3.1.1.h)

- Chuẩn bị thuốc thử diphenylamin: hòa tan 1g diphenylamin trong 100ml axit axetic đặc, thêm 2,75ml H_2SO_4 đặc.

- Chuẩn bị thuốc thử Schiff: hòa tan 0,2g fucsin trong 120ml nước cất nóng. Làm lạnh, thêm từ từ dung dịch $NaHSO_3$ đến khi dung dịch có màu.

Thiết bị: Nồi cách thủy ($100^\circ C$).

Cách làm:

- Phản ứng với thuốc thử oxin:

Chuẩn bị 2 ống nghiệm, cho vào ống I: 1ml dung dịch ARN 0,1%, ống II: 1ml dung dịch ADN 0,1%. Thêm vào mỗi ống 1ml thuốc thử oxin, lắc, giữ 15 phút trong nồi cách thủy đang sôi. Ống I có màu xanh lục, ống thứ II cho màu rất nhạt.

- Phản ứng với diphenylamin.

Chuẩn bị hai ống nghiệm, cho vào ống I: 1ml dung dịch ARN 0,1%, ống II: 1ml dung dịch ADN 0,1%, thêm vào mỗi ống 2ml thuốc thử diphenylamin, lắc đều, giữ cả hai ống nghiệm 10 phút trong nồi cách thủy đang sôi. Ống có chứa ADN chuyển sang màu xanh, ống chứa ARN cho phản ứng âm.

- Phản ứng Feulgen với deoxiribozơ.

Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch ADN 0,1%, thêm 5-6 giọt HCl giữ 5 phút trong nồi cách thủy đang sôi, làm lạnh, dùng dung dịch NaOH 0,1N để điều chỉnh pH đến 5. Thêm 2ml thuốc thử Schiff, xuất hiện màu đỏ chứng tỏ có deoxiribozơ. ARN không cho phản ứng này.

c) Thủy phân và nhận biết các thành phần cấu tạo của axit nucleic

Dưới tác dụng của axit vô cơ ở nhiệt độ cao, ARN bị thủy phân tạo thành các bazơ purin tự do và các nucleotit pirimidin. Có thể nhận biết các thành phần đường pentozơ, axit photphoric và bazơ nitơ bằng các phản ứng đặc trưng.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch ARN 0,1%, H_2SO_4 10% hoặc HCl 1N, HNO_3 đặc, HCl đặc, dung dịch amoni molipdat 5%, $AgNO_3$ trong NH_4OH , NaOH 1 N, dung dịch đồng sunfat 1%, $NaHSO_3$ bão hòa, floroglucin tinh thể.

Thiết bị: Nồi cách thủy (100°C).

Cách làm: Thủy phân ARN: cho 10ml dung dịch ARN 0,1% vào bình nón dung tích 50ml, thêm 10ml H_2SO_4 10% đặt vào nồi cách thủy đang sôi trong 45 phút, làm lạnh đến nhiệt độ phòng. Dung dịch thủy phân nhận được dùng để làm các phản ứng tiếp theo.

- *Phản ứng nhận biết pentozơ:* cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch thủy phân của ARN, thêm 1ml HCl đặc và một vài

tinh thể floroglucin. Đun sôi dung dịch, xuất hiện màu đỏ chứng tỏ có pentozơ.

- *Phản ứng nhận biết H_3PO_4* : lấy 0,5ml dung dịch thủy phân của ARN, trung hòa bằng amoniac. Thêm 0,5ml HNO_3 đặc và 2ml dung dịch amoni molipđat. Đun sôi, tạo thành kết tủa vàng của amoni photphomolipđat.

- *Phản ứng nhận biết các bazơ purin*: Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch thủy phân của ARN, thêm dung dịch amoniac đến khi có phản ứng kiềm yếu. Lọc để nhận được dung dịch trong, thêm 3ml dung dịch bạc nitrat trong amoniac. Xuất hiện kết tủa purin không tan trong dung dịch amoniac của muối bạc.

Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch thủy phân của ARN, thêm NaOH 1N cho đến phản ứng axit yếu trên giấy congo. Đun sôi, thêm 4-6 giọt dung dịch $CuSO_4$ 1% và thêm cẩn thận từng giọt dung dịch $NaHSO_3$ bão hòa. $NaHSO_3$ khử ion Cu^{2+} thành Cu^+ . Ion Cu^+ tạo thành muối đồng với bazơ purin không hòa tan.

4.2 Định lượng axit nucleic

4.2.1 Định lượng ADN

a) *Định lượng ADN bằng cách đo độ hấp thụ ánh sáng ở bước sóng 260 nm*

Nguyên tắc: Trong thành phần ADN chứa các bazơ nitơ có khả năng hấp thụ ánh sáng vùng tử ngoại, cực đại là ở $\lambda = 260nm$, độ hấp thụ tỷ lệ với nồng độ ADN.

Nguyên liệu: Dung dịch nghiên cứu (dung dịch ADN).

Cách làm: cho 1ml ADN vào cuvet thạch anh và đo độ hấp thụ ánh sáng ở 260nm. Đối chứng là dung dịch dùng pha ADN (nếu số đọc về độ hấp thụ ánh sáng của ống có ADN lớn hơn 1,0

thì cần pha loãng dung dịch ADN). Từ số đọc thu được tính ra lượng ADN trong mẫu theo công thức sau:

$$C (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \cdot 50 \cdot n$$

trong đó:

C - nồng độ của ADN

$A_{260\text{nm}}$ là độ hấp thụ của dung dịch ADN ở 260 nm

50 - hệ số chuyển đổi đối với ADN

n- số lần pha loãng

Phương pháp này đơn giản, nhanh, nhưng có hạn chế là số đọc về độ hấp thụ có thể bị ảnh hưởng khi trong mẫu chứa ARN và protein. Vì vậy, trên thực tế phương pháp này thường được dùng để định lượng các mẫu ADN tinh khiết.

b) Định lượng ADN theo phương pháp Disce

Nguyên tắc: Khi đun nóng dung dịch ADN với thuốc thử diphenylamin tạo thành phức chất màu xanh da trời có độ hấp thụ ánh sáng cực đại ở $\lambda = 595\text{nm}$.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch ADN cần xác định hàm lượng, dung dịch ADN tinh khiết có hàm lượng 500 $\mu\text{g/ml}$, HClO_4 0,5N, TCA 5%, H_2SO_4 5%, thuốc thử diphenylamin.

Thiết bị: Nồi cách thủy (100°C), máy so màu quang điện.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 2ml dung dịch ADN, 10ml HClO_4 0,5 N (hoặc TCA 5%), lắc đều, đậy kín ống nghiệm và đặt vào nồi cách thủy đang sôi trong 30 phút để thủy phân ADN. Sau đó làm nguội dung dịch.

Hút 2ml dung dịch ADN đã được thủy phân cho vào ống nghiệm, bổ sung 4ml thuốc thử diphenylamin, đặt vào nồi cách thủy đang sôi trong 20 phút sẽ thu được dung dịch màu xanh da trời, để nguội và đo độ hấp thụ ánh sáng trên máy so màu với

kính lọc sáng màu đỏ ($\lambda = 595\text{nm}$). Từ số đọc về mật độ quang học thu được, dựa vào đồ thị chuẩn ADN tính ra lượng ADN trong mẫu.

Xây dựng đồ thị chuẩn ADN: Từ dung dịch gốc ADN tinh khiết có nồng độ xác định tiến hành pha loãng để có các nồng độ 50, 100, 200, 300, 400 và $500\mu\text{g/ml}$. Sau đó lấy từ mỗi nồng độ ra 2ml và tiến hành thí nghiệm như với dung dịch ADN mẫu ở trên. Dựng đồ thị tương quan giữa mật độ quang học và nồng độ ADN tương ứng.

Từ số đọc mật độ quang học thu được của dung dịch mẫu đối chiếu với đồ thị chuẩn ADN tính ra lượng ADN trong mẫu.

4.2.2 Định lượng ARN

a) *Định lượng ARN bằng cách đo độ hấp thụ ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 260nm*

Nguyên tắc: Tương tự như phương pháp định lượng ADN.

Nguyên liệu: Dung dịch nghiên cứu (dung dịch ARN).

Cách làm: hút 1ml ARN vào cuvet thạch anh và đo độ hấp thụ ở $\lambda = 260\text{nm}$. Đối chứng là dung dịch dùng pha ARN (nếu số đọc về độ hấp thụ ánh sáng của ống có ARN lớn hơn 1,0 thì cần pha loãng dung dịch ARN ra)

Nồng độ ARN trong mẫu được tính theo công thức sau:

$$C (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \cdot 40 \cdot n$$

trong đó:

C - nồng độ của ARN

$A_{260\text{nm}}$ là độ hấp thụ của dung dịch ARN ở 260nm

40 - là hệ số chuyển đổi đối với ARN

n. số lần pha loãng

Phương pháp này có những ưu và nhược điểm giống như đối với phương pháp định lượng ADN đã nêu ở mục 4.2.1.a.

b) Định lượng ARN theo phương pháp Meibaum

Nguyên tắc: Khi đun dung dịch ARN với thuốc thử oxin sẽ tạo thành phức chất có màu xanh lá cây, có khả năng hấp thụ ánh sáng cực đại ở $\lambda = 670\text{nm}$. Cường độ màu tỷ lệ với hàm lượng ARN trong dung dịch.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch ARN cần xác định hàm lượng, dung dịch ARN tinh khiết có hàm lượng $500\mu\text{g/ml}$. Thuốc thử oxin (xem mục 3.1.1.h), H_2SO_4 10%, FeCl_3 0,1% trong HCl (đặc):

Thiết bị: Nồi cách thủy (100°C), máy so màu quang điện.

Cách làm: Cho 2ml dung dịch ARN vào bình nón ($V = 50\text{ml}$) có nút nhám, thêm vào đó 10ml H_2SO_4 10%, đậy nút và đặt vào nồi cách thủy đang sôi trong 30 phút, lấy ra làm nguội, thu được dung dịch thủy phân ARN.

Từ dung dịch thủy phân ARN lấy ra 2ml cho vào ống nghiệm, thêm vào đó 2ml thuốc thử oxin, lắc đều và đặt vào nồi cách thủy đang sôi trong 20 phút được dung dịch có màu xanh lá cây, làm nguội đến nhiệt độ phòng và đo độ hấp thụ ánh sáng ở $\lambda = 670\text{nm}$ (dùng kính lọc sáng màu đỏ).

Xây dựng đồ thị chuẩn ARN từ các dung dịch ARN tinh khiết có nồng độ xác định theo cách tương tự như cách xây dựng đồ thị chuẩn ADN nêu ở trên. Từ số đọc về mật độ quang học thu được của dung dịch mẫu đối chiếu với đồ thị chuẩn tính ra lượng ARN trong mẫu.

Chương 5

Lipit

Lipit là những hợp chất hữu cơ có trong tế bào sống không hòa tan trong nước, tan trong các dung môi không phân cực như: clorofom, ete, benzen... Do đó có thể dùng các dung môi này để chiết rút chúng ra khỏi tế bào.

Lipit được phân thành 2 nhóm lớn: lipit đơn giản và lipit phức tạp (lipoit). Đại diện quan trọng của lipit đơn giản là mỡ trung tính (triaxylglyxerol). Lipoit quan trọng và phổ biến là lợxitin. Tiếp theo sẽ giới thiệu một số phản ứng định tính và định lượng của các đại diện quan trọng này.

5.1 Mỡ trung tính (triaxylglyxerol)

Mỡ trung tính là este của glixerin và axit béo bậc cao. Tùy theo thành phần axit béo trong phân tử mà mỡ trung tính có thể ở trạng thái lỏng hoặc rắn ở nhiệt độ bình thường.

5.1.1 Tính chất lý hoá của mỡ

a) *Tính tan*

Hóa chất: dầu lạc, etanol, ete etylic, clorofom, benzen.

Cách làm: Chuẩn bị 5 ống nghiệm sạch, khô, cho vào ống I: 2ml nước cất, ống II, III, IV, V, mỗi ống 2ml dung môi tương ứng ete, etanol, clorofom, benzen. Thêm vào mỗi ống vài giọt dầu lạc, lắc, quan sát sự sai khác độ hòa tan của dầu lạc trong các dung môi khác nhau.

b) Sự tạo thành nhũ tương

Mỡ không hòa tan trong nước, vì vậy sau khi lắc mạnh mỡ với nước rồi để yên hỗn hợp một lúc, mỡ lại tạo thành một lớp nổi trên bề mặt, tuy nhiên nếu có chất tạo nhũ tương (axit mật, dung dịch xà phòng...) sẽ tạo thành nhũ tương mỡ trắng đục.

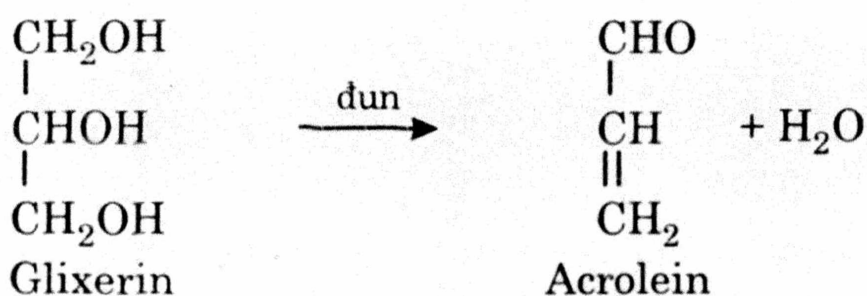
Hóa chất: Dầu lạc, dung dịch xà phòng 2% hoặc mật động vật.

Cách làm: Lấy 2 ống nghiệm, cho vào mỗi ống 4ml nước cất, thêm vài giọt dầu, sau đó cho vào một trong 2 ống 0,5ml dung dịch xà phòng 2% hoặc dung dịch mật, lắc mạnh cả 2 ống. Quan sát và giải thích kết quả.

5.1.2 Phản ứng phân biệt các thành phần cấu tạo của mỡ

a) Phản ứng tạo thành acrolein

Phản ứng này dùng để chứng minh có gốc glixerin trong mỡ. Khi đun nóng với chất lấy nước, gốc này chuyển thành glixerin tự do. Sau đó glixerin bị mất nước và tạo thành andehit không no là acrolein, chất này có mùi khét đặc biệt, dễ nhận biết.



Phản ứng này xảy ra khi đun mỡ với kali bisunfat (KHSO_4) hay natri bisunfat (NaHSO_4) có tác dụng lấy nước.

Những lipit không chứa glixerin (ví dụ như sáp) thì không có phản ứng tạo thành acrolein.

Hóa chất: Dầu lạc, KHSO_4 (kali bisunfat), dung dịch AgNO_3 trong amoniac.

Cách làm: Đổ vào ống nghiệm 2-3 giọt dầu lạc, thêm một ít (khoảng 200mg) KHSO_4 , lắc đều và đun nóng mạnh đến khi có khói trắng và khét: acrolein đã được tạo thành.

Lấy giấy lọc tẩm dung dịch AgNO_3 trong amoniac, hơ vào miệng ống nghiệm, hoặc có thể đưa giấy vào sâu trong ống chỗ có khói bay ra, giấy có màu đen (phản ứng của andehit).

Làm lại thí nghiệm với một mẫu sáp.

b) Phản ứng xà phòng hóa

Dưới tác dụng của kiềm, mỡ bị thủy phân, tạo thành xà phòng và glixerin.

- Sự tạo thành xà phòng tan

Hóa chất: Dầu lạc, dung dịch KOH 0,5M trong etanol 50%.

Cách làm: Cho 0,5ml dầu lạc vào bình nón dung tích 50ml, sau đó cho thêm 10ml dung dịch KOH trong etanol 50%, khuấy và đun cách thủy khoảng 1 giờ, nếu chưa cạn lấy ra đun sôi đến khi cạn khô. Lấy sản phẩm ra, để nguội và thêm 20-30ml nước cất vào, lắc đều. Ta có dung dịch xà phòng, bọt sẽ tạo thành nhiều khi lắc mạnh.

- Sự tạo thành xà phòng không tan

Xà phòng không tan là muối canxi hoặc magie của axit béo, loại xà phòng này không tan trong nước.

Hóa chất: CaCl₂ 1%, dung dịch xà phòng 2%.

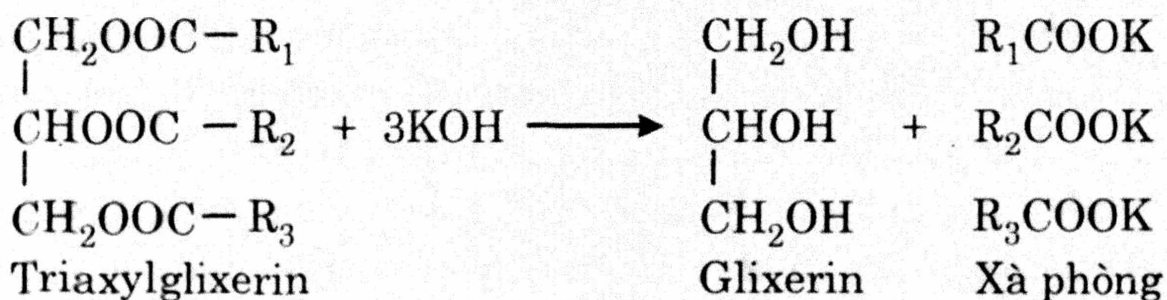
Cách làm: Cho 2-3ml dung dịch xà phòng vào ống nghiệm, thêm 1ml dung dịch CaCl₂ 1% sẽ tạo thành kết tủa không tan trong nước.

c) Sự tạo thành axit béo tự do

Trong thí nghiệm trên (5.1.2.b) đã nêu quá trình điều chế xà phòng từ dầu hoặc mỡ. Xà phòng là muối của axit béo. Dưới tác dụng của axit vô cơ đặc, axit béo được giải phóng, không hòa tan trong nước và có thể dễ dàng tách ra được.

Hóa chất: Dung dịch xà phòng 2%, H₂SO₄ đặc, ete etylic, NaOH 0,01%.

Cách làm: Cho vào bình nón 50ml dung dịch xà phòng 2%, thêm vài giọt H₂SO₄ đặc cho đến khi môi trường có pH axit (dùng giấy quỳ để thử pH). Dung dịch trở nên đục do axit béo được giải phóng. Đun hỗn hợp đến sôi, axit béo nổi lên, tạo thành một lớp trên bề mặt. Tách riêng axit béo, hòa tan trong 5ml ete, lấy 1ml dung dịch này cho vào ống nghiệm, thêm 1 giọt phenolphthalein và vài giọt NaOH 0,01% cho đến khi có màu hồng, thêm vài giọt dung dịch axit béo đã hòa tan trong ete, dung dịch mất màu.



5.1.3 Xác định các chỉ số của mỡ

a) *Xác định chỉ số axit*

Chỉ số axit của mỡ là số mg KOH cần thiết để trung hòa lượng axit béo tự do có trong 1 gam mỡ.

Hóa chất: Dầu lạc, etanol 96%, KOH 0,1N

Cách làm: Cân 1 gam dầu lạc vào bình nón dung tích 50 - 100ml, thêm 10ml etanol 96% để hòa tan axit béo tự do. Nếu dầu khó tan thì lắc cẩn thận hỗn hợp trong bình và đun nhẹ trong nồi cách thủy, vừa đun vừa lắc. Sau khi mỡ đã hòa tan, thêm vào bình vài giọt phenolphthalein 0,1% và chuẩn độ bằng dung dịch KOH 0,1N đến khi có màu hồng nhạt.

Chỉ số axit được tính theo công thức sau:

$$X = A.f.5,6$$

trong đó:

A - Số ml dung dịch KOH đã dùng để chuẩn độ

f - Hệ số điều chỉnh của dung dịch KOH.

b) *Xác định chỉ số xà phòng hóa*

Chỉ số xà phòng hóa là số mg KOH cần thiết để trung hòa các axit béo tự do và axit béo liên kết chứa trong 1 gam mỡ.

Hóa chất: Dầu lạc, KOH 0,5N pha trong etanol 96%, HCl 0,5N, dung dịch phenolphthalein 0,1%.

Cách làm: Lấy 2 bình cầu đáy tròn hoặc bình nón, dung tích 50 - 100ml cho vào bình I (bình thí nghiệm) 0,5 gam dầu lạc, vào bình II (bình kiểm tra) 0,5ml nước cất. Sau đó thêm vào mỗi bình đúng 15ml dung dịch KOH pha trong etanol 96%. Lắp ống làm lạnh vào cả 2 bình và đun sôi trên nồi cách thủy khoảng 1 giờ. Phản ứng xà phòng hóa được xem như kết thúc khi dung dịch trong bình trở nên trong suốt.

Khi đã xà phòng hóa xong, làm nguội dung dịch, thêm vào bình vài giọt phenol-phtalein và chuẩn độ bằng dung dịch HCl 0,5N . 1ml dung dịch KOH 0,5N tương ứng với 28mg KOH. Lượng KOH (tính bằng mg) đã dùng để trung hòa tất cả các axit béo trong 1 gam dầu lạc là:

$$X(\text{mg}) = \frac{(A - B) \cdot 28}{a}$$

trong đó:

- A - Lượng HCl 0,5N dùng để chuẩn độ bình kiểm tra;
- B - Lượng HCl 0,5N dùng để chuẩn độ bình thí nghiệm;
- a - Khối lượng dầu lạc tính bằng gam.

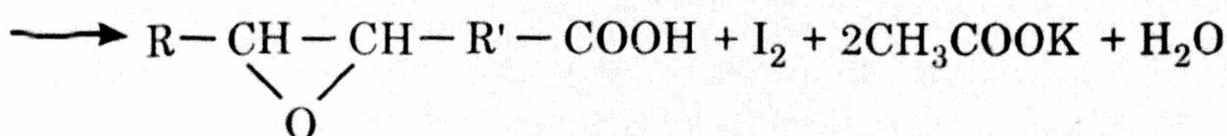
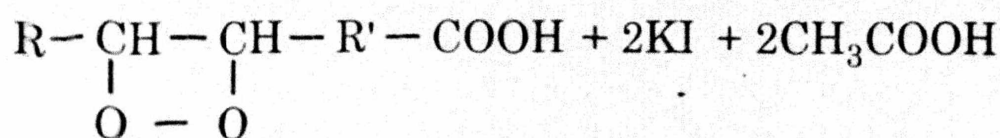
Trên cơ sở xác định chỉ số xà phòng hóa và chỉ số axit có thể tính được chỉ số este của mỡ. Chỉ số este là số mg KOH cần thiết để trung hòa axit béo liên kết với glixerin. Do đó, chỉ số este bằng hiệu số giữa chỉ số xà phòng hòa và chỉ số axit của mỡ.

Dựa trên các số liệu thu được từ các phép xác định trên cũng có thể tính được hàm lượng glixerin, nếu biết rằng để giải phóng một phân tử glixerin từ triaxylglixerin cần 3 phân tử KOH.

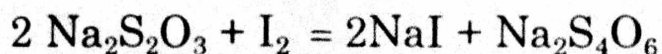
c) *Xác định chỉ số peroxit*

Khi có oxi không khí các axit béo có trong thành phần của mỡ, nhất là các axit béo không no dễ dàng bị oxi hóa một phần và tạo thành peroxit. Hiện tượng này xảy ra khi mỡ bị ôi hay bị khô.

Việc xác định chỉ số peroxit có thể dựa vào phản ứng sau:



Lượng iôt giải phóng ra có thể chuẩn độ được bằng dung dịch natri hiposunfit:



Theo lượng hiposunfit cần để liên kết iôt giải phóng ra, có thể tính được chỉ số peroxit. Chỉ số peroxit là số gam iôt được giải phóng ra bởi peroxit có trong 100 gam mỡ.

Hóa chất: Dầu thực vật, axit axetic đặc, clorofom tinh khiết, dung dịch KI bão hòa (pha dùng ngay), dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,002N, dung dịch tinh bột 0,5%.

Cách làm: Chuẩn bị 2 bình nón dung tích 250ml, cho vào bình I (bình thí nghiệm) 2 gam dầu lạc, vào bình II (bình kiểm tra) 2ml nước cất. Thêm vào mỗi bình 20ml hỗn hợp axit axetic đặc: clorofom (tỷ lệ 2:1 về thể tích), 5ml dung dịch KI bão hòa, lắc đều, đậy nút và đặt vào chỗ tối 10 phút. Sau đó thêm 30ml nước cất, vài giọt dung dịch tinh bột 5%, chuẩn độ iôt giải phóng ra bằng dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,002N đến khi mất màu xanh.

Chỉ số peroxit được tính theo công thức:

$$X = \frac{(A - B) \cdot k \cdot 0,0002538 \cdot 100}{a}$$

trong đó:

A - Số ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ đã dùng để chuẩn độ bình thí nghiệm;

B - Số ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ đã dùng để chuẩn độ bình kiểm tra;

k - Hệ số hiệu chỉnh của dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

0,0002538 - Số gam iôt tương ứng với 1ml dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,002 N;

a - Số gam dầu lấy để xác định.

d) **Xác định chỉ số iôt**

Các axit béo không no trong lipid có thể được halogen hóa. Chỉ số iôt là số gam iôt liên kết được với 100 gam mỡ.

Hóa chất: Etanol tuyệt đối hoặc 96%, dung dịch iôt 0,1N; dung dịch tinh bột 1%. Dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N, dầu lạc hoặc dầu vừng.

Cách làm: Lấy hai bình nón, cho vào bình I (bình thí nghiệm) 0,2g dầu lạc, bình II (bình kiểm tra) 0,2ml nước cất. Thêm vào mỗi bình 5ml etanol hoặc clorofom, sau đó thêm chính xác 5ml dung dịch iôt 0,1N. Đậy kín bình, để vào chỗ tối 15 phút. Khi thời gian hết chuẩn độ cả hai bình bằng $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N đến khi còn màu vàng nhạt thì thêm vào hỗn hợp 1ml dung dịch tinh bột và chuẩn độ tiếp đến khi mất màu xanh. Chỉ số iôt được tính theo công thức:

$$C = \frac{(A - B).f.0,01269.100}{a}$$

trong đó:

B - Số ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N đã dùng để chuẩn độ bình kiểm tra.

A - Số ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N đã dùng để chuẩn độ bình thí nghiệm.

f - Hệ số điều chỉnh của dung dịch $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (nếu có)

0,01269 - Số gam iôt tương ứng 1ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1N

a - Lượng dầu đã lấy để xác định (tính bằng gam).

5.2 Lipit

Đại diện của nhóm lipit phức tạp được xem xét trong các thí nghiệm này là lợxitin, một photphatit, có công thức hóa học dưới đây. Lợxitin có mặt rất phổ biến trong các tế bào sống, đặc biệt là trong lòng đỏ trứng, trong hồng cầu, tinh trùng...

b) Kết tủa loxitin bằng axeton

Cho từ từ 1ml dung dịch loxitin trong etanol vào ống nghiệm có chứa 5ml axeton, xuất hiện kết tủa trắng của loxitin. Ứng dụng phản ứng này để nhận loxitin ở dạng bột khô.

c) Kết tủa bằng $CdCl_2$

Cho vào ống nghiệm khô 1ml dung dịch loxitin trong etanol, thêm từng giọt dung dịch $CdCl_2$, tạo thành kết tủa trắng của phức chất loxitin với $CdCl_2$. Colesterol và dầu thực vật không cho phản ứng này.

5.3 Định lượng Lipit

Việc định lượng lipit thường dựa trên cơ sở xác định khối lượng nguyên liệu trước và sau khi chiết rút lipit khỏi nguyên liệu bằng dung môi hữu cơ. Bằng phương pháp trên, ngoài lipit ra, có thể có một số hợp chất khác như vitamin tan trong chất béo cũng được chiết ra cùng với lipit. Tuy nhiên hàm lượng các tạp chất này trong nhiều trường hợp là không đáng kể, nên đối với các thí nghiệm thông thường, phương pháp nói trên vẫn được chấp nhận.

Dung môi thường dùng để chiết rút lipit là: ete etylic, benzen, hỗn hợp metanol - clorofom hoặc hỗn hợp etanol - ete.

Có thể chiết rút lipit bằng cách ngâm nguyên liệu vào dung môi trong một tuần ở chỗ tối hoặc dùng máy Soklet. Dưới đây sẽ giới thiệu phương pháp dùng máy Soklet.

Nguyên liệu, hóa chất: Hạt lạc hoặc hạt thầu dầu đã sấy khô, ete etylic, benzen hoặc hỗn hợp metanol - clorofom.

Máy Soklet: Máy Soklet gồm ba bộ phận chính nối với nhau bằng khớp nhánh (bảo đảm kín hoàn toàn) là: bình cầu (bình đun), bình chiết và ống sinh hàn

Cách làm: Chuẩn bị túi bằng giấy lọc để đựng nguyên liệu: Giấy lọc được cắt thành mảnh hình chữ nhật, chiều dài gấp 2,5 lần chiều rộng, chuẩn bị thành túi hình trụ có đường kính nhỏ hơn đường kính bình chiết, đáy túi được khâu kín; cũng có thể chuẩn bị túi dưới dạng túi gói thuốc. Các túi giấy gói sau đó được sấy khô đến khi có khối lượng không đổi và khối lượng túi được cân chính xác trên cân phân tích.

Cân chính xác (trên cân phân tích) 5 gam nguyên liệu đã được sấy khô, nghiền nhỏ trong cối sứ, sau đó chuyển toàn bộ vào túi giấy đã được chuẩn bị như trên, khâu kín hoặc gấp kín phía trên của túi. Cho dung môi vào bình cầu đến $1/3 - 1/2$ thể tích của bình. Đặt gói nguyên liệu vào bình chiết của máy, lắp bình chiết vào bình cầu. Cho dung môi vào bình chiết sao cho ngập gói nguyên liệu, mức dung môi gần đạt đến phần trên ống hút (xifon) của bình chiết. Lắp ống làm lạnh. Ngâm nguyên liệu trong dung môi như vậy trong vài giờ. Sau đó đặt máy vào nồi cách thủy để đun nóng dung môi (với ete etylic khoảng $35 - 40^{\circ}\text{C}$). Đồng thời cho nước lạnh chảy quay hệ thống làm lạnh của máy để làm ngưng tụ hơi dung môi. Tiếp tục đun khoảng 5-6 giờ. Khi đun, dung môi bay hơi theo xifon đi lên và được ngưng tụ lại rơi vào bình chiết, đến khi dung môi đạt đến mức cao ngang đầu ra của xifon (nhánh đưa xuống) thì dung môi lập tức đổ hết xuống bình cầu. Bằng cách như vậy nguyên liệu được chiết rút liên tục bằng dung môi (8 - 10 lần trong 1 giờ). Thời gian cần thiết để chiết rút hoàn toàn lipit được xác định bằng thực nghiệm. Sau khi chiết rút xong, lấy gói nguyên liệu ra khỏi máy, cho bay hết dung môi, sấy khô cho đến khi khối lượng không đổi.

Tính lượng mỡ trong 100 gam nguyên liệu theo công thức:

$$X(g) = \frac{(A - B) \cdot 100}{C}$$

trong đó:

- A - Khối lượng gói nguyên liệu trước khi chiết rút lipit (g);
- B - Khối lượng gói nguyên liệu sau khi đã chiết rút lipit (g);
- C - Lượng nguyên liệu lấy để xác định (g).

Chương 6

Vitamin

Vitamin hay còn gọi là sinh tố bao gồm các hợp chất hữu cơ phân tử thấp, có bản chất hóa học rất khác nhau, có hoạt tính sinh lý, cần đưa vào cơ thể người và động vật với một lượng nhỏ để đảm bảo hoạt động sống bình thường.

Dựa vào tính tan của chúng các vitamin được chia thành hai nhóm lớn, đó là: Các vitamin hòa tan trong chất béo và các dung môi hữu cơ bao gồm vitamin A, D, E, K và các axit béo không no có một hay nhiều nối đôi, Các vitamin hòa tan trong nước bao gồm các vitamin thuộc các nhóm B, C, H...

Vì có bản chất hóa học khác nhau nên mỗi loại vitamin có những phản ứng hóa học đặc trưng riêng. Những phản ứng này được sử dụng để định tính và định lượng các vitamin.

6.1 Các phản ứng định tính của vitamin

6.1.1 Các vitamin hòa tan trong chất béo

a) Vitamin A (Retinol)

- *Phản ứng với sắt (II) sunfat ($FeSO_4$)*

Trong môi trường axit, vitamin A phản ứng với FeSO_4 tạo thành hợp chất màu xanh, chuyển dần sang màu hồng đỏ. Chất tiền vitamin A (carotin) cũng cho phản ứng này nhưng sản phẩm có màu xanh lục.

Nguyên liệu và hóa chất: Dầu cá (chứa vitamin A và D), axit axetic đặc được bão hòa bằng FeSO_4 , H_2SO_4 đặc.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm vài giọt dầu cá, thêm 5-10 giọt axit axetic đậm đặc có chứa FeSO_4 bão hòa và 1-2 giọt H_2SO_4 đặc, quan sát màu.

- Phản ứng với H_2SO_4

H_2SO_4 đặc tác dụng với vitamin A và tạo thành sản phẩm màu xanh tím không bền, sau một thời gian ngắn sẽ chuyển thành màu nâu đỏ.

Nguyên liệu và hóa chất: Dầu cá, H_2SO_4 đặc, clorofom hoặc benzen.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm khô hai giọt dầu cá, 2ml benzen hoặc clorofom, lắc cho tan. Thêm hai giọt H_2SO_4 đặc, lắc, quan sát.

b) Vitamin D (Canxipherol)

- Phản ứng với SbCl_3

Nguyên liệu và hóa chất: Dầu cá 10% trong clorofom, dung dịch SbCl_3 21- 23% trong clorofom, anhidrit axetic $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm sạch và khô 3 - 5ml dung dịch dầu cá, thêm vào 8 - 10 giọt anhidrit axetic, lắc đều và thêm vài giọt SbCl_3 . Lắc đều và quan sát sự xuất hiện màu vàng hoặc vàng da cam.

- Phản ứng với anilin

Vitamin D trong môi trường axit sẽ tác dụng với anilin tạo thành hợp chất có màu đỏ đặc trưng.

Nguyên liệu và hóa chất: dầu cá, clorofom, anilin.

Chuẩn bị thuốc thử anilin: Trộn anilin với HCl đặc hoặc H_2SO_4 đặc theo tỷ lệ 15 : 1.

Cách làm: Cho 4 giọt dầu cá vào ống nghiệm sạch, khô, cho thêm 1ml clorofom và vài giọt anilin, lắc đều, quan sát sự tạo thành các thể nhũ trong ống nghiệm. Đun sôi hỗn hợp phản ứng trong 30 giây, dung dịch sẽ chuyển thành màu đặc trưng.

c) Vitamin E (Tocopherol)

- Phản ứng với HNO_3

Vitamin E tác dụng với HNO_3 đặc tạo thành o-tocopheril-quinon màu đỏ hoặc màu vàng đỏ.

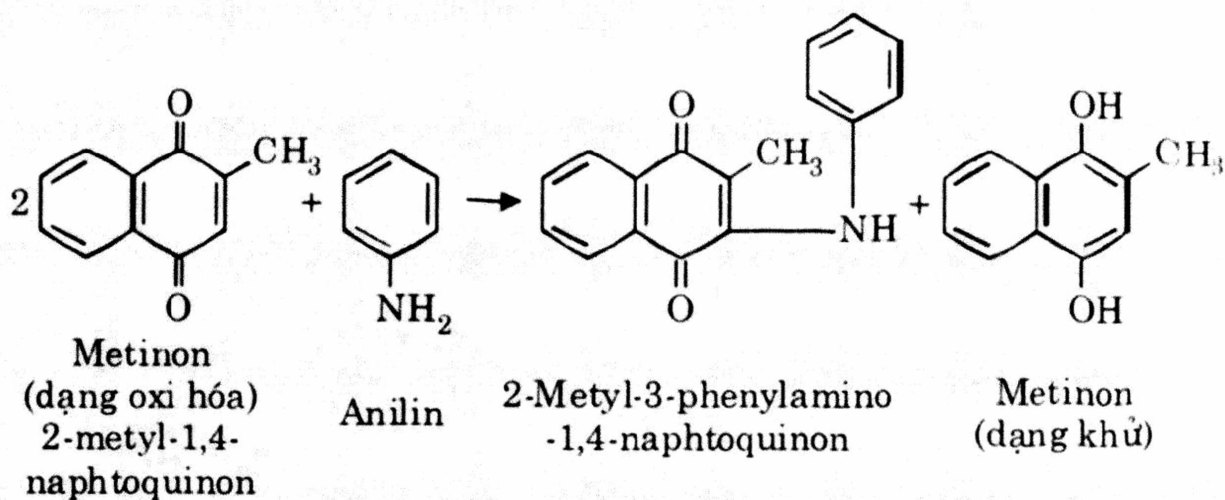
Hóa chất: Vitamin E 0,15% trong etanol tuyệt đối hay trong butanol, HNO_3 đặc.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm vài giọt dung dịch vitamin E, sau đó thêm từ từ 8-10 giọt HNO_3 đặc và lắc nhẹ ống nghiệm. Sau 1-2 phút quan sát sự đổi màu.

- Phản ứng với $FeCl_3$

Vitamin E có thể khử $FeCl_3$ thành $FeCl_2$, sau đó ion Fe^{2+} phản ứng với o-phenantrolin để tạo thành ion $Fe(C_{12}H_8N_2)_3^{2+}$, do đó dung dịch chuyển thành màu đỏ.

Hóa chất: Vitamin E 0,15% trong etanol tuyệt đối, $FeCl_3$ 0,2% trong etanol, o-phenantrolin 0,5% trong etanol.



Hóa chất: Dung dịch vitamin K 0,1% trong etanol tuyệt đối, thuốc thử anilin.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch vitamin K, thêm 6-8 giọt thuốc thử anilin, lắc đều. Hỗn hợp chuyển sang màu đỏ.

- *Phản ứng với xistein*

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch vitamin K 0,1%, xistein 0,03%, NaOH 5%.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch vitamin K, thêm vài giọt xistein 0,03% và 5-6 giọt NaOH 5%, lắc đều. Dung dịch chuyển thành màu vàng.

6.1.2 Các vitamin hòa tan trong nước

a) Vitamin B₁ (Tiamin)

- *Phản ứng với axit diazobenzensulfonic (thuốc thử diazo)*

Vitamin B₁ phản ứng với axit diazobenzosulfonic sẽ tạo thành hợp chất có màu da cam hay màu đỏ.

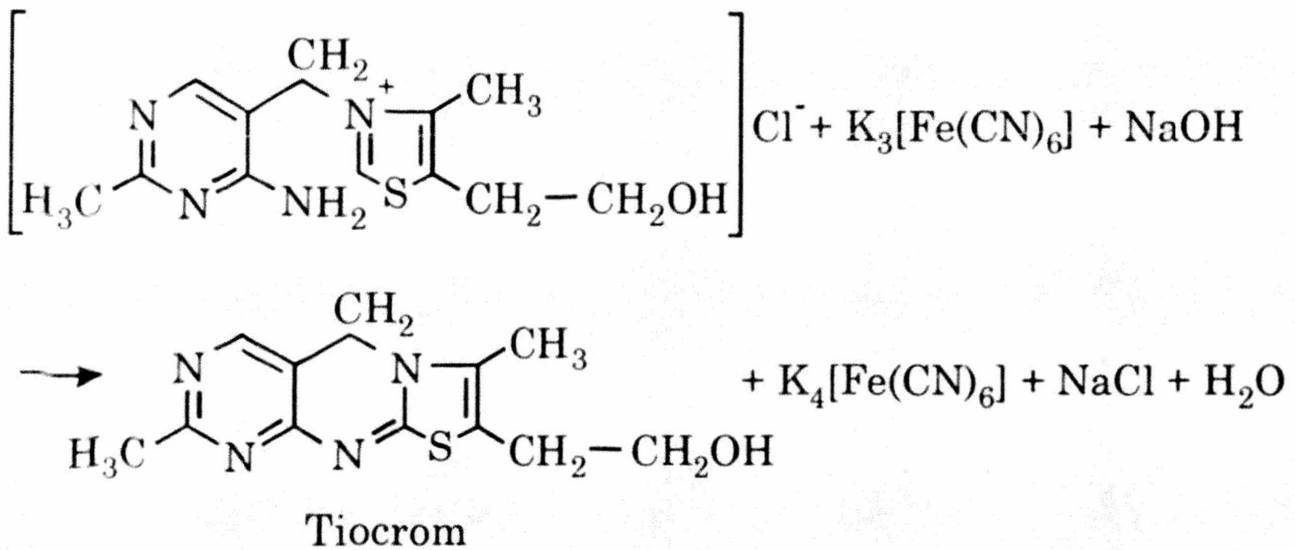
Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch vitamin B₁, thuốc thử diazo (xem mục 1.3.5), NaOH 10%.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1ml thuốc thử diazo, thêm vài giọt dung dịch vitamin B₁ và 5-7 giọt NaOH 10%, lắc đều,

quan sát màu (màu vàng chuyển sang da cam và có thể chuyển sang màu đỏ).

- *Phản ứng tạo thành tiocrom.*

Trong môi trường kiềm, dưới tác dụng của kali ferixianua $K_3[Fe(CN)_6]$, tiamin bị oxi hoá thành tiocrom. Hợp chất này sẽ phát huỳnh quang có màu đặc trưng dưới ánh đèn tử ngoại. Phản ứng xảy ra như sau:



Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch vitamin B₁ 1%, NaOH 10%, K₃[Fe(CN)₆] 1%, cồn izobutylic.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 20 giọt dung dịch vitamin B₁, thêm 10 giọt NaOH 10% và 5 giọt K₃[Fe(CN)₆] 1%, lắc đều, sau đó để yên, hỗn hợp trong ống tạo thành hai lớp ngăn cách. Để ống nghiệm dưới ánh sáng mặt trời hoặc dưới ánh đèn tử ngoại, quan sát sự tạo thành huỳnh quang. Giải thích kết quả nhận được.

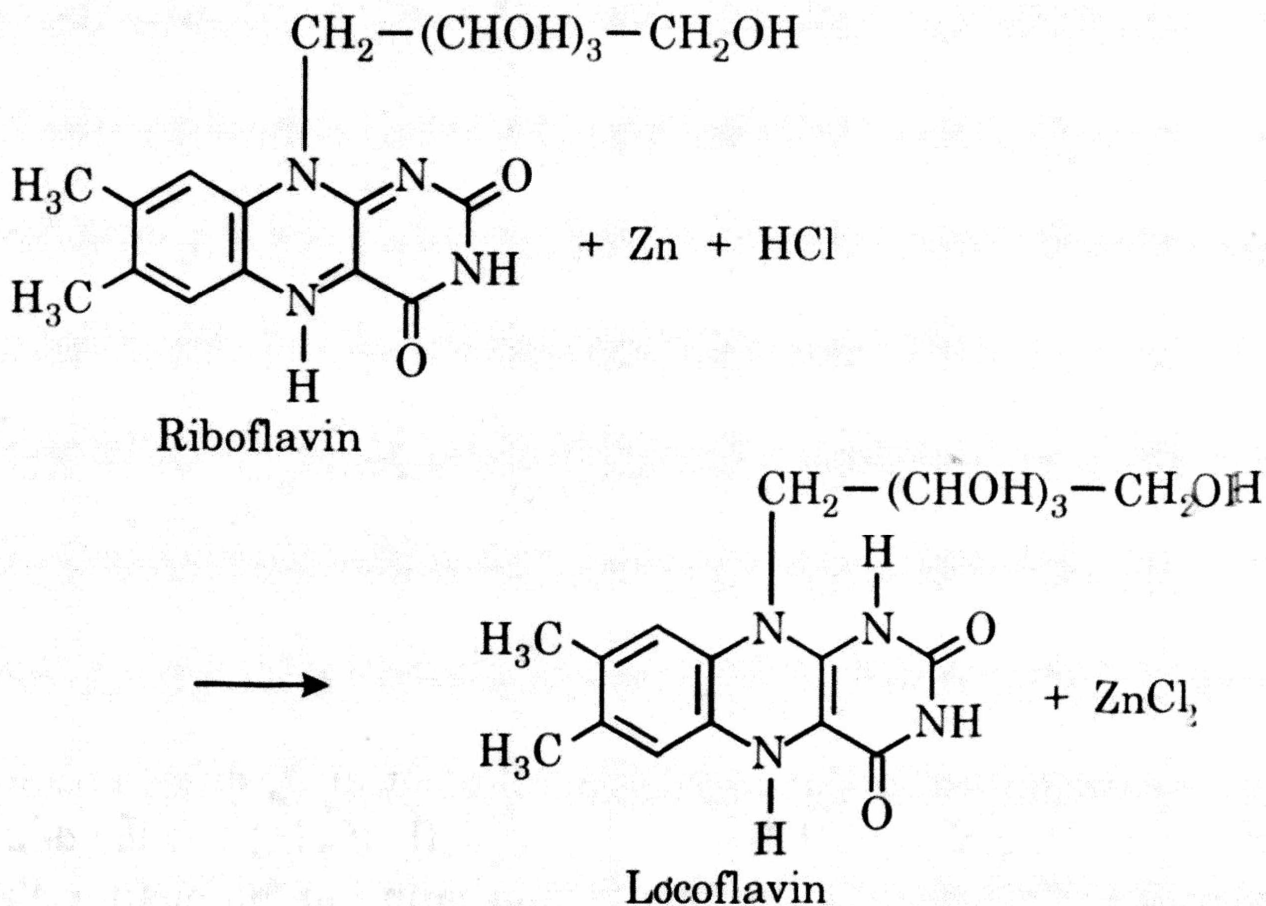
b) Vitamin B₂ (Riboflavin)

- *Phản ứng khử*

Riboflavin tồn tại ở dạng oxi hóa và dạng khử. Ở dạng khử có tên là lợcoflavin không màu dễ bị oxi hóa thành riboflavin.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch riboflavin 0,015% (giữ trong tối), HCl đặc, kẽm kim loại.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch riboflavin, thêm 10 giọt HCl đặc và một ít bột kẽm, lắc nhẹ và quan sát hiện tượng (khí hidro bay ra, màu chuyển dần từ vàng sang xanh lục, sau đó thành hồng và cuối cùng mất màu. Sau một lúc bề mặt dung dịch lại có màu vàng).



- Phản ứng với AgNO_3

Trong môi trường trung tính hay axit yếu ($\text{pH} = 6,5 - 7,2$), riboflavin phản ứng với AgNO_3 tạo thành hợp chất màu hồng hay đỏ.

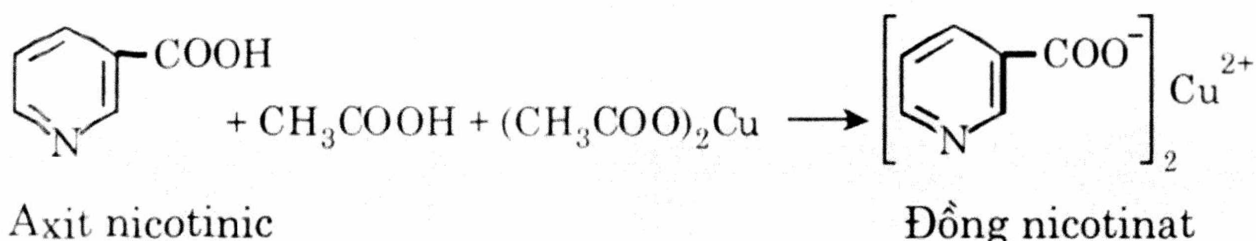
Nguyên liệu và hóa chất: Riboflavin 0,015% (giữ trong tối), AgNO_3 0,1% (bảo quản trong lọ nâu)

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch riboflavin, thêm 0,5ml AgNO_3 , quan sát sự xuất hiện màu hồng hoặc đỏ (cường độ màu phụ thuộc vào lượng riboflavin trong dung dịch).

c) **Vitamin B₅ (Axit nicotinic, vitamin PP hay nicotinamit)**

- *Phản ứng với đồng axetat*

Trong môi trường axit yếu, axit nicotinic phản ứng với (CH₃COO)₂Cu tạo thành kết tủa đồng nicotinat, kết tủa có màu xanh đặc trưng:



Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch axit nicotinic 1%, CH₃COOH 15%, (CH₃COO)₂Cu.

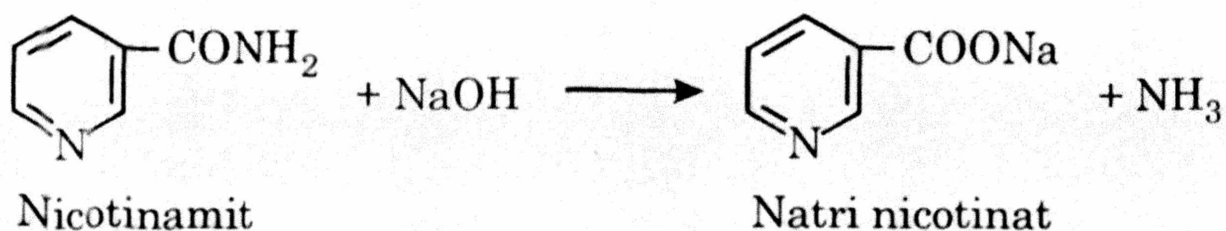
Cách làm: Cho vào ống nghiệm 20 giọt axit nicotinic 1%, thêm 10 giọt CH₃COOH 15%, đun hỗn hợp đến sôi, thêm 10-20 giọt (CH₃COO)₂Cu. Quan sát sự hình thành kết tủa với màu đặc trưng.

- *Phản ứng với NaOH*

Khi đun nóng nicotinamit với NaOH sẽ tạo ra natri nicotinat và giải phóng NH₃:

Nguyên liệu và hóa chất: Nicotinamit dạng bột, NaOH 40%.

Cách làm: Cho một ít bột nicotinamit vào ống nghiệm, thêm 2ml H₂O và 1ml NaOH 40%, đun sôi 5 phút trên nồi cách thủy, mùi đặc biệt xuất hiện. Dùng một mẫu giấy quỳ đặt trên miệng ống nghiệm, quan sát sự chuyển màu của giấy chỉ thị.



d) Vitamin B₆ (Piridoxin)

- Phản ứng với FeCl₃

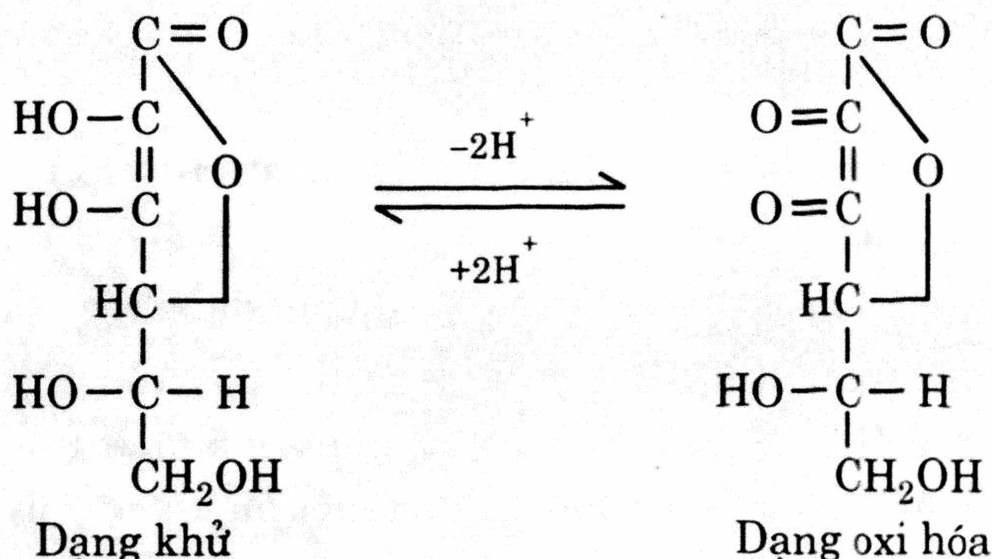
Dưới tác dụng của FeCl₃, piridoxin sẽ tạo thành phức chất có màu đặc trưng.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch piridoxin 1%, FeCl₃ 5%.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 1ml piridoxin 1%, thêm 5 giọt FeCl₃, lắc đều. Quan sát sự xuất hiện màu của phức chất tạo thành.

e) Vitamin C (Axit ascobic)

Vitamin C là hợp chất không no, trong phân tử có hai nhóm enol có khả năng phân ly cho ion H⁺, do vậy có tính axit và có tên là axit ascobic. Vitamin C tồn tại dưới hai dạng: dạng oxi hóa và dạng khử theo phản ứng sau:



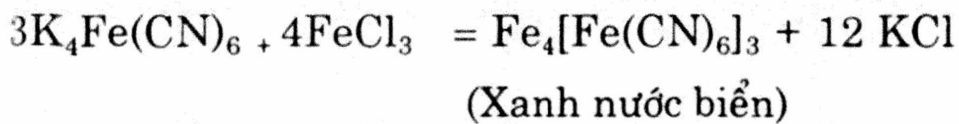
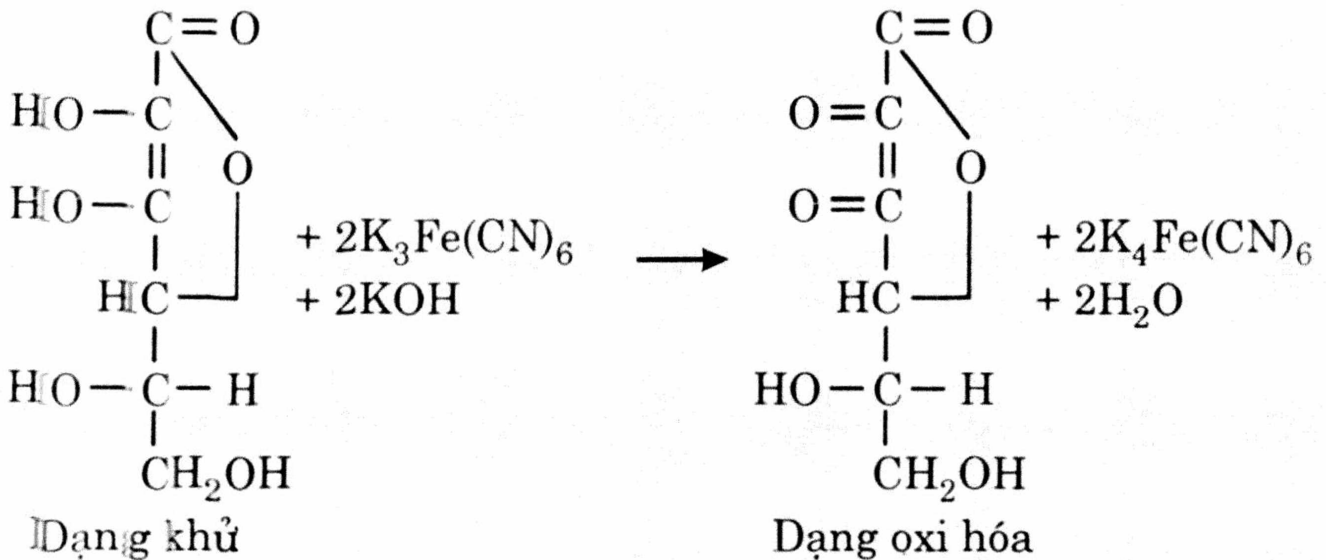
Vitamin C có nhiều trong rau, hoa quả... Nó tham gia tích cực vào các quá trình oxi hóa - khử. Có thể tiến hành định tính và định lượng vitamin C dựa vào tính chất khử của nó.

Khi tham gia vào phản ứng oxi hóa - khử, vitamin C có thể khử một số chất từ dạng có màu thành không màu hoặc từ dạng

hóa trị cao xuống dạng hóa trị thấp như: kali ferixiamua $[K_3Fe(CN)_6]$, xanh metylen, dung dịch iôt...

- *Phản ứng khử $K_3Fe(CN)_6$*

Axit ascoobic khử $K_3Fe(CN)_6$ thành $K_4Fe(CN)_6$, sau đó $K_4Fe(CN)_6$ tác dụng với Fe^{3+} tạo thành hợp chất $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ có màu xanh biển đến xanh lá cây. Phản ứng xảy ra như sau:



Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch vitamin C 0,1%, $K_3Fe(CN)_6$ 1%, KOH 5%, $FeCl_3$ 1%, xanh metylen 0,01%, HCl 10%, dung dịch iôt 0,01 N, NaOH 5%.

Cách làm: Cho vào ống nghiệm 2ml dung dịch vitamin C, 2 giọt dung dịch KOH 5%, 1ml dung dịch $K_3Fe(CN)_6$ 1%, lắc mạnh hỗn hợp trong ống. Sau đó thêm vào ống nghiệm 5-8 giọt HCl 10% và 0,5ml dung dịch $FeCl_3$, lắc nhẹ. Quan sát sự xuất hiện kết tủa màu xanh biển hoặc xanh lá cây.

- *Phản ứng với iôt*

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch vitamin C 0,1%, dung dịch iôt 0,01N, NaOH 5%.

Cách làm: Lấy hai ống nghiệm, cho vào ống I: 2ml dung dịch vitamin C, ống II: 2ml nước cất. Sau đó thêm vào mỗi ống 5 giọt dung dịch iôt 0,01N, lắc đều. Quan sát, giải thích sự sai khác trong hai ống.

- *Phản ứng với xanh metylen*

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch vitamin C 0,1%, dung dịch xanh metylen 0,01%, NaOH 5%

Cách làm: Lấy hai ống nghiệm, cho vào ống I: 1ml dung dịch vitamin C, ống II: 1ml nước cất. Sau đó thêm vào mỗi ống 1-2 giọt xanh metylen và 2-3 giọt NaOH 5%. Lắc đều và quan sát màu trong hai ống. Nếu không có sự thay đổi màu, đặt cả 2 ống nghiệm vào nồi cách thủy 37-40°C, quan sát màu của dung dịch trong các ống nghiệm sau vài phút. Giải thích kết quả.

6.2 Định lượng vitamin

6.2.1 Định lượng vitamin C theo phương pháp chuẩn độ

Nguyên tắc: Vitamin C có thể khử dung dịch iôt, dựa vào lượng iôt bị khử bởi vitamin có trong mẫu, suy ra hàm lượng vitamin C.

Nguyên liệu và hóa chất: Lá cây thìa là, HCl 5%, dung dịch I₂ 0,01 N, dung dịch tinh bột 1%.

Dụng cụ: Cối chày sứ, bình định mức hoặc ống đong (V = 50ml), bình nón (V = 100ml), buret.

Cách làm: Cân 5 gam thìa là tươi, nghiền nhỏ trong cối sứ với 5ml HCl 5% cho đến khi thành dạng đồng thể, sau đó dùng nước cất chuyển toàn bộ dung dịch đồng thể vào ống đong hoặc bình định mức, dẫn nước cất đến vạch 50ml, khuấy đều, lọc. Cho 20ml dung dịch lọc vào bình nón, chuẩn độ bằng dung dịch

I₂ có tinh bột làm chỉ thị màu (cho 5-10 giọt tinh bột 1% vào bình chứa vitamin C). Chuẩn độ đến khi bắt đầu xuất hiện màu xanh thì dừng lại.

Hàm lượng vitamin C trong mẫu (theo phần trăm) được tính bằng công thức sau:

$$X(\%) = \frac{V \cdot V_1 \cdot 0,00088 \cdot 100}{V_2 \cdot a}$$

trong đó:

V - Số ml dung dịch iôt 0,01N đã dùng để chuẩn độ

V₁ - Thể tích tổng số dung dịch mẫu (50ml)

V₂ - Thể tích mẫu lấy để xác định (20ml)

a - Số gam nguyên liệu đã dùng để chiết vitamin C (5g)

0,00088 - Số gam vitamin C tương ứng với 1ml dung dịch iôt 0,01N.

6.2.2 Định lượng vitamin A

Nguyên tắc: Khi có mặt anhidrit axetic, vitamin A sẽ tác dụng với angtimon clorua (SbCl₃) tạo thành phức chất màu xanh có khả năng hấp thụ ánh sáng màu đỏ. Cường độ màu của dung dịch tỷ lệ với nồng độ của vitamin A có trong mẫu.

Nguyên liệu và phương pháp: Dầu cá, anhidrit axetic, clorofom, SbCl₃ bão hòa trong clorofom.

Dụng cụ và thiết bị: Bình định mức (V= 25ml và 50ml), máy so màu quang điện.

Cách làm: Cho 2,5ml dầu cá vào bình định mức có dung tích 25ml, hòa tan dầu cá bằng clorofom và đưa thể tích dung dịch lên 25ml, lắc đều. Từ dung dịch này hút ra 1ml cho vào cuvet của máy so màu, bổ sung 1-2 giọt anhidrit axetic, thể vẫn

sẽ xuất hiện, thêm 4ml SbCl_3 bão hòa trong clorofom, lắc nhẹ, sau 10 giây đo độ hấp thụ ánh sáng ở vùng đỏ (dùng SbCl_3 bão hòa trong clorofom cho ống đối chứng).

Xây dựng đồ thị chuẩn của vitamin A: Cho 10ml dầu cá tiêu chuẩn có nồng độ 5.000 đv/ml vào bình định mức dung tích 50ml, bổ sung thêm clorofom để đạt thể tích 50ml, lắc đều. Từ dung dịch này (1.000 đv/ml) lấy ra các thể tích 100, 200, 300, 400 và 500 μl cho theo thứ tự tương ứng vào các ống nghiệm đã đánh số I, II, III, IV và V, bổ sung clorofom vào mỗi ống sao cho có thể tích cuối cùng đều là 1ml, sau đó thêm anhidrit axetic, SbCl_3 và đo mật độ quang học như ở trên. Vẽ đồ thị tương quan giữa mật độ quang học và nồng độ vitamin A.

Từ mật độ quang học thu được của mẫu thí nghiệm, dựa vào đồ thị chuẩn để tính ra lượng vitamin A có trong dầu cá.

Chương 7

Hocmon

Ngày nay hocmon được coi như các chất do một nhóm tế bào này tạo ra để tác động lên những nhóm tế bào khác bằng cách điều hòa và liên kết trao đổi chất trong cơ thể. Tuy vậy, cách tác động của hocmon đến sự trao đổi chất khác với cơ chế tác động của enzim và vitamin. chúng không tham gia vào thành phần phân tử của enzim như các vitamin. Khác với enzim, các hocmon không tham gia trực tiếp vào các phản ứng hóa học, mà vai trò của nó là điều hòa alosteric, nghĩa là làm thay đổi cấu hình không gian của các phân tử.

Hocmon có bản chất hóa học rất khác nhau và hoạt động ở nồng độ rất thấp, chỉ cần một lượng nhỏ (10^{-3} M – 10^{-7} M) cũng thể hiện được tác dụng sinh lý.

Trong cơ thể người và động vật, các hocmon được tạo ra bởi một loạt các mô đặc biệt như: tuyến giáp trạng, tuyến thượng thận, tuyến tụy, tuyến yên (hypophys), tuyến sinh dục... Hocmon động vật có tính đặc hiệu rõ rệt.

Theo bản chất hóa học, hocmon động vật được chia thành ba nhóm:

- Hocmon là dẫn xuất của colessterol (hocmon steroid)
- Hocmon là dẫn xuất của axit amin
- Hocmon là peptit và protein.

Thực vật cũng có khả năng tổng hợp các hocmon. Các hocmon thực vật điển hình là các chất điều hòa nội sinh, có vai trò quan trọng trong nhiều quá trình sống ở thực vật như: sinh trưởng, phân chia, biệt hoá tế bào, quá trình chín, lão hoá... Tuy nhiên các hocmon thực vật có tính đặc hiệu tác dụng thấp, mỗi hocmon tham gia trong nhiều quá trình sinh lý, thường có tác dụng trái ngược nhau hoặc làm tăng tác dụng của hocmon khác.

Các hocmon thực vật có thể được phân thành 5 nhóm:

- Dẫn xuất indol
- Gibberelin (có cấu trúc tetraterpen)
- Xitokinin (có cấu trúc gần với adenin)
- Dẫn suất của axit abxixic.
- Etilen (được hình thành trong quá trình trao đổi metionin).

Dưới đây giới thiệu một số phản ứng định tính của một số đại diện các nhóm hocmon nói trên và phương pháp định lượng chúng.

7.1 Hocmon động vật

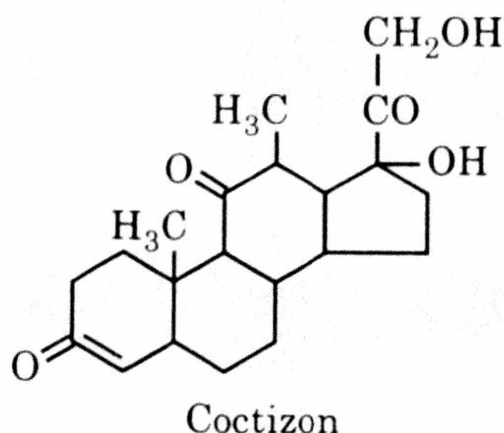
7.1.1 Hocmon steroid

Ở động vật và người, các hocmon steroid được tạo ra ở vỏ tuyến thượng thận và ở các tuyến sinh dục.

a) Các phản ứng định tính của coctizon

Coctizon là một glicocorticoid được tạo ra ở vỏ tuyến thượng thận. Nó có vai trò quan trọng trong điều hòa trao đổi sacari và protein.

Nhờ sự có mặt của các nhóm cacbonyl, coctizon có thể phản ứng với phenylhidrazin tạo thành hidrazon và ozazon, hoặc khử Cu^{2+} thành Cu^+ :



Nguyên liệu và hóa chất: Chế phẩm coctizon - axetat

Chuẩn bị dung dịch phenylhidrazin: hòa tan 0,1 gam phenylhidrazin vào 100ml hỗn hợp H_2SO_4 đặc và nước đã làm lạnh, tỷ lệ 1:1 theo thể tích (dung dịch chỉ chuẩn bị trước khi dùng).

Metanol, thuốc thử Fehling (dùng trong định tính đường khử, xem mục 3.1.1.b).

Cách làm:

- *Phản ứng với phenylhidrazin sunphat*

Hòa tan 1mg coctizon - axetat vào 1ml metanol, thêm vào ống nghiệm 5ml dung dịch phenylhidrazin sunphat và đun hỗn hợp trên nồi cách thủy. Qua vài phút, màu vàng xuất hiện do sự tạo thành phenylhidrazon và sau đó là ozazon, nhờ các nhóm cacbonyl của coctizon.

- *Phản ứng với thuốc thử Fehling*

Hòa tan 10mg coctizon - axetat vào 1ml metanol, thêm vào ống nghiệm 1ml dung dịch Fehling và đun trên nồi cách thủy. Sau một vài phút xuất hiện kết tủa đỏ của Cu_2O .

b) Phản ứng của deoxicocticoosteron

Nguyên liệu và hóa chất: Chế phẩm deoxicocticoosteron - axetat, H_2SO_4 đặc, clorofom.

Cách làm: Hòa tan 2mg chế phẩm deoxicocticoosteron - axetat vào 2ml H_2SO_4 đặc, thêm vào hỗn hợp 1,5ml nước, lắc mạnh, bổ sung 1,5ml nước nữa và lại lắc mạnh. Hỗn hợp trong ống nghiệm có màu tím đỏ. Làm lạnh hỗn hợp rồi thêm 3ml clorofom và lắc đều; lớp dưới của hỗn hợp có màu vàng, còn lớp trên có màu xanh lục.

7.1.2 Hocmon là peptit và protein

Ở động vật, các hocmon này được tạo ra ở tuyến yên và tuyến tụy, chúng tham gia vào quá trình trao đổi sacarit, điều hòa lượng đường huyết.

Các phản ứng định tính của insulin

Insulin là một protein kiềm, có khối lượng phân tử thấp (5800 dalton) gồm 51 gốc axit amin, có tác dụng điều hòa, làm giảm lượng glucozơ trong máu.

Hóa chất: Dung dịch insulin (trong ampul), NaOH 0,1%, CH_3COOH , thuốc thử của phản ứng biure, thuốc thử Folin.

Cách làm:

- *Phản ứng với NaOH*

Cho vào ống nghiệm 10-15 giọt dung dịch insulin, thêm vào ống nghiệm từng giọt dung dịch NaOH 0,1% đến khi xuất hiện kết tủa trắng. Kết tủa hòa tan lại khi thêm axit axetic vào hỗn hợp đến pH = 2,5 - 3,5.

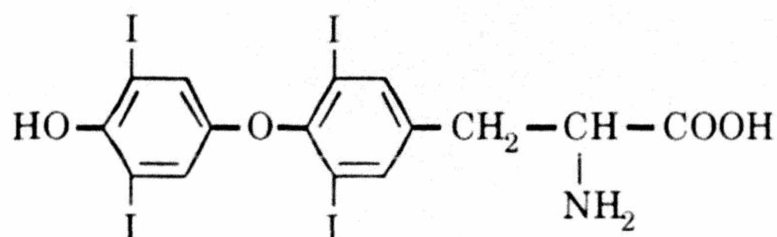
- *Các phản ứng nhận biết bản chất protein của insulin*

Làm các phản ứng biure, phản ứng với thuốc thử Folin (xem phần protein, mục 1.3.1 và 1.4.2.b).

7.1.3 Hocmon là dẫn xuất của axit amin

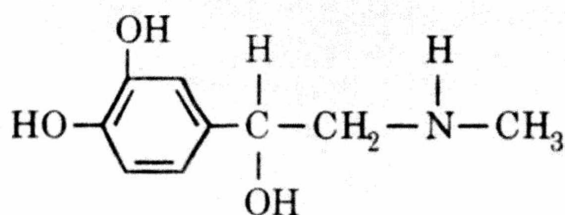
Đại diện chính của nhóm này là tiroxin và adrenalin. Các hocmon này được tạo ra ở tuyến giáp trạng và vỏ tuyến thượng thận.

Tiroxin được tổng hợp ở tuyến giáp trạng, còn adrenalin được tạo ra ở vỏ thượng thận.



Tiroxin

Tiroxin có chứa trong phân tử bốn nguyên tử iôt. Khi bị oxi hóa, tiroxin tạo thành axit tetraiôtaxetic có vai trò xúc tác trong các quá trình oxi hóa.



Adrenalin

Adrenalin (còn gọi là epinephrin) có tác dụng kích thích quá trình phân giải glicogen làm tăng lượng đường trong máu.

Adrenalin dễ dàng bị oxi hóa trong môi trường trung tính và kiềm, tạo thành các sản phẩm tham gia tích cực vào các quá trình oxi hóa trong cơ thể.

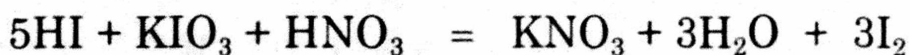
Adrenalin có tính khử, nó có khả năng khử một số ion kim loại từ hóa trị cao xuống dạng hóa trị thấp.

a) **Phản ứng của tiroxin**

Nhận biết tiroxin bằng cách thủy phân tách axit iôthidric (HI), rồi chuyển thành dạng iôt tự do, khi iôt hòa tan trong clorofom, clorofom sẽ có màu tím đặc trưng.

Nguyên liệu và hóa chất: Chế phẩm tireodin chứa tiroxin được chuẩn bị như sau: tuyến giáp trạng của đại gia súc như trâu, bò... sau khi tách ra, được loại mỡ, sấy khô và nghiền nhỏ; HNO₃ đặc, KIO₃ 1%, clorofom

Cách làm: Cho vào ống nghiệm khoảng 0,5g tireodin, thêm 10 giọt HNO₃ đặc. Tiến hành thủy phân bằng cách đun cẩn thận (tránh tạo bọt) trong 1-2 phút. Sau đó thêm vào hỗn hợp 20 giọt KIO₃ 1%, lắc đều và làm lạnh. KIO₃ oxi hóa HI giải phóng ra iôt tự do:



Thêm vào ống nghiệm 1-2ml clorofom và lắc mạnh. Sau khi để lắng, lớp clorofom (phía dưới) có màu tím (do iôt tạo nên).

b) **Các phản ứng định tính của adrenalin**

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch adrenalin (trong ampul), FeCl₂ 3%, NH₄OH 10%, KIO₃ 1%, CH₃COOH hoặc H₃PO₄ 10%.

Thuốc thử diazo (gồm axit sunphanilic 1%, NaNO₂ 5%, Na₂CO₃ 10% được chuẩn bị riêng rẽ).

Cách làm:

- *Phản ứng với FeCl₃*

Cho vào ống nghiệm 0,5ml adrenalin, thêm vào 2ml nước và 1 giọt FeCl₂ 3%, Hỗn hợp trong ống nghiệm lập tức có màu xanh ngọc bích do sự tạo thành sắt phenolat. Khi thêm 1 giọt dung dịch NH₄OH 10%, hỗn hợp chuyển thành tím đỏ và sau đó thành màu nâu.

- Phản ứng với kali iodat

Cho vào ống nghiệm 0,5ml adrenalin, thêm vào đó 1ml KIO_3 1%, 10 giọt CH_3COOH hoặc H_3PO_4 10% và đun nhẹ hỗn hợp đến $60-65^\circ C$, hỗn hợp có màu tím đỏ.

- Phản ứng với thuốc thử diazo

Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch axit sunphanilic, 1ml $NaNO_2$ 5%, 2ml dung dịch adrenalin và 1ml Na_2CO_3 10%, lắc đều, dung dịch có màu đỏ.

c) Định lượng adrenalin

Phương pháp dựa trên việc xác định mật độ quang học của sản phẩm (màu xanh xuất hiện) khi adrenalin tác dụng với thuốc thử Folin.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch chuẩn adrenalin có nồng độ 0,04mg/ml (được chuẩn bị trong bình định mức có dung tích 25ml). Na_2CO_3 10%, thuốc thử Folin (xem phần phụ lục).

Dụng cụ và thiết bị: bình định mức ($V = 25ml$), máy so màu quang điện.

Cách làm: Lấy 2 ống nghiệm, cho vào ống I: 0,5ml dung dịch adrenalin chuẩn (0,04mg/ml), ống II: 0,5ml dung dịch nghiên cứu (dung dịch adrenalin chưa biết nồng độ). Sau đó thêm vào mỗi ống 2ml Na_2CO_3 10% và 0,25ml thuốc thử Folin đã pha loãng hai lần, lắc đều. Màu xanh xuất hiện và đạt cường độ cực đại sau 5 phút. Thêm vào mỗi ống 2,25ml Na_2CO_3 10% và đo màu các dung dịch trên máy so màu quang điện, dùng kính lọc màu đỏ. Làm ống đối chứng với nước cất

Tính kết quả:

Hàm lượng adrenalin trong dung dịch nghiên cứu được tính theo công thức:

$$C_x = \frac{C.E}{E_x}$$

trong đó:

C - Nồng độ adrenalin trong dịch chuẩn.

C_x - Nồng độ adrenalin của dịch mẫu nghiên cứu.

E - Mật độ quang học của dung dịch adrenalin chuẩn.

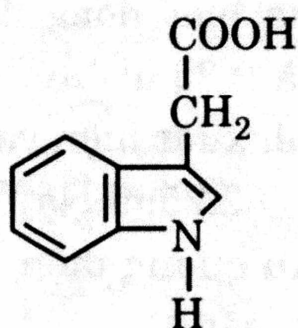
E_x - Mật độ quang học của dịch nghiên cứu.

Trong trường hợp cần thiết có thể tính hàm lượng adrenalin trên 100g mẫu (mg%)

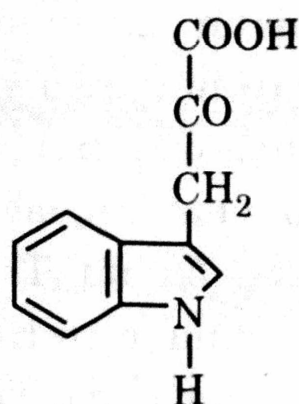
7.2 Hocmon thực vật

7.2.1 Các hocmon là dẫn xuất indol

Nhóm hocmon này thường được gọi là auxin hoặc hocmon sinh trưởng. Đại diện quan trọng nhất của nhóm này là axit β - indolaxetic (IAA). Trong thực vật IAA có thể tồn tại ở dạng tự do hoặc dạng liên kết với glucozơ hoặc peptit; ngoài IAA có thể còn gặp axit indolpiruvic (IPA) và một số dẫn xuất khác.



Axit β -indolaxetic (IAA)



Axit indolpiruvic (IPA)

Nguồn nguyên liệu giàu IAA là các phần non và hạt của cây (như hạt ngô).

Có thể phân biệt nhanh chóng IAA trong chế phẩm nhờ IAA có khả năng phát huỳnh quang trong ánh sáng tử ngoại hoặc qua sản phẩm có màu khi IAA phản ứng với một số thuốc thử hóa học. Cũng có thể kiểm tra hoạt tính IAA bằng thử nghiệm sinh học.

a) Thu nhận auxin tổng số có chứa IAA từ hạt ngô

Hạt ngô sau khi phơi khô được nghiền nhỏ. 100 gam bột được ngâm với axeton 50% ở nhiệt độ thấp (0-4°C) trong 2 giờ. Sau đó lọc thu lấy dung dịch lọc. Rửa chất bột (bã còn lại) bằng 200-300ml axeton 50%, lọc, thu lấy dung dịch. Đổ chung các dung dịch lọc với nhau và kết tủa protein từ dung dịch bằng cách thêm tinh thể NaCl vào dung dịch theo tỷ lệ 20 gam NaCl/100ml dung dịch. Tiếp theo, tách lớp axeton khỏi dung dịch muối nhờ phễu chiết và tiếp tục chiết auxin từ dung dịch muối bằng cách lắc vài lần với axeton 100% (mỗi lần 50 - 100ml axeton). Đổ chung tất cả nước chiết axeton với nhau, lọc rồi cho bay hơi trên nồi cách thủy (<50°C). Lắc vài lần hỗn hợp chất lỏng còn lại với ete etylic, thu gộp các nước chiết bằng ete. Dung dịch thu được sau khi loại ete trên nồi cách thủy là chế phẩm auxin có chứa IAA được dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

b) Các phản ứng màu của IAA

- Phản ứng Xankovski

IAA tác dụng với thuốc thử Xanpe Xankovski (gọi tắt là thuốc thử Xanpe) tạo thành sản phẩm màu đỏ. Với thuốc thử này axit indolpiruvic (IPA) cho sản phẩm màu mận chín. Có thể ứng dụng phản ứng này để định lượng auxin.

Nguyên liệu và hóa chất: Chế phẩm IAA hoặc auxin tổng số; thuốc thử Xanpe: chuẩn bị riêng hai dung dịch: FeCl₃ 0,5M;

HCl 35% hoặc H_2SO_4 35%; trước khi dùng trộn 1ml $FeCl_3$ 0,5M với 50ml HCl 35% hoặc H_2SO_4 35%.

Cách làm: Lấy 2 ống nghiệm, cho vào ống I: 1ml IAA, ống II (ống đối chứng): 1ml nước cất. Thêm vào mỗi ống 2ml thuốc thử Xanpe, lắc đều. Dung dịch có màu đỏ sau khoảng 30 phút để ở nhiệt độ phòng. Nếu mẫu thử là IPA dung dịch có màu mạn chín, còn nếu là chế phẩm auxin tổng số màu có thể từ đỏ tới mạn chín.

- *Phản ứng Eclich*

Nguyên liệu và hóa chất: Thuốc thử Eclich (dung dịch p-dimetylaminobenzandehit 1% trong HCl 1N); chế phẩm IAA hoặc auxin tổng số.

Cách làm: Lấy 2 ống nghiệm. Cho vào ống I: 1ml auxin, ống II (ống đối chứng): 1ml nước cất. Thêm vào mỗi ống 2ml thuốc thử Eclich, lắc đều. Dung dịch có màu đỏ tía sau khoảng 10 phút để ở nhiệt độ phòng. Phản ứng này kém nhạy hơn phản ứng với thuốc thử Xanpe, màu của hỗn hợp có thể nhạt dần sau 10 phút trở đi.

c) **Định lượng IAA bằng phương pháp hóa học**

Nguyên tắc: Phương pháp dựa trên việc xác định cường độ màu đỏ của sản phẩm tạo thành khi IAA tác dụng với thuốc thử Xanpe trong phản ứng Xankovski. Sản phẩm khá bền và có khả năng hấp thụ mạnh ánh sáng ở bước sóng 530nm.

Nguyên liệu và hóa chất: Mẫu nghiên cứu chứa IAA; Dung dịch IAA chuẩn gốc (0,01%); Thuốc thử Xanpe (xem phần 7.2.1.b).

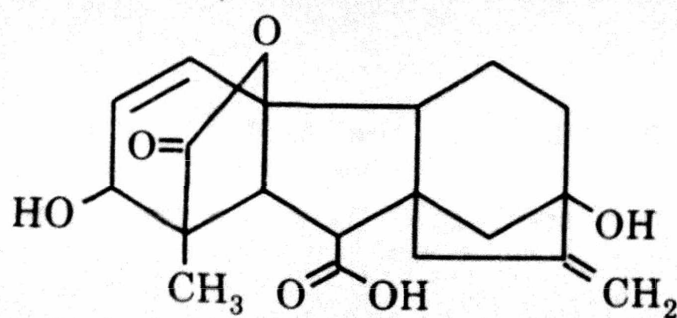
Thiết bị: Máy so màu hoặc máy quang phổ.

Cách làm: Lấy 2 ống nghiệm. Cho vào ống I: 1ml dung dịch mẫu nghiên cứu, vào ống II (ống đối chứng): 1ml nước cất. Thêm vào mỗi ống 2ml thuốc thử Xanpe. Lắc đều, để ở nhiệt độ phòng 30 phút. Khi thời gian hết, xác định cường độ màu trên máy quang phổ ở bước sóng 530nm hoặc trên máy so màu với kính lọc màu lục. Đối chiếu giá trị mật độ quang học của mẫu thí nghiệm với đồ thị chuẩn để tính ra hàm lượng IAA trong 1ml dung dịch nghiên cứu, từ đó tính ra hàm lượng % IAA trong nguyên liệu.

Dựng đồ thị chuẩn IAA: Từ dung dịch IAA chuẩn gốc, chuẩn bị các dung dịch IAA có các nồng độ pha loãng khác nhau chứa một lượng IAA tương ứng là: 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành phản ứng màu với các dung dịch chuẩn như với mẫu nghiên cứu. Dựng đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa mật độ quang học và nồng độ IAA.

7.2.2 Gibberelin

Giberelin là nhóm chất điều tiết sinh trưởng thường có mặt trong cây. Gibberelin tác động không giống như auxin và thường tương tác với các auxin tự nhiên hoặc nhân tạo. Đại diện quan trọng của nhóm này là axit giberelic (GA_3). Axit giberelic tương đối dễ tan trong nước, có nhiều ở các bộ phận đang phát triển của cây (như hạt đang nảy mầm).



Axit giberelic (GA_3)

Có thể nhận biết được axit gibberelic nhờ nó có khả năng phát huỳnh quang màu vàng nhạt dưới ánh đèn tử ngoại. Cũng có thể xác định hoạt tính của GA_3 bằng các thử nghiệm sinh học.

a) Chiết gibberelin từ mô thực vật

- Phương pháp thứ nhất

Nghiên 1kg mô thực vật (hạt lúa nảy mầm) rồi ngâm với 1,5 lít hỗn hợp axeton / nước (theo tỷ lệ thể tích 85/15) trong 24 giờ ở $0^\circ C$. Sau khi lọc hỗn hợp, thu lấy dịch lọc rồi trộn dịch lọc với 100 gam than hoạt tính. Lắc hỗn hợp trên máy lắc trong vài giờ, sau đó thu lấy than đã hấp phụ gibberelin bằng cách lọc hỗn hợp qua phễu Buchner. Chiết rút gibberelin từ bột than vài lần bằng etylaxetat (mỗi lần 50 - 100ml). Sau khi lọc, nước chiết etylaxetat được cho bay hơi tới lúc thể tích còn lại 10 - 15ml. Chế phẩm thu được có thể dùng cho các thử nghiệm tiếp theo.

- Phương pháp thứ hai

Nghiên 1kg mô thực vật rồi ngâm với 2 lít nước cất đã được chỉnh pH tới 3,5 bằng HCl trong vài giờ. Sau khi gạn bỏ nước, chiết gibberelin bằng etylaxetat bằng cách ngâm mô trong dung môi đó qua đêm ở nhiệt độ $0^\circ C$. Sau khi lọc, nước chiết etylaxetat được để bay hơi (trong chân không hoặc nồi cách thủy ($<50^\circ C$)) cho tới khi thể tích còn lại 10 - 15ml. Chế phẩm thu được có thể dùng cho các thí nghiệm tiếp theo.

b) Tách các gibberelin và nhận biết GA_3 , bằng sắc ký trên giấy

Bằng sắc ký trên giấy có thể tách các gibberelin khác nhau và sau khi phun giấy bằng dung dịch axit sunfuric, ta có thể thấy vệt màu vàng nhạt của GA_3 dưới ánh sáng của đèn tử ngoại.

Nguyên liệu và hóa chất: chế phẩm gibberelin (xem mục 7.2.2.a); giấy sắc ký Watman số 1; dung môi chạy sắc ký (n-butanol: amoni hidroxit 1,5N, tỉ lệ 3:1 theo thể tích; axit sunfuric 70%.

Dụng cụ và thiết bị: bình sắc ký loại nhỏ (bocal kích thước 6 x 50cm); đèn tử ngoại (loại để khử trùng).

Cách làm: Cắt giấy Watman số 1 thành dải có chiều rộng 2cm, chiều dài 45cm. Đánh dấu điểm xuất phát trên giấy và chấm lên đó 0,1ml chế phẩm gibberelin (chia làm nhiều lần). Dùng phương pháp sắc ký đi lên: đổ vào bình sắc ký 50 - 60ml dung môi, treo giấy trong bình nhờ móc xuyên qua nút và cho hệ thống được cân bằng trong vài giờ. Sau đó bằng cách đẩy móc xuống ta nhúng đầu giấy vào dung môi. Quá trình sắc ký kết thúc khi dung môi ngấm lên gần tới mép trên của bản giấy. Tiếp đó lấy giấy ra, hong khô (có thể sấy bằng luồng khí nóng). Khi giấy đã khô, phun giấy bằng dung dịch axit sunfuric, rồi soi dưới đèn tử ngoại, chỗ có phát huỳnh quang màu vàng nhạt là axit giberelic.

c) Xác định hoạt tính gibberelin bằng thử nghiệm sinh học

Hoạt động của gibberelin có thể nhận biết nhờ tác dụng tăng sinh trưởng bộ phận của cây khi xử lý cây bằng gibberelin.

Nguyên liệu và hoá chất: dung dịch axit giberelic (GA_3) hoặc một gibberelin nào đó, với nồng độ $10\mu\text{g/ml}$ có chứa Tween-20 (chất làm tăng độ bám dính) với nồng độ 0,01%; hạt giống đậu cove hay hạt giống dưa chuột.

Cách làm: Hạt đậu cove được gieo trong cát, sau đó chuyển vào dung dịch dinh dưỡng lúc lá thứ nhất nở được 50% và trụ

trên lá mầm còn chưa bắt đầu kéo dài. Ta nhỏ GA_3 (hoặc một giberelin khác) trực tiếp lên chồi ngọn cây. Sau 48 giờ tiến hành đo độ dài của trụ trên lá mầm và so sánh với đối chứng (những cây không được xử lý bằng giberelin).

Thử nghiệm tương tự có thể tiến hành với dưa chuột.

Nếu sự sai khác về độ dài trụ trên lá mầm (phần thân cây) giữa cây thí nghiệm và cây đối chứng đạt từ 20% trở lên, ta có thể xem giberelin đã có tác động lên cây.

Chương 8

Các chất thực vật thứ sinh

Ở thực vật, ngoài protein, sacarit, lipit, vitamin... còn có những hợp chất khác được gọi là các chất thực vật thứ sinh. Nhóm hợp chất này thường có mặt trong thực vật với hàm lượng thấp, nhưng chúng có vai trò quan trọng trong trao đổi chất ở cây. Một số chất thực vật thứ sinh được tích tụ trong thực vật với hàm lượng đáng kể (như ankaloit, cao su, tinh dầu), gây nên kiểu trao đổi chất đặc trưng của các loài đó. Nhiều chất thuộc nhóm này, ở mức độ đáng kể, quyết định phẩm chất thực phẩm và mùi vị các sản phẩm khác nhau chế biến từ thực vật. Nhiều chất được dùng trong công nghiệp và y học.

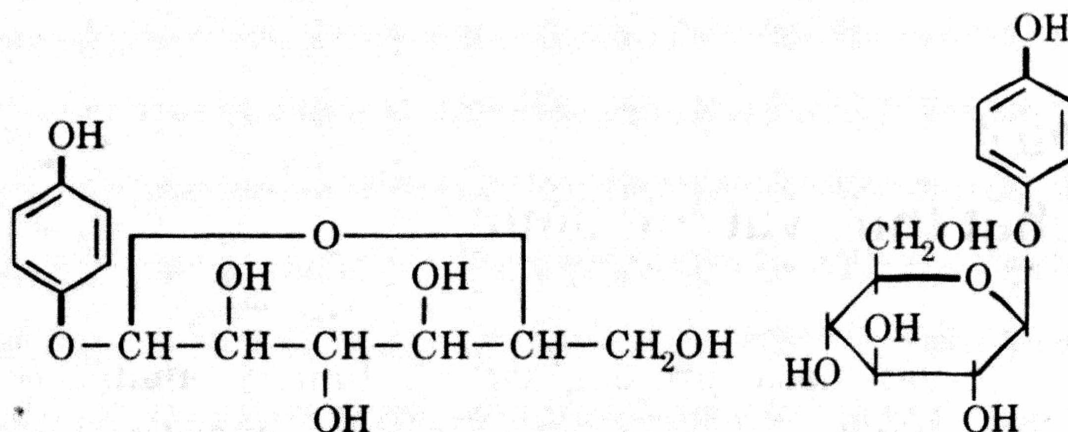
Thuộc nhóm chất thực vật thứ sinh có thể kể đến: glicozit, ankaloit, tanin, tinh dầu, cao su...

8.1 Glicozit

Glicozit là những hợp chất hữu cơ phức tạp được cấu tạo từ sacarit và một chất không phải sacarit gọi là aglicon. Sự kết hợp hai thành phần trên thường được thực hiện nhờ nhóm - OH glicozit của thành phần sacarit. Thành phần sacarit có thể là monosacarit (như glucozơ trong acbutin có ở lá trúc đào, và trong nhiều glicozit khác) hoặc oligosacarit.

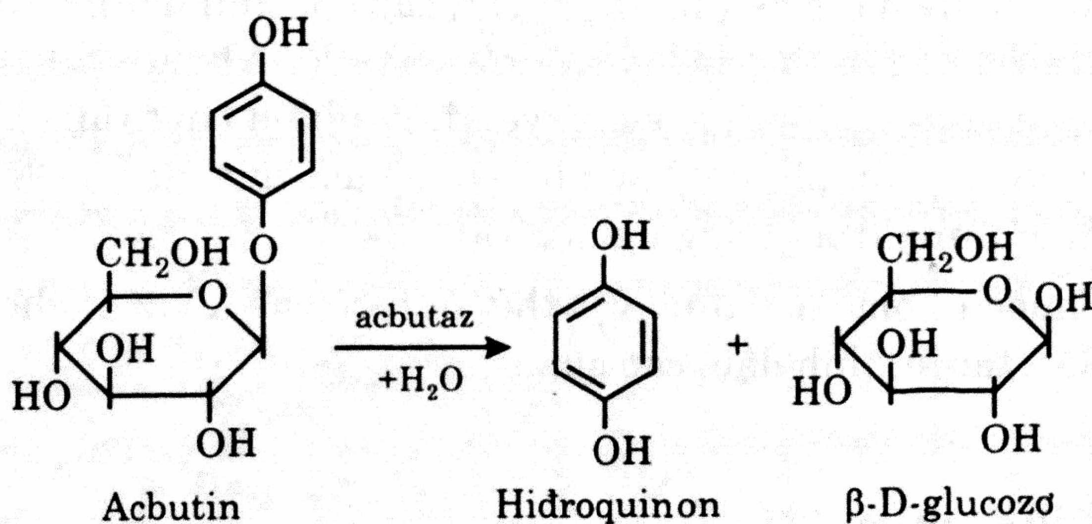
8.1.1 Định tính glicozit acbutin trong lá trúc đào

Glicozit acbutin trong lá trúc đào gồm có hidroquinon và glucozơ được kết hợp với nhau bằng liên kết β - glicozit:



Acbutin

Glicozit trên có thể được thủy phân bởi acbutaz, một enzym cũng có trong lá trúc đào, tạo thành glucozơ và hidroquinon:



Có thể nhận biết acbutin nhờ màu của phức chất giữa acbutin với một số hóa chất như FeSO_4 hay FeCl_3 ; hoặc nhờ thành phần glucozơ sau khi cho enzym thủy phân acbutin.

Nguyên liệu và hóa chất: Lá trúc đào, FeSO_4 tinh thể, FeCl_3 5%, HCl 10%, NaOH 10%, dung dịch Fehling (xem mục 3.1.1.a).

Dụng cụ và thiết bị: Cối chày sứ, cốc (V= 50-100ml), phễu, bếp điện, tủ ấm (37- 40°C).

a) Phản ứng màu nhận biết acbutin

Cách làm: Nghiền nhỏ lá trúc đào, cân 1 gam cho vào cốc, thêm vào 10ml nước sôi, lắc vài phút, vừa lắc vừa đun rồi lọc ngay khi còn nóng. Làm nguội dung dịch tới nhiệt độ phòng. Dung dịch lọc được sử dụng để làm các phản ứng sau:

- *Phản ứng với $FeSO_4$*

Lấy 1ml dung dịch lọc trên cho vào ống nghiệm, thêm vào vài tinh thể $FeSO_4$. Quan sát sự chuyển màu. Sản phẩm phản ứng cuối cùng ở dạng kết tủa màu tím bản (gần như đen).

- *Phản ứng với $FeCl_3$*

Lấy 1ml dung dịch lọc cho vào ống nghiệm, thêm 1-2 giọt $FeCl_3$. Quan sát màu (gần như xanh chàm).

Các phản ứng trên chứng tỏ có acbutin trong lá trúc đào.

b) Thủy phân acbutin bằng acbutaz

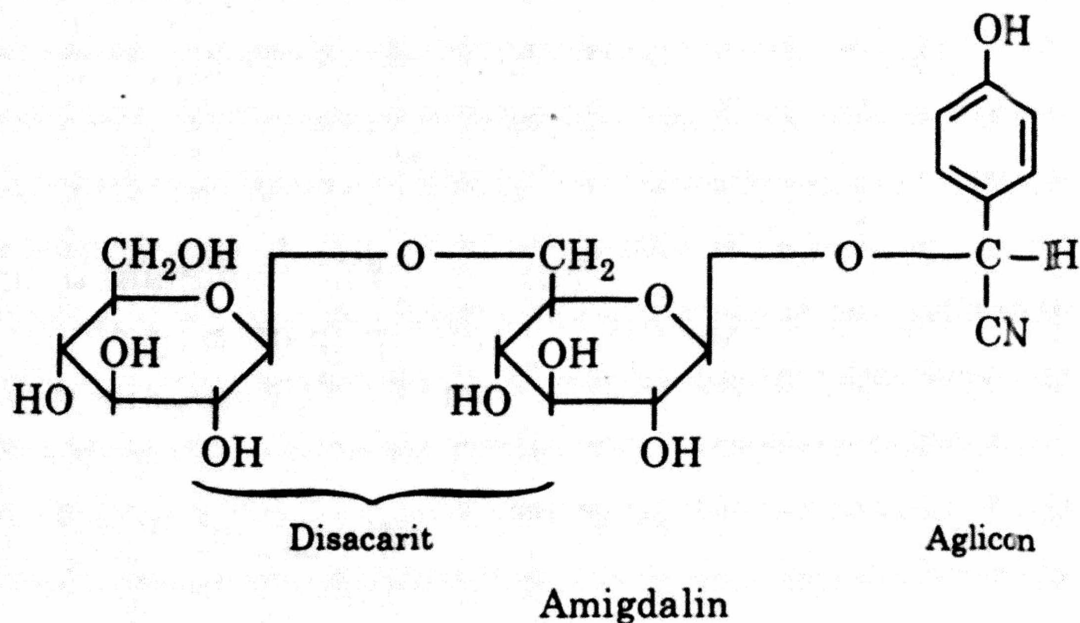
Cân 1 gam lá trúc đào cho vào cối sứ, nghiền nhỏ, cho thêm 10ml nước cất, khuấy đều và chuyển vào cốc dung tích 50-100ml, đặt vào tủ ấm $37-40^\circ C$ trong 1 giờ, sau đó lấy ra lọc thu lấy dung dịch trong. Cho vào ống nghiệm 5ml dung dịch lọc, nhỏ từng giọt HCl đến khi mất màu xanh. Trung hòa hỗn hợp bằng NaOH (thử bằng giấy quỳ), lọc thu dung dịch trong.

Làm phản ứng với dung dịch Fehling: cho vào dung dịch lọc 2ml dung dịch Fehling, đun sôi 3 phút. Quan sát sự hình thành kết tủa ở đáy ống nghiệm.

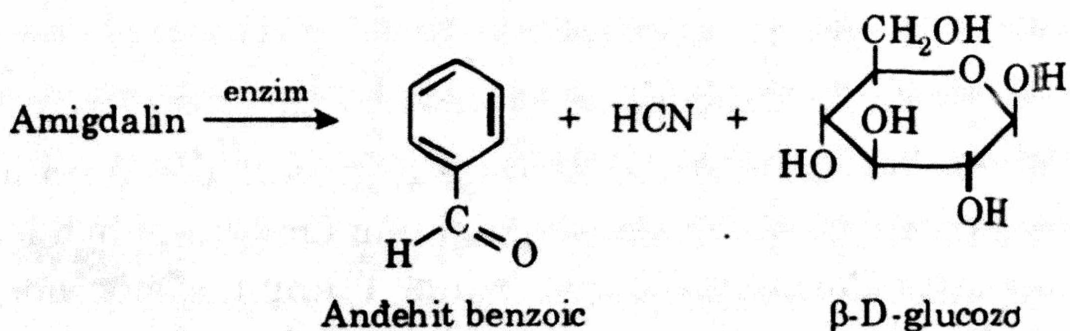
8.1.2 Glicozit trong lá đào (*Prunus persica* L. Batsch)

Trong lá đào có glicozit là amigdalinalin gồm phần aglicon là andehit benzoic kết hợp với axit xianhidric, còn phần sacarit là

một disacarit cấu tạo từ hai phân tử β -D-glucosơ nối với nhau bằng liên kết β -1,6-glicozit:



Dưới tác dụng của enzym, amigdaline bị thủy phân thành anđehit benzoic, axit xianhidric và β -D-glucosơ.



Trong cây các enzym thủy phân amigdaline (glucosidaz, prunaz, oxinitridaz) không hoạt động, nhưng nếu trong môi trường nước và ở nhiệt độ $35-40^{\circ}\text{C}$ phản ứng thủy phân glicozit xảy ra rất mạnh.

Có thể nhận biết glicozit qua axit xianhidric được giải phóng ra trong quá trình thủy phân nhờ một số phản ứng màu đặc trưng.

Nguyên liệu: Chuẩn bị dung dịch chiết lá đào.

Cân 50 gam lá đào, thái nhỏ và cho vào cối sứ với một ít nước, giã dập (làm nhanh để tránh bay mất HCN), cho vào bình cát có chứa 100ml nước, lắp máy để cát. Cát cho đến khi được 50ml (nước cát lá đào). Lắc mạnh dung dịch thu được, lọc qua giấy lọc đã thấm ướt bằng nước cát. Giữ dung dịch lọc trong lọ màu, nút kín (nên đậy đầy lọ).

a) Định tính axit xianhidric (HCN)

Trong môi trường kiềm, khi có các ion Fe^{2+}, Fe^{3+} , axit xianhidric tạo thành phức chất feric feroxianua có màu xanh nước biển; axit xianhidric cũng có thể tác dụng với axit picric trong môi trường kiềm, tạo thành dẫn xuất có màu đỏ.

Hóa chất: NaOH 10%, $FeSO_4$ tinh thể, $FeCl_3$ 5%, HCl 10%, axit picric bão hòa. Giấy picro - sôđê (cách chuẩn bị: xem phụ lục).

Cách làm:

- Phản ứng tạo thành feric feroxianua

Cho vào ống nghiệm 2ml dung dịch chiết lá đào, thêm vào 2-3 giọt NaOH 10% và vài hạt $FeSO_4$. Đun sôi, cho thêm 2 giọt dung dịch $FeCl_3$. Nhỏ từng giọt HCl để axit hóa. Dung dịch chuyển thành màu xanh nước biển, để lâu kết tủa sẽ lắng xuống đáy ống nghiệm.

- Phản ứng với axit picric

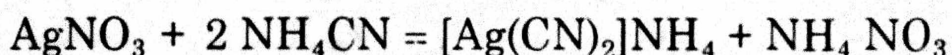
Cho vào ống nghiệm 2ml dung dịch chiết lá đào, thêm vào 2-3 giọt NaOH 10%, lắc đều, thêm 2 giọt axit picric, lắc nhẹ, để một lúc, quan sát màu.

Có thể tiến hành phản ứng với giấy picro - sôđê như sau: lấy 2ml dung dịch chiết lá đào cho vào ống nghiệm, đặt mẫu giấy picro - sôđê vào miệng ống, đậy nút lại. Để một lúc quan sát sự chuyển màu.

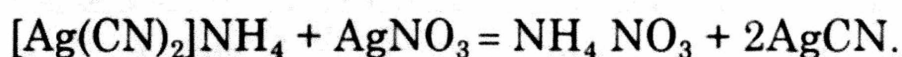
b) Định lượng HCN

Nguyên tắc: Dùng AgNO_3 tác dụng với HCN trong môi trường kiềm và dựa vào lượng AgNO_3 đã tác dụng, tính ra lượng HCN có trong mẫu.

Khi cho NH_4OH vào dung dịch nước cất lá đào, HCN chuyển thành NH_4CN . AgNO_3 được thêm vào sẽ tác dụng với NH_4CN để tạo thành muối kép bạc và amoni xianua hòa tan trong NH_4OH :



Lượng AgNO_3 dư thừa trong dung dịch tạo thành AgCN cũng tan trong NH_4OH .



Nhưng nếu có I_2 (dưới dạng KI) thì lượng AgNO_3 thừa sẽ tạo thành AgI kết tủa màu vàng nhạt không tan trong NH_4OH . Do đó dùng KI làm thuốc thử trong chuẩn độ bằng dung dịch AgNO_3 , nếu dung dịch vẫn đục là dấu hiệu phản ứng đã kết thúc.

Nguyên liệu và hóa chất: Dung dịch chiết lá đào (xem cách chuẩn bị ở phần trên), NaOH 1%, NH_4OH đặc, KI 20%, AgNO_3 0,1N (dùng dung dịch chuẩn)

Cách làm: Cho 25ml dung dịch chiết lá đào vào bình nón dung tích 250ml, thêm 75ml nước cất và 10 giọt NaOH 10% để thủy phân amigdalín. Lắc đều, cho thêm 10ml NH_4OH , 10 giọt KI 20% rồi chuẩn độ bằng AgNO_3 đến khi dung dịch bắt đầu hơi đục.

1ml AgNO_3 0,1 N tương đương với 0,0054g HCN. Tính lượng HCN chứa trong 100ml nước cất lá đào, từ đó tính ra hàm lượng HCN trong nguyên liệu.

8.2 Ankaloit

Ankaloit là những hợp chất hữu cơ có chứa nitơ, nguồn gốc thực vật, đa số có nhân vòng, ít nhiều mang tính kiềm, có thể tạo muối với các axit.

Ankaloit thường có tác dụng sinh lý mạnh trên cơ thể người và động vật, đa số là chất độc.

Trong cây, ankaloit ở dạng muối với các axit có mặt trong các mô của cây và chúng hòa tan được trong dung dịch nước. Nếu cho ankaloit dạng muối tác dụng với kiềm sẽ thu được ankaloit ở dạng tự do không tan trong nước, nhưng lại tan trong dung môi hữu cơ. Tính chất này được ứng dụng để tách ankaloit ra khỏi nguyên liệu thực vật.

8.2.1 Một số phản ứng định tính

Các ankaloit bị kết tủa bởi một số thuốc thử như: thuốc thử Mayer, thuốc thử Valser, tanin bão hòa v.v... do vậy có thể dùng những thuốc thử này để phát hiện các ankaloit. Tuy nhiên, đây là những phản ứng không đặc hiệu, nghĩa là khi có ankaloit thì nhất định có kết tủa, nhưng thử nghiệm có kết tủa thì chưa thể kết luận chắc chắn là có ankaloit được.

Dưới đây giới thiệu hai phản ứng của ankaloit cho kết tủa có màu đặc trưng, đó là phản ứng Dragendorf và phản ứng với axit photphomolipđic.

Hóa chất: HCl 1%; CH₃COOH đặc; KI.

Chuẩn bị thuốc thử Dragendorf: Pha dung dịch hỗn hợp gốc gồm: a) dung dịch bismut nitrat trong axit (cân 0,85g bismut nitrat hòa tan trong 40ml nước, thêm 10ml CH₃COOH đặc, lắc đều); b) dung dịch kali iôđua (cân 20g KI hòa tan trong 50ml nước). Sau đó trộn lẫn hai dung dịch a và b với nhau ta được

dung dịch gốc. Lấy 20ml dung dịch gốc này, thêm 100ml nước và 20ml CH_3COOH đặc, lắc đều, nhận được dung dịch thuốc thử để sử dụng.

Dung dịch axit photphomolipđic 1% (1g axit hòa tan trong 100ml nước).

Dụng cụ: Bình cầu hoặc bình nón dung tích 100ml, nồi cách thủy (100°C).

Cách làm: Chiết ankaloit từ nguyên liệu thực vật: Cén 1 gam nguyên liệu tươi (lá ớt), cắt nhỏ, cho vào bình cầu hoặc bình nón, thêm vào đó 25ml HCl 1%, đun trên nồi cách thủy đang sôi trong 5 phút. Để nguội, lọc qua giấy lọc, thu lấy dung dịch để làm phản ứng định tính.

- Phản ứng Dragendorf

Trong môi trường axit rất nhiều ankaloit cho kết tủa nâu đỏ da cam hoặc đỏ gạch với thuốc thử Dragendorf có chứa kali iôđua và bismut nitrat.

Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch chiết ankaloit, nhỏ từng giọt thuốc thử, quan sát sự tạo thành kết tủa.

- Phản ứng với axit photphomolipđic

Ankaloit tác dụng với axit photphomolipđic cho kết tủa màu vàng, sau đó chuyển thành màu xanh hoặc màu lục do sự khử axit molipđic.

Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch chiết ankaloit và thêm từng giọt axit photphomolipđic 1%, quan sát kết tủa.

8.2.2 Định lượng ankaloit

Dựa vào những tính chất của ankaloit đã nói trên, định lượng ankaloit có thể tiến hành theo cách sau.

Để chiết rút ankaloit ra khỏi nguyên liệu, trước hết cần kiềm hóa nguyên liệu để đẩy ankaloit ra ở dạng tự do rồi rút ankaloit bằng dung môi hữu cơ. Sau đó có thể cho bay hơi dung môi và cân trực tiếp lượng ankaloit đã được tách ra, hoặc có thể chuẩn độ ankaloit được tách ra bằng axit và dựa vào lượng axit đã dùng để chuẩn độ tính ra lượng ankaloit.

Định lượng ankaloit trong cà độc dược.

Nguyên tắc: Ankaloit có trong lá cà độc dược được đẩy ra bằng NH_4OH . Sau đó rút ankaloit ra bằng dung môi hữu cơ: ete và clorofom. Trung hòa ankaloit bằng H_2SO_4 . Đo lượng H_2SO_4 thừa có thể tính được lượng ankaloit.

Nguyên liệu và hóa chất: Lá cà độc dược tươi, ete etylic; clorofom, NH_4OH 4%; NH_4OH 50%, H_2SO_4 1N; H_2SO_4 0,02N, NaOH 0,02N, chỉ thị metyl đỏ 0,2%, H_2SO_4 10%

Dụng cụ: Bình nón ($V=100\text{ml}$), phễu chiết ($V=100\text{ml}$), nồi cách thủy, microburet.

Cách làm: Cân chính xác 10g lá cà độc dược, thái nhỏ cho vào bình nón, thêm vào đó 50ml hỗn hợp ete - clorofom (10ml clorofom + 40ml ete) để yên 1 phút. Sau đó thêm 5ml NH_4OH 4%, đậy nút để yên trong 2 giờ, thỉnh thoảng lắc nhẹ. Lấy dung dịch ra, chuyển dung dịch từ trong bình vào phễu chiết có chứa sẵn 20ml nước cất và 6ml H_2SO_4 1N, rửa bã trong bình bằng hỗn hợp ete - clorofom vài lần, mỗi lần 10ml. Các dung dịch rửa này cũng được đổ gộp vào phễu chiết. Lắc mạnh hỗn hợp trong phễu chiết cho đều để rút ankaloit thành dạng tan trong axit. Để yên phễu cho hỗn hợp lắng thành 2 lớp. Tách lấy riêng lớp axit. Rửa lại lớp ete - clorofom còn lại bằng H_2SO_4 10% (rửa 2 lần mỗi lần 10ml) rồi lại thu lấy lớp axit. Đồn các dung dịch axit lại và kiềm hóa trở lại bằng 20-22ml NH_4OH 50%. Lại rút ankaloit bằng clorofom, làm 3 lần, mỗi lần 10-15ml.

Đồn các dung dịch clorofom vào bình nón và cho bay hơi trên nồi cách thủy. Sau khi khô, thêm vào cạn 3ml ete, tiếp tục cô đến cạn. Cuối cùng hòa tan cạn trong 20ml H₂SO₄ 0,02N.

Tiếp theo chuẩn độ lượng H₂SO₄ thừa trong dung dịch bằng NaOH 0,02N, dùng metyl đỏ làm chỉ thị.

Dựa vào lượng H₂SO₄ thừa, tính lượng H₂SO₄ đã tác dụng với ankaloit chiết ra từ mẫu.

1ml H₂SO₄ 0,02N tương ứng với 0,005784g ankaloit. Do đó có thể tính được tỷ lệ phần trăm ankaloit có trong nguyên liệu theo công thức sau:

$$X(\%) = \frac{M \cdot 0,005784 \cdot 100}{10}$$

trong đó:

M - số ml H₂SO₄ 0,02N đã tác dụng với ankaloit.

8.3 Các hợp chất phenol

Tạo ra các hợp chất phenol là một trong những nét đặc trưng của tế bào thực vật.

Hợp chất phenol là chất có chứa trong phân tử vòng beizen (nhân thơm) mà bản thân vòng này mang một, hai hay nhiều nhóm - OH. Các hợp chất phenol rất đa dạng về hàm lượng, thành phần, cấu tạo, tính chất và chức năng. Nhìn chung đối với đời sống thực vật, các hợp chất phenol tham gia tích cực vào các quá trình oxi hóa - khử, có vai trò bảo vệ, là chất chống oxi hóa... Đối với đời sống con người, các hợp chất phenol có ý nghĩa lớn trong công nghiệp nhẹ, công nghiệp thực phẩm, trong y học...

Các hợp chất phenol có thể chia thành 2 nhóm lớn là:

- Các hợp chất phenol tương đối đơn giản còn được gọi là các monome như: axit galic (có trong thành phần của tanin thủy phân), hay các hợp chất flavonoit trong đó có catechin.
- Các hợp chất phức tạp thường gọi là các hợp chất poliphenol; đại diện được biết nhiều hơn cả thuộc nhóm này là tanin hay chất chát, là chất có khả năng thuộc da, tức là làm kết tủa protein của da, tạo thành phức chất không tan.

Xác định catechin ở búp chè

Catechin là hợp chất phenol tương đối đơn giản thuộc nhóm flavonoit, có hoạt tính vitamin P, dễ dàng bị oxi hóa và có xu hướng polime hóa. Catechin là một trong những chất tiền thân tạo nên các tanin ngưng tụ. Catechin phổ biến ở thực vật, đặc biệt có nhiều trong búp chè (đạt tới 30% trọng lượng khô). Hàm lượng catechin là một chỉ số chất lượng và giá trị sinh học quan trọng của hàng loạt thực phẩm như: chè, rượu nho, rượu vang, nước quả...

Dưới đây giới thiệu cách xác định nhanh hàm lượng catechin trong lá chè bằng phương pháp so màu.

Cơ sở của phương pháp là phản ứng của các catechin với vanilin trong môi trường axit tạo thành sản phẩm màu đỏ tím. Cường độ màu tỷ lệ thuận với hàm lượng catechin trong mẫu và có thể đo được nhờ máy so màu hay máy quang phổ. Đồ thị chuẩn được dựng theo chế phẩm catechin tổng số.

Hóa chất: Etanol 80%, clorofom, etylaxetat, Na_2SO_4 tinh thể, thuốc thử vanilin (1% trong HCl đặc).

Dụng cụ và thiết bị: Bình nón ($V=500\text{ml}$), ống sinh hàn, phễu chiết, bình định mức 100ml, nồi cách thủy, máy quang phổ hoặc máy so màu quang điện.

Cách làm: Lá chè tươi được cố định bằng hơi nước trong 3 phút và sấy khô tiếp theo ở 70°C . 1 gam lá chè đã cố định như trên được nghiền trong cối sứ, sau đó chuyển vào bình định mức 100ml, thêm vào đó 80ml nước sôi và đặt vào nồi cách thủy đang sôi. Chiết rút catechin trong 40 phút, thỉnh thoảng lắc nhẹ. Sau đó bình được làm nguội đến nhiệt độ phòng, dẫn nước đến vạch mức, trộn đều và lọc qua giấy lọc. Từ dung dịch lọc thu được lấy 1ml cho vào bình định mức có dung tích 50ml, thêm nước đến vạch mức và lắc trộn đều. Cho vào ống nghiệm 1ml dung dịch pha loãng trên, thêm 4ml thuốc thử vanilin, lắc đều, sau 2-5 phút đo cường độ màu trên máy so màu hoặc máy quang phổ ở bước sóng 508nm (chú ý dùng cuvet so màu có nắp đậy). Song song với ống thí nghiệm làm ống kiểm tra, thay 1ml mẫu bằng 1ml nước cất. Từ số đọc thu được, dựa vào đồ thị chuẩn để tính ra hàm lượng catechin.

Đồ thị chuẩn catechin được xây dựng như sau: Mẫu chuẩn là chế phẩm catechin tổng số. Pha dung dịch catechin chuẩn chứa $100\mu\text{g/ml}$, từ dung dịch gốc này chuẩn bị các dung dịch pha loãng chứa 10, 15, 20, 25... $50\mu\text{g/ml}$ và làm tiếp tục như với mẫu thí nghiệm. Làm ống đối chứng với nước cất. Có thể dựng đồ thị chuẩn hoặc lập bảng biểu diễn sự tương quan giữa mật độ quang học và hàm lượng catechin.

Chuẩn bị chế phẩm catechin tổng số:

Cho 10 gam búp chè (đã được cố định và nghiền nhỏ như đã nêu ở trên) vào bình nón dung tích 500ml, thêm vào 150ml etanol 80%, lắp ống sinh hàn ngược và chiết rút ở 40°C trong 20 phút trên nồi cách thủy. Lọc dung dịch chiết qua giấy lọc, bã được chiết lại 2 lần mỗi lần bằng 75ml etanol 80% trong 20

phút. Gộp các dung dịch chiết lại và cô đặc đến 50ml ở 30-40°C trên nồi cách thủy hoặc chân không. Tiếp theo xử lý dung dịch cô đặc thu được bằng clorofom (3 - 4 lần, mỗi lần 50ml) trong phễu chiết để loại bỏ cafein, sắc tố và các sản phẩm khác. Gộp các phần dung dịch thu được và xử lý tiếp bằng etylaxetat trong phễu chiết (5 lần, mỗi lần khoảng 100ml). Sau đó thêm vào phần dung dịch chiết bằng etylaxetat Na_2SO_4 khan để loại nước, lọc, thu dung dịch trong và đem cô trên nồi cách thủy ở 30-40°C hoặc trong chân không, đến khi còn khoảng 10ml thì thêm vào 20ml nước, lắc nhẹ, cô tiếp đến cạn.

Chế phẩm khô thu được chiếm khoảng 25% trong lượng mẫu và được dùng như mẫu chuẩn catechin tổng số.

Phụ lục

1. Một số chất chỉ thị màu để đo pH

Chất chỉ thị màu	Giới hạn thay đổi pH	Sự đổi màu		Dung dịch chuẩn pha
		Môi trường axit	Môi trường kiềm	
1. Metyl da cam	3,1-4,4	Đỏ	Da cam	0,1% trong H ₂ O
2. Bromophenol xanh	3,0-4,6	Vàng	Xanh	0,1% trong H ₂ O
3. Công gô đỏ	3,0-5,2	Tím	Đỏ	0,1% trong H ₂ O
4. Metyl đỏ	4,4-6,3	Đỏ	Vàng	0,1% trong H ₂ O
5. Giấy quỳ	5,8-8,0	Đỏ	Xanh	
6. Đỏ trung tính	6,8-8,0	Đỏ	Vàng	0,1% trong etanol 60%
7. Timol xanh	8,0-9,6	Vàng	Xanh	0,1% trong H ₂ O
8. Phenolphthalein	8,0-9,8	Không màu	Tím đỏ	0,1% trong etanol 50%
9. Timolphthalein	9,3-10,5	Không màu	Xanh	0,1% trong etanol 80%

2. Chuẩn bị dung dịch Folin (để xác định protein)

Hòa tan 100g natri wolframát ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25g natri molipdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) vào 800ml nước cất. Thêm vào 50ml axit photphoric 85% và 100ml HCl đặc. Lắp ống sinh hàn ngược và đun hỗn hợp trong 10 giờ. Sau đó thêm vào hỗn hợp 150g Li_2SO_4 , 50ml nước và vài giọt brom, đun 15 phút không có ống sinh hàn để loại bỏ brom thừa. Sau khi làm nguội dung dịch, lấy ra 5ml và chuẩn độ bằng dung dịch NaOH chuẩn 0,1N. Dựa trên kết quả chuẩn độ, bổ sung nước để dung dịch có nồng độ cuối cùng là 2N, lọc nếu dung dịch có kết tủa, giữ dung dịch trong lọ màu. Trước khi dùng thuốc thử cần pha loãng gấp đôi bằng nước.

3. Chuẩn bị giấy Picrô - sôđê

Cắt một băng giấy lọc sạch, ngâm vào dung dịch axit picric 1% trong 15-20 phút, sau đó lấy ra hong khô, ngâm lại vào dung dịch Na_2CO_3 1% trong 5-10 phút. Lấy ra hong khô sẽ được giấy picrô - sôđê. Có thể cắt thành băng nhỏ giữ trong hộp để sử dụng.

4. Bảng chuyển đổi lượng đồng thành lượng đường (mg) theo phương pháp Bectrand

Đồng (mg)	Glucosơ (mg)	Đồng (mg)	Glucosơ (mg)	Đồng (mg)	Glucosơ (mg)
1,1	0,50	10,6	5,05	15,2	7,35
1,5	0,68	10,8	5,15	15,4	7,45
2,0	0,90	11,0	5,25	15,6	7,55
2,5	1,13	11,2	5,35	15,8	7,65
3,0	1,36	11,4	5,45	16,0	7,75
3,5	1,59	11,6	5,55	16,2	7,85
4,0	1,81	11,8	5,65	16,4	7,95
4,4	2,00	12,0	5,75	16,6	8,05
5,0	2,27	12,2	5,85	16,8	8,15
5,5	2,50	12,4	5,95	17,0	8,25
6,0	2,75	12,6	6,05	17,2	8,35
6,6	3,05	12,8	6,15	17,4	8,45
7,0	3,25	13,0	6,25	17,6	8,55
7,2	3,35	13,2	6,35	17,8	8,65
7,4	3,45	13,4	6,45	18,0	8,75
7,8	3,65	13,6	6,55	18,2	8,85
8,2	3,85	13,8	6,65	18,4	8,95
8,6	4,05	14,0	6,75	18,6	9,05
9,0	4,25	14,2	6,85	18,8	9,15
9,5	4,50	14,4	6,95	19,0	9,25
10,0	4,75	14,6	7,05	19,2	9,35
10,2	4,85	14,8	7,15	19,4	9,45
10,4	4,95	15,0	7,25		

Tài liệu tham khảo chính

1. Phạm Trân Châu, Đào Kim Nhung, Nguyễn Quốc Khang, 1977. Thực tập nhỏ sinh hóa học, Trường ĐHTH Hà Nội.
2. Phạm Trân Châu, Nguyễn Thị Hiền, Phùng Gia Tường, 1997. Thực hành Hoá sinh học, Nhà Xuất bản Giáo dục, Hà Nội.
3. Goodwin, T.W. and Mercer, E.I, 1987. Introduction to Plant Biochemistry, 2nd Edition, Pergamon Press, New York.
4. Grinkevic, N.I. 1983. Chimitzeski anilys lecarstvennoic rastenii, Izd. "Vúsaia skola", Moskva (tiếng Nga).
5. Nelson, D.L. and Cox, M.M. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry, Worth Publishers, New York.
6. Philipovich, U.B., Egorova, T.A., Xevastianova, G.A., 1975. Praticum po obsci biochimii, Provesenie, Moskva (tiếng Nga).
7. Shapiro, D.K. 1976. Praticum po biologicheskoi chimii, Vúseisaia Skola, Minsk (tiếng Nga).
8. Stryer, L. 1995. Biochemistry, W.H. Freeman and Company, New York.
9. Walker, J.M. 1996. The protein protocols Handbook, Humana Press, Totowa New Jersey.
10. William, B.L. and Wilson, K., 1975. Biologist's Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry, Edward Arnold, London, 1975.

NHÀ XUẤT BẢN ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI

16 Hàng Chuối - Hai Bà Trưng - Hà Nội

Điện thoại: (04) 9724852; (04) 9724770. Fax: (04) 9714899

Chịu trách nhiệm xuất bản:

Giám đốc: PHÙNG QUỐC BẢO

Tổng biên tập: NGUYỄN BÁ THÀNH

Chịu trách nhiệm nội dung:

Hội đồng nghiệm thu giáo trình
Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - ĐHQGHN

Người nhận xét: GS. TS NGUYỄN QUỐC KHANG
PGS. TS NGUYỄN VĂN MÙI

Biên tập: QUỐC THẮNG

Biên tập tái bản: QUỐC THẮNG

Trình bày bìa: NGỌC ANH

THỰC TẬP HOÁ SINH HỌC

Mã số: 1K-96 ĐH2007

In 1.000 cuốn, khổ 14,5 x 20,5 cm tại Công ty Cổ phần KOV

Số xuất bản: 381 - 2007/CXB/41 - 64/ĐHQGHN, ngày 25/5/2007

Quyết định xuất bản số: 610 KH/XB

In xong và nộp lưu chiểu quý IV năm 2007.