

Ю. Н. Митрасов, М. Ю. Куприянова

БИОХИМИЯ С ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Лабораторный практикум

**Чебоксары
2021**

Министерство просвещения Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Чувашский государственный педагогический
университет им. И. Я. Яковлева»

БИОХИМИЯ С ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Лабораторный практикум

Составители

Ю. Н. Митрасов, М. Ю. Куприянова

Чебоксары
2021

УДК 577(075.8)
ББК 28.072я73-5
Б 638

Биохимия с основами молекулярной биологии : лабораторный практикум / сост. Ю. Н. Митрасов, М. Ю. Куприянова. – Чебоксары : Чуваш. гос. пед. ун-т, 2021. – 196 с.

Печатается по решению ученого совета
Чувашского государственного педагогического университета
им. И. Я. Яковлева (протокол № 9 от 26.03.2021 г.).

Рецензенты:

Лыщиков А. Н., д-р хим. наук, профессор, заведующий кафедрой общей, неорганической и аналитической химии Чувашского государственного университета имени И. Н. Ульянова;

Савинова Н. П., канд. хим. наук, доцент кафедры биоэкологии и химии Чувашского государственного педагогического университета им. И. Я. Яковлева.

Пособие предназначено для студентов педагогических вузов, обучающихся по направлению 44.03.05 «Педагогическое образование» (с двумя профилями подготовки), профили «Биология и химия» и «Биология и география».

© Митрасов Ю. Н., Куприянова М. Ю.,
составление, 2021
© Чувашский государственный
педагогический университет
им. И. Я. Яковлева, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
Правила техники безопасности при работе в биохимической лаборатории.....	6
1. Химический состав живой материи.....	9
Лабораторная работа № 1. Качественный элементный анализ биоорганических соединений.....	13
Лабораторная работа № 2. Качественные реакции важнейших катионов и анионов внутри клеток и во внеклеточных жидкостях организма человека.....	20
2. Белки.....	34
Лабораторная работа № 3. Реакции осаждения белков.....	39
Лабораторная работа № 4. Методы качественного исследования простых белков.....	47
Лабораторная работа № 5. Гидролиз белков.....	55
3. Углеводы.....	62
3.1. Моносахариды.....	64
Лабораторная работа № 6. Качественные реакции на моносахариды	73
3.2. Дисахариды.....	78
Лабораторная работа № 7. Свойства дисахаридов.....	82
3.3. Полисахариды.....	87
Лабораторная работа № 8. Свойства полисахаридов.....	94
4. Ферменты.....	99
Лабораторная работа № 9. Свойства ферментов.....	104
5. Липиды.....	110
Лабораторная работа № 10. Свойства липидов.....	114
6. Витамины.....	127
Лабораторная работа № 11. Качественные реакции на витамины	129
7. Нуклеиновые кислоты.....	149
7.1. Компоненты нуклеиновых кислот.....	152
7.2. Структура и информационные свойства нуклеиновых кислот.....	159
Лабораторная работа №12.....	164
8. Гормоны.....	172
Лабораторная работа № 13. Качественные реакции на гормоны...	174
9. Метаболизм. Промежуточный обмен.....	182
Лабораторная работа № 14. Определение содержания пировиноградной и мочевой кислот	184
Лабораторная работа № 15. Обмен углеводов.....	187
Рекомендуемая литература.....	195

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторный практикум разработан в соответствии с рабочей программой дисциплины «Биохимия с основами молекулярной биологии». Он включает в себя лабораторные работы, которые охватывают основные разделы изучаемого теоретического курса дисциплины: простые и сложные белки, ферменты, липиды, витамины, углеводы, нуклеиновые кислоты и пути их метаболизма в живых организмах. Практикум составлен таким образом, чтобы показать значение биохимических процессов и развить у студентов навыки самостоятельной работы. Поэтому в каждой работе приведены формулы и уравнения протекающих реакций, что необходимо для более глубокого понимания результатов эксперимента.

Перед выполнением работы необходимо внимательно ознакомиться с методикой её проведения и предположить ожидаемый результат, вытекающий из теоретического обоснования химизма реакции или процесса. Выполнение работ знакомит студента с методами качественных и количественных исследований сырья и готовой продукции, с основами биотехнологии, дополняет и закрепляет теоретический материал наиболее сложных разделов изучаемой дисциплины.

В начале раздела и перед работой излагаются краткие теоретические обоснования по химии, биологической роли и метаболизму органических веществ. К каждой работе дано описание химической реакции или процесса, ожидаемый результат и практическое значение.

Выполняемую работу обязательно записывают в тетрадь с указанием номера, названия, цели работы, принципа метода, химизма происходящих реакций или процессов, схемы исследования и полученных результатов. По результатам работы произвести расчет или оформить полученные данные по предложенной схеме и обязательно сделать вывод.

Контрольные вопросы, приведенные в учебном пособии к каждой лабораторной работе, очерчивают минимум знаний, необходимых для защиты выполненной и оформленной работы.

Перед выполнением лабораторных работ студенты обязаны ознакомиться с правилами техники безопасности при работе в биохимической

лаборатории. Для успешного выполнения лабораторных работ студенты должны обладать определенными экспериментальными навыками: уметь взвешивать на весах, измерять объемы жидкостей, проводить титрование, работать с приборами, используемыми в физико-химических исследованиях (фотоколориметром), а также проводить математическую обработку результатов, и представлять их в виде графиков, диаграмм.

Данное учебно-методическое пособие, должно помочь студентам закрепить теоретические знания, полученные на лекциях и в процессе самостоятельного изучения материала. По окончании экспериментальной части студентам предоставляется возможность оформить свой фактический материал в виде таблиц и графиков с целью его обобщения, и написания выводов.

Все иллюстрации к настоящему пособию взяты из открытых интернет-источников.

ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Приступая к работе в биохимической лаборатории, студент должен внимательно изучить настоящие правила и строго их выполнять.

Все опыты необходимо проводить в строгом соответствии с описанием, приведенным в практикуме, и с использованием средств индивидуальной защиты (халат, защитные очки, перчатки).

Прежде чем взять вещество для опыта, надо внимательно изучить этикетку на склянке.

Химические реактивы не брать руками! Нужно пользоваться специальными приспособлениями: шпателями, ложечками, лопаточками.

Запрещается пробовать на вкус или нюхать какие-либо вещества, пить воду из химической посуды.

При нагревании вещества или реакционной смеси над спиртовкой необходимо выполнять следующие условия:

а) правильно держать колбу или пробирку – ее отверстие должно быть направлено в сторону от себя и окружающих во избежание ожогов, которые могут произойти в результате выбрасывания или разбрызгивания жидкости;

б) не держать нагреваемую пробирку рукой, а пользоваться специальными держателями;

в) нагревание пробирки вести равномерно и осторожно, слегка встряхивая содержимое пробирки.

Особую осторожность следует соблюдать при работе с концентрированными растворами кислот и щелочей, огнеопасными и токсичными веществами:

а) растворы кислот и щелочей категорически запрещается набирать в пипетку ртом. Для этого необходимо пользоваться стеклянной пипеткой с грушей, автоматической пипеткой или цилиндром;

б) не выливать в раковину концентрированные растворы кислот и щелочей без предварительного их разбавления;

в) при работе с огнеопасными веществами (эфир, спирт, бензол и др.) опыты проводить под тягой и вдали от нагревательных приборов.

Не загромождать рабочее место посторонними предметами и не заставлять проходы лишней мебелью.

Склянки с легко воспламеняющимися и горючими жидкостями держать вдали от открытого огня и электронагревательных приборов.

При работе с газоотводной трубкой убирать спиртовку из-под нагреваемой пробирки с реакционной смесью нужно только после того, как нижний конец газоотводной трубки удален из жидкости.

При проведении опытов с горючими газами нельзя их поджигать, не убедившись в отсутствии поблизости гремучих смесей.

При возгорании водорастворимых органических веществ (например, этиловый спирт, ацетон) хорошим средством тушения является вода. При загорании жидкостей нерастворимых в воде (бензол, толуол и другие углеводороды), воду для тушения применять нельзя. В этих случаях очаг пожара надо накрыть асбестовым полотенцем, одеялом, засыпать песком или применить порошковый, или углекислотный огнетушитель.

При термических ожогах сразу обработать обожженные места 5%-ным раствором танина в 40%-ном этиловом спирте путем наложения ваты или марли, смоченных этим раствором.

При попадании кислоты на кожу необходимо немедленно обильно промыть пораженный участок водой, а затем наложить компресс из ваты или марли, смоченных 1%-ным раствором гидрокарбоната натрия.

При попадании растворов щелочей на кожу необходимо пораженный участок немедленно обильно промыть водой, а затем наложить компресс из ваты или марли, смоченные 1%-ным раствором уксусной или борной кислот.

При попадании брома на кожу пораженные места следует смачивать 1%-ным раствором карбоната натрия до исчезновения бурой окраски брома, а затем наложить компресс из ваты или марли, смоченные 5%-ным раствором мочевины.

При попадании на кожу фенола пораженные участки (наблюдается их побеление) следует растирать глицерином до появления нормальной окраски кожи, а затем промыть водой и наложить компресс из ваты или марли, смоченных глицерином.

При попадании в глаза раствора кислоты следует тщательно промыть его проточной струей воды, а затем 1%-ным раствором бикарбоната (гидрокарбоната) натрия.

При попадании в глаза раствора щелочи следует тщательно промыть их проточной струей воды, а затем 1%-ным раствором борной кислоты.

При порезах рук стеклом края ранки следует смазать 3%-ным спиртовым раствором йода. Если кровотечение не останавливается, то к ранке прикладывают ватный тампон, смоченный 10%-ным раствором хлорида железа (III).

При сильных поражениях пострадавшего необходимо доставить в медпункт.

Все опыты с токсичными и сильно пахнущими веществами следует проводить в вытяжном шкафу (под тягой).

Выделяющиеся при реакциях газы необходимо распознавать издали, слегка направляя ладонью ток воздуха к себе.

Остатки реактивов из пробирок, колб, стаканов и т.п. не следует сливать обратно в склянку с реактивами во избежание их загрязнения. С той же целью нельзя пипетку, которой набирают реактив, погружать в пробирку с исследуемым раствором или использовать пипетку для перемешивания.

По окончании работы рабочее место необходимо привести в порядок и сдать лаборанту.

1. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ЖИВОЙ МАТЕРИИ

Краткие теоретические сведения

Органические макромолекулы, синтезируемые живым организмом, называются биомолекулами. В качестве «сырья» для синтеза биомолекул используются либо «готовые» органические вещества, либо синтезируемые организмом. В состав биомолекул входят атомы тех же элементов, что и в состав неживой природы, но их содержание иное.

Поступление элементов в живой организм из окружающей среды обусловлено следующими факторами:

- 1) нахождением элемента в природе в доступной форме (обычно в виде водорастворимых солей);
- 2) способностью организма усваивать элемент;
- 3) способностью его накапливать.

В химии принято считать, что отбор элементов при формировании живых организмов сводится к отбору тех из них, которые способны к образованию прочных, но в то же время лабильных связей. Эти связи должны легко подвергаться гомолитическому или гетеролитическому разрыву, а также циклизации.

Состав живого организма можно разделить на вещественный (химические вещества) и элементный (химические элементы). Вещественный (химический) состав определяется набором химических веществ, из которых состоит организм (табл. 1, 2).

Таблица 1

Вещественный (химический) состав живых организмов

Химическое вещество	Состав
Органические вещества	Низкомолекулярные: липиды, углеводы (сахара) и т.п. Высокомолекулярные: белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты
Неорганические вещества	Вода, микроэлементы, макроэлементы, примесные элементы

Таблица 2

Вещественный состав организма человека

Вещество	W _i , %
Вода	60
Жиры (липиды)	19
Белки	15
Углеводы	0,4

В среднем химический состав определяется элементным составом, который можно вычислить по формуле:

$$W_i = m_i/m - \text{массовая доля,}$$

где m_i – масса i -го элемента,

m – суммарная масса элементов.

В живых организмах обнаружено около 80 химических элементов, но достоверно известно о выполняемых в организмах функциях лишь у 27 из них. Установление необходимости (эссенциальность) того или иного элемента для организма начинается с проведения элементного анализа, для чего обычно используются различные абсорбционные спектрометры.

Элементы по количественному содержанию в живом веществе подразделяются на следующие группы:

- органогенные (биофильные, биогенные) элементы, жизненно необходимые организму, концентрация каждого из которых превышает 1%. Это С, Н, N, О, на долю которых приходится 98% элементного состава всех живых организмов;
- макроэлементы (необходимые элементы), без которых не может осуществляться нормальная жизнедеятельность организма (концентрация более 0,001%). Это Na, K, Ca, Cl, P, S, Fe, Mg;
- микроэлементы (диапазон концентраций $10^{-3} \dots 10^{-5}\%$). Это Cu, Zn, Co, Mn, I, F, Mo и др. (по Вернадскому – Cu, Zn, Co, Мп, I);
- примесные элементы, поступающие из окружающей среды и постепенно в нем откладывающиеся (В, Al, V, Mo, Si).

Иными словами, если массовая доля элемента в организме $\omega_i \geq 0,001\%$, то данный элемент относится к макроэлементам (органогенам), если $\omega_i < 0,001\%$ – к микроэлементам.

В составе клеток человека содержатся:

органогены: О – 65-75%; С – 15-18%; Н – 8-10%; N – 1,5-3,0%;

макроэлементы: Mg, Na, Ca, Fe, K, S, P, Cl (суммарно \approx 4-5%);

микроэлементы: Zn, Cu, Co, I, F, Mn (суммарно \approx 0,1%).

Сходный элементный состав имеют клетки большинства животных (табл. 3); отличается состав клеток лишь у растений и микроорганизмов.

Таблица 3

Основные компоненты организма

Макрокомпоненты	Микрокомпоненты
Водные растворы	Витамины
Белки	Гормоны
Жиры (липиды)	Микроэлементы
Углеводы (сахара)	Протеиновые кислоты и основания

Мерой неорганических компонентов служит масса золы, образующейся от сжигания образца ткани при температуре, необходимой для превращения всех органических веществ в летучие компоненты.

Таблица 4

Биохимические функции органических соединений

№ п/п	Соединение	Функция
1	Нуклеиновые кислоты	Хранение и передача генетической информации
2	Белки	Продукты, а также «реализаторы» действия генов, ферменты (обладают каталитической активностью), структурные элементы организма
3	Полисахариды	Служат формой хранения «горючего» для жизнедеятельности, образуют внутриклеточные структурные компоненты
4	Липиды	Главные структурные компоненты мембран, а также запасная форма «горючего»

Биохимические свойства органических соединений определяются химическими свойствами функциональных групп молекул, входящих в данное соединение.

Все живые организмы состоят из одних и тех же белковых макромолекул, используемых организмом как «строительный материал», что говорит об общем источнике происхождения. Идентичность организмов каждого определенного вида сохраняется благодаря свойственному только ему набору нуклеиновых кислот и белков.

Основные реакции, протекающие в организме:

- гидролиз – реакция расщепления вещества водой;
- этерификация – реакция образования эфира;
- окислительно-восстановительные реакции (red/ox) – реакции сопровождающиеся с изменением степени окисления элемента в веществе, переносом электрона.

В таблице 5 приведены наиболее важные функциональные группы биоорганических веществ и соответствующие семейства веществ.

Таблица 5

Функциональные группы биоорганических веществ

Функциональная группа	Строение	Класс (семейство)
Гидроксильная	$R - O - H$	Спирты
Альдегидная	$R - C \begin{smallmatrix} \nearrow H \\ \searrow O \end{smallmatrix}$	Альдегиды
Карбонильная	$R - C \begin{smallmatrix} \nearrow R \\ \searrow O \end{smallmatrix}$	Кетоны
Карбоксильная	$R - C \begin{smallmatrix} \nearrow OH \\ \searrow O \end{smallmatrix}$	Карбоновые кислоты
Сложноэфирная	$R - C \begin{smallmatrix} \nearrow OR \\ \searrow O \end{smallmatrix}$	Сложные эфиры
Эфирная	$R^1 - O - R^2$	Простые эфиры
Аминогруппа	$R - NH_2$	Амины
Амидогруппа	$R - C \begin{smallmatrix} \nearrow NH_2 \\ \searrow O \end{smallmatrix}$	Амиды
Тиольная	$R - S - H$	Тиолы

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

КАЧЕСТВЕННЫЙ ЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БИООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Качественный анализ позволяет установить, какие элементы входят в состав исследуемого вещества. Наиболее распространенными элементами в биоорганических соединениях кроме углерода, являются водород, кислород, азот, сера, фосфор, галогены. Обычные методы качественного анализа неприменимы для анализа органических соединений. Для обнаружения углерода, азота, серы и других элементов необходимо органическое вещество разрушают, при этом исследуемые элементы переходят в неорганические соединения. Например, углерод переходит в оксид углерода (IV), водород – в воду, азот – в цианид натрия, сера – в сульфид натрия, галогены – в галогениды натрия. Далее открывают элементы обычными методами аналитической химии.

Цель работы: изучить и освоить методы обнаружения наиболее распространенных элементов в биоорганических соединениях.

Опыт № 1. Обнаружение углерода пробой на обугливание (тяга!)

Самой простой пробой на обнаружение углерода в органических веществах является обугливание. Некоторые органические вещества обугливаются (чернеют) при прокаливании, в других случаях обугливание наблюдается при действии водоотнимающих веществ, например, концентрированной серной кислоты.

Исследуемый материал: сахар (или мука, крахмал), бумага.

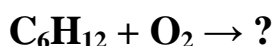
Реактивы: углеводород (гексан, бензол и др.), 1%-ный раствор серной кислоты.

Оборудование: фарфоровая чашка (или крышка от тигля), скальпель, спиртовка.

Опыт 1.1. Ход работы. Несколько крупинок сахара вносят на кончике скальпеля непосредственно в пламя спиртовки. После прокалывания сахара остается обуглившаяся масса черного цвета.

Опыт 1.2. Ход работы. На белой или фильтровальной бумаге (целлюлозе) делают надпись 1%-ным раствором серной кислоты. При высыхании раствора надпись невидима. При осторожном нагревании бумаги над пламенем горелки или над электрической плиткой участки бумаги, смоченные кислотой, обугливаются – надпись проявляется.

Опыт 1.3. Ход работы. В фарфоровую чашку (или на крышку тигля) наливают 1-2 мл гексана и поджигают его. Гексан горит сильно коптящим пламенем, часть углерода выделяется в виде сажи. Допишите уравнение реакции:



Напишите уравнения реакций и приведите вывод.

Опыт № 2. Обнаружение углерода и водорода окислением вещества оксидом меди (II)

Наиболее общим, универсальным методом обнаружения в органическом веществе углерода и одновременно с ним водорода является окисление его оксидом меди (II). При этом углерод превращается в оксид углерода (IV), а водород – в воду.

Исследуемый материал: сахароза (предварительно просушенная).

Реактивы: оксид меди (II) – порошок, известковая (или баритовая) вода – насыщенный раствор гидроксида кальция или гидроксида бария, безводный сульфат меди (II) – свежепрокаленный.

Оборудование: изогнутые газоотводные трубки с пробками для пробирок, вата, спиртовка.

Ход работы. В сухую пробирку с газоотводной трубкой (см. рис. 1) помещают 0,2-0,3 г сахарозы и 1-2 г порошка оксида меди (II). Содержимое пробирки тщательно перемешивают, сверху смесь засыпают слоем оксида меди (II) – примерно 1 г. В верхнюю часть пробирки (под пробку) помещают маленький комочек ваты, на которую насыпают немного безводного сульфата меди (II). Пробирку закрывают пробкой с газоотводной трубкой и закрепляют ее в лапке штатива с небольшим наклоном в сторону пробки.

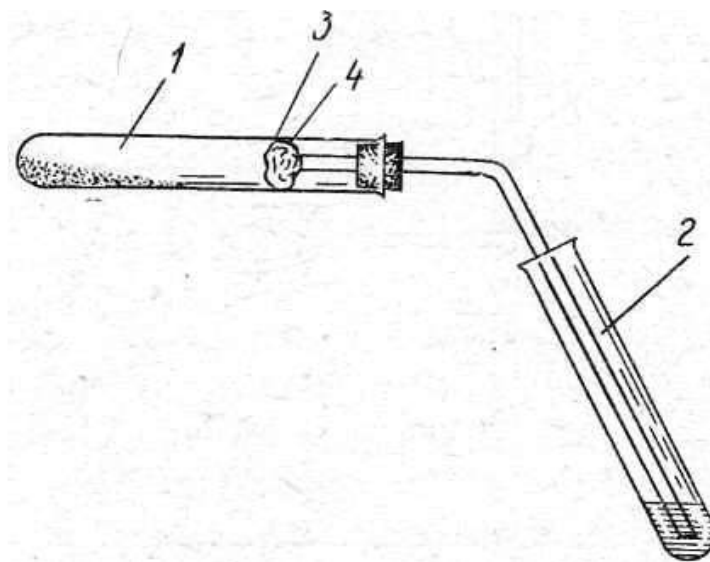
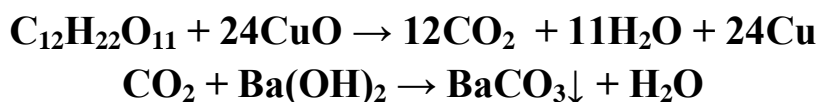


Рисунок 1. Прибор для одновременного обнаружения углерода и водорода в органическом веществе:

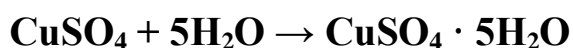
1 – сухая пробирка со смесью сахарозы и оксида меди (II); 2 – пробирка с известковой водой; 3 – вата; 4 – безводный сульфат меди.

Свободный конец газоотводной трубки опускают в пробирку с известковой (или баритовой) водой так, чтобы трубка почти касалась поверхности жидкости. После этого пробирку со смесью реагентов вначале прогревают по всей длине, а затем сильно нагревают ту часть, где находится реакционная смесь. Отметьте, что происходит с известковой водой. Почему изменяется цвет сульфата меди? Напишите уравнения следующих реакций:

- окисление сахарозы ($C_{12}H_{22}O_{11}$) оксидом меди (II) в избытке;
- взаимодействие продуктов, образующихся при окислении сахара, с известковой водой и с безводным сульфатом меди.



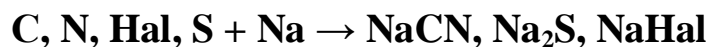
Водород определяется косвенным путем при определении углерода. В присутствии водорода на стенке пробирки или газоотводной трубки конденсируется вода, что можно констатировать, например, по посинению бесцветного порошка сульфата меди:



Сделайте вывод.

Опыт № 3. Определение серы и азота сплавлением с натрием

Для открытия серы, азот и галоидов исследуемое вещество сплавляют с металлическим натрием, благодаря чему происходит переход их в водорастворимое состояние:



Осторожно! Нитропарафины, органические азиды, диазоэфиры и некоторые алифатические полигалогениды реагируют с натрием со взрывом! Реакцию проводить в закрытом вытяжном шкафу и в защитных очках!

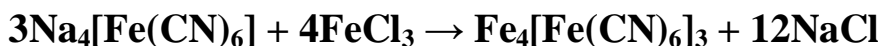
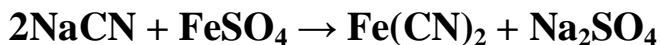
Реактивы: сульфаниловая кислота – 0,05 г; металлический натрий – 0,05 г; дистиллированная вода – 5 мл; сульфат железа двухвалентного; хлорное железо; 10%-ный раствор соляной кислоты; нитропруссид натрия; или 10%-ный водный раствор нитрата свинца.

Оборудование: штатив с лапкой – 1 шт., спиртовка – 1 шт., стакан ёмк. от 50 до 100 мл – 1 шт., воронка простая конусовидная – 1 шт., фильтр (синяя лента) – 2 листа.

Ход работы. В сухую, жаростойкую пробирку помещают сульфаниловую кислоту. Затем пробирку наклонно закрепляют в штативе и вносят в неё несколько выше слоя сульфаниловой кислоты чистый кусочек металлического натрия (*Осторожно! Легко воспламеняется!*) в виде полоски длиной от 3 до 4 мм или с пшеничное зерно. После этого натрий вместе с сульфаниловой кислотой расплавляют на остром пламени спиртовки. После этого содержимое пробирки нагревают до появления темного кроваво-красного окрашивания (или до сильного обугливания). Горячую пробирку осторожно опускают в стакан с дистиллированной водой (*Осторожно! Дальше от лица! Защитные очки!*). Пробирка растрескивается и сплав растворяется в воде. Водный раствор сплава фильтруют и фильтрат поровну разливают в три пробирки.

К фильтрату первой пробирки прибавляют от 2 до 3 капель 10%-ного раствора сульфата железа двухвалентного и от 2 до 3 капель 10%-ного раствора хлорного железа. Среда раствора должна быть щелочная (лакмусовая бумага), если нет, то добавляют от 3 до 4 капель щелочи. Раствор доводят до кипения и кипятят в течение 1 минуты, затем охлаждают до комнатной температуры, подкисляют соляной

кислотой (от 6 до 8 капель). Появление синей, или зеленовато-синей окраски, а затем выпадение осадка берлинской лазури указывает на наличие азота:



Желтая окраска раствора свидетельствует об отсутствии азота. Если вещество содержит много серы, берлинская лазурь может не образоваться. Если вещество содержит серу, то используют удвоенное количество щелочного металла, или исследуемые вещества на азот пропитывают нафталином, а затем подвергают разложению щелочным металлом. Этот способ позволяет обнаружить азот в исследуемом веществе массой менее 1 мг.

К фильтрату второй пробирки добавляют от 2 до 3 капель раствора нитропруссиды натрия. Появление красно-фиолетового или ярко-фиолетового окрашивания указывает на присутствие серы:



К фильтрату третьей пробирки добавляют от 2 до 3 капель раствора нитрата свинца. Появление черного осадка сульфида свинца указывает на содержание серы в исследуемом веществе.

Напишите уравнения реакции и приведите вывод.

Опыт № 4. Обнаружение галогенов (проба Бейльштейна)

При прокаливании органического вещества с оксидом меди (II) происходит его окисление. Углерод превращается в оксид углерода (IV), водород – в воду, а галогены (кроме фтора) образуют с медью летучие галогениды, которые окрашивают пламя в ярко-зеленый цвет. Реакция очень чувствительна. Однако следует иметь в виду, что и некоторые другие соли меди, например, цианиды, образующиеся при прокаливании азотсодержащих органических соединений (мочевина, производных пиридина, хинолина и др.), также окрашивают пламя.

Реактивы: хлороформ (или дихлорэтан, хлорбензол, бромбензол, иодоформ и др.), вода (или спирт, бензол и др.), соляная кислота.

Оборудование: медная проволока длиной около 10 см с петлей на конце, вставленная другим концом в корковую пробку.

Ход работы. Медную проволоку держат за пробку и прокаливают другой конец ее (петлю) в пламени горелки до прекращения окрашивания пламени и образования на поверхности черного налета оксида меди (II). Остывшую петлю смачивают хлороформом, налитым в пробирку, и снова вводят в пламя горелки. Сначала пламя становится светящимся (сгорает углерод), затем появляется интенсивное зеленое окрашивание.

Напишите уравнения следующих реакций:

- а) образование оксида меди (II);
- б) окисления хлороформа оксидом меди (II), имея в виду, что образуются хлориды меди (I) и (II).

Следует сделать контрольный опыт, используя вместо хлороформа вещество, не содержащее галоген (бензол, воду, спирт).

Для очистки проволоку смачивают соляной кислотой и прокаливают.

Опыт № 5. Открытие галогенов нитратом серебра

Реактивы: полихлорвиниловая пленка или полихлорвиниловая крошка 2,0 г; 10%-ный раствор нитрата серебра.

Оборудование: пробирки – 2 шт., спиртовка – 1 шт., пробиркодержатель – 1 шт.

Ход работы. В сухую, чистую, жаростойкую пробирку, снабженную газоотводной трубкой, укрепленной на пробке, помещают полихлорвиниловую пленку или крошку. Свободный конец газоотводной трубки погружают в 10%-ный раствор нитрата серебра. Затем пробирку укрепляют в пробиркодержателе и вносят в пламя спиртовки. Нагревают до полного разложения полихлорвинила. Образование белого, хлопьевидного осадка хлорида серебра, который темнеет на свету, указывает на наличие в пробе хлора.

Напишите уравнения протекающих реакций и приведите вывод.

Опыт № 6. Открытие фосфора

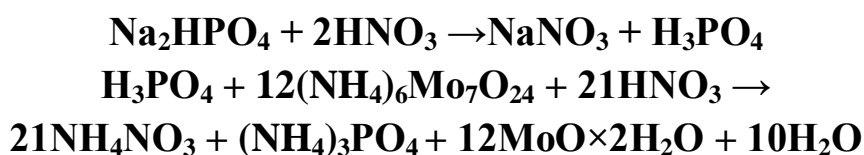
Наличие фосфора в фосфорорганических соединениях можно обнаружить при помощи раствора нитрата серебра, или молибдата аммония. Выпадает осадок желтого цвета.

Реактивы: метилфосфат или глицерофосфорная кислота – 0,5 мл; 10% раствор нитрата серебра от 1 до 2 мл; молибдат аммония – от 2 до 3 мл; нитрат аммония – от 0,5 до 1,0 г; азотная кислота концентрированная – от 1 до 2 мл.

Оборудование: пробирки – 2 шт., пробиркодержатель – 1 шт., спиртовка – 1 шт.

Ход работы. В первую пробирку помещают от 1 до 2 капель исследуемого вещества и от 5 до 7 капель нитрата серебра. Содержимое пробирки встряхивают. Появление желтого осадка указывает на наличие фосфора в исследуемом веществе. Напишите схему реакции.

В другую пробирку помещают от 2 до 3 капель исследуемого вещества, наливают 2 мл концентрированной азотной кислоты, (*Осторожно! Кислота!*) 0,5 г нитрата аммония, 2 мл раствора молибдата аммония. Содержимое пробирки осторожно нагревают до кипения. Раствор окрашивается в желтый цвет и постепенно выделяется желтый кристаллический осадок:



Напишите уравнения реакций и приведите вывод.

Примечание. Раствор молибдата аммония $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$ готовят следующим образом: смешивают 100 мл 6%-ного раствора молибдата аммония со 100 мл 10М раствора серной кислоты.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ ВАЖНЕЙШИХ КАТИОНОВ И АНИОНОВ ВНУТРИ КЛЕТОК И ВО ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЖИДКОСТЯХ ОРГАНИЗМА ЧЕЛОВЕКА

Цель работы: изучить методы обнаружения наиболее распространенных катионов и анионов, содержащихся внутри клеток и во внеклеточных жидкостях организма человека.

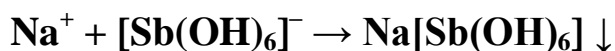
КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА КАТИОНЫ

Опыт № 1. Реакции иона натрия (Na^+)

Большинство солей натрия растворимы в воде, нерастворимы только соли, в которые входят крупные анионы.

Реакция с антимонатом калия

Ионы натрия в нейтральной или слабощелочной среде на холоде образуют при взаимодействии с антимонатом калия (гексагидроксостибат (V) калия) белый мелкокристаллический осадок, растворимый в горячей воде и частично в щелочах:



Кислоты разрушают реагент, выделяя белый аморфный осадок метасурьмяной кислоты HSbO_3 .

Предел обнаружения 30 мкг.

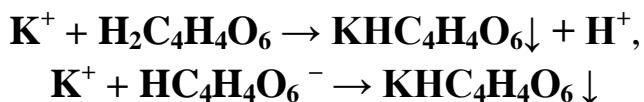
Выполнение реакции. В пробирку вносят 2-3 капли нейтрального или слабощелочного исследуемого раствора, прибавляют 2-3 капли раствора антимоната калия и потирают стенки пробирки стеклянной палочкой. В присутствии ионов натрия выпадает белый кристаллический осадок. Выпадение аморфного осадка не служит доказательством наличия ионов натрия. Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Опыт № 2. Реакции иона калия (K^+)

Большинство солей калия растворимы в воде, нерастворимы только соли, в которые входят крупные анионы.

1. Реакция с винной кислотой и гидротартратом натрия

Ионы калия в нейтральном или уксуснокислом растворе при взаимодействии с винной кислотой или ее кислой натриевой солью – гидротартратом натрия – образуют белый кристаллический осадок гидротартрата калия, растворимый в горячей воде, сильных минеральных кислотах и щелочах, но не растворимый в уксусной кислоте:



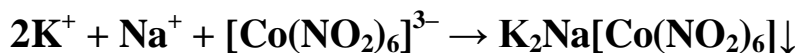
Предел обнаружения 0,2 мг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 2-3 капли исследуемого раствора, 4-5 капель раствора гидротартрата натрия или смесь раствора винной кислоты с равным объемом раствора ацетата натрия. При осторожном потирании стеклянной палочкой о стенки пробирки в присутствии ионов калия образуется белый осадок.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

2. Реакция с гексанитрокобальтатом (III) натрия

Ионы калия в нейтральной или уксуснокислой среде образуют с гексанитрокобальтатом (III) натрия $\text{Na}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$ желтый кристаллический осадок гексанитрокобальтата (III) калия натрия:



Щелочи и минеральные кислоты разлагают комплексный ион.

Предел обнаружения 1 мкг (в присутствии ионов серебра).

Выполнение реакции. В пробирку вносят 3-5 капель исследуемого нейтрального или уксуснокислого раствора, прибавляют 2-3 капли раствора гексанитрокобальтата (III) натрия. В присутствии ионов калия выпадает желтый осадок. Если осадок не образуется, то потирают стенки пробирки стеклянной палочкой.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Опыт № 3. Реакции иона магния (Mg^{2+})

Большинство соединений магния растворимо в воде. Не растворимы в воде гидроксид, карбонат, фосфат, фторид магния. Растворы солей магния бесцветны.

1. Реакция с гидрофосфат-ионом

Гидрофосфат-ион в присутствии аммиака и хлорида аммония (аммиачный буферный раствор, pH = 9) образует с ионами магния белый кристаллический осадок двойной соли, растворимый в минеральных кислотах и уксусной кислоте:



Предел обнаружения 10 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 2-3 капли исследуемого раствора, прибавляют по 2-3 капли раствора хлорида аммония и раствора хлороводородной кислоты и 3-4 капли раствора гидрофосфата аммония. При этом осадок не должен выпадать. Если осадок образуется, то продолжают добавлять по каплям раствор хлороводородной кислоты до растворения осадка. К прозрачному раствору прибавляют каплю фенолфталеина и по каплям – раствор аммиака, тщательно перемешивая содержимое пробирки после добавления каждой капли. Аммиак добавляют до тех пор, пока раствор не приобретет исчезающую розовую окраску. В присутствии ионов магния выпадает белый кристаллический осадок. Осаждение можно ускорить охлаждением раствора или потиранием стенок пробирки стеклянной палочкой.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

2. Реакция с 8-гидроксихинолином

Ионы магния в основной среде (pH = 9,5-12,7) образуют с 8-гидрокси-хинолином зеленовато-желтый кристаллический осадок внутрикомплексного соединения – оксихинолята магния. Оксихинолят магния растворим в минеральных кислотах и уксусной кислоте.

Предел обнаружения 0.1 мг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 2-3 капли исследуемого раствора, каплю раствора фенолфталеина и по каплям раствор аммиака до появления розовой окраски. Смесь нагревают до кипения и прибавляют по каплям спиртовой раствор 8-гидроксихинолина. В присутствии ионов магния образуется зеленовато-желтый осадок. Реакция требует точного соблюдения pH.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

3. Реакция с магнезоном I и магнезоном II

Для обнаружения ионов магния может быть использована способность нерастворимого в воде гидроксида магния адсорбировать некоторые органические растворители, причем их окраска в растворе и в адсорбированном состоянии различна. В качестве реагента применяют магнезон I (п-нитробензол-азорезорцин) или магнезон II (п-нитробензолазо-α-нафтол). В щелочном растворе эти красители имеют красную или красно-фиолетовую окраску. Адсорбируясь на поверхности гидроксида магния, они окрашивают ее в синий цвет.

Предел обнаружения: с магнезоном I – 0,9 мкг; с магнезоном II – 0,2 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 2-3 капли исследуемого раствора соли магния, 4-6 капель щелочного раствора реагента. Посинение раствора или выпадение синего осадка указывает на присутствие в исследуемом растворе ионов магния. В сильноокислой среде появляется желтая окраска. В этом случае необходимо нейтрализовать раствор щелочью.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Опыт № 4. Реакции иона кальция (Ca^{2+})

Ионы кальция образуют малорастворимые карбонат, сульфат, фосфат, оксалат и фторид. Водные растворы солей кальция бесцветны. Соли кальция окрашивают бесцветное пламя горелки в кирпично-красный цвет.

1. Реакция с сульфат-ионом

Катионы кальция образуют с сульфат-ионами белый осадок, заметно растворимый в воде:



Сульфаты щелочных металлов и серная кислота осаждают ионы кальция только из концентрированных растворов.

Предел обнаружения 3 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 1-2 капли исследуемого раствора и 1-2 капли раствора серной кислоты или сульфата щелочного

металла. Осадок выпадает через несколько минут. Из разбавленных растворов кристаллы выпадают в виде длинных игл.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

2. Реакция с оксалат-ионом

Оксалат-ионы образуют с ионами кальция белый кристаллический осадок:



Реакцию проводят в нейтральной или слабокислой среде в присутствии уксусной кислоты, в которой оксалат кальция не растворяется. Осадок CaC_2O_4 не растворим в растворе аммиака, но растворяется в разбавленных растворах минеральных кислот.

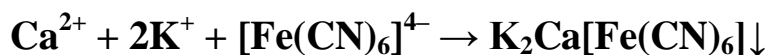
Предел обнаружения 1 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 2-3 капли исследуемого раствора, каплю раствора уксусной кислоты и 2-3 капли раствора оксалата аммония. В присутствии ионов кальция образуется белый осадок.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

3. Реакция с гексацианоферратом (II) калия

Ионы кальция при взаимодействии с гексацианоферратом (II) калия образуют белый кристаллический осадок, не растворимый в уксусной кислоте:



В присутствии ионов аммония осаждается менее растворимая соль переменного состава.

Предел обнаружения 25 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 3-4 капли исследуемого раствора, 2-3 капли раствора аммиака. Нагревают раствор до кипения и прибавляют 2-6 капель раствора гексацианоферрата (II) калия $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. В присутствии ионов кальция выпадает белый осадок.

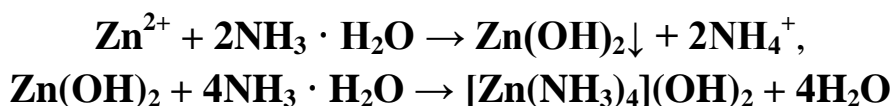
Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Опыт № 5. Реакции иона цинка (Zn^{2+})

Растворимыми в воде являются следующие соли цинка: хлорид, нитрат, сульфат и ацетат. Водные растворы солей цинка бесцветны.

1. Реакция с водным раствором аммиака

Аммиак, добавленный в малых количествах, образует с ионами цинка белый осадок гидроксида цинка, который растворяется в избытке реагента с образованием бесцветного аммиачного комплексного соединения:



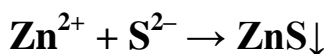
Предел обнаружения 30 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 5-6 капель исследуемого раствора, прибавляют по каплям водный раствор аммиака. В присутствии ионов цинка выпадает белый осадок. При дальнейшем добавлении раствора аммиака осадок растворяется с образованием бесцветного раствора.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

2. Реакция с сульфид-ионом

Сульфид-ионы в нейтральной, слабощелочной и слабокислой среде (pH=2-9) образуют с ионами цинка белый аморфный осадок сульфида цинка:



Свежеосажденный сульфид цинка растворим в разбавленных минеральных кислотах и не растворим в уксусной кислоте. Поэтому реакцию обнаружения цинка часто проводят в присутствии уксусной кислоты. При стоянии сульфид цинка превращается в другую модификацию, труднее растворяющуюся в минеральных кислотах.

Предел обнаружения 10 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 2-3 капли исследуемого раствора и прибавляют 1-2 капли свежеприготовленного раствора сульфида аммония или натрия. В присутствии ионов цинка образуется белый осадок.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

3. Реакция с дитизоном

Дитизон в нейтральном, щелочном и уксуснокислом растворах образует с ионами цинка внутрикомплексное соединение – дитизонат цинка. Эта соль хорошо растворяется в хлороформе, четыреххлористом углероде и других неполярных растворителях с окрашиванием раствора в красный цвет.

Предел обнаружения 0,025 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 3-4 капли исследуемого раствора, по 5-6 капель раствора ацетата натрия и уксусной кислоты и 1–2 см³ раствора дитизона в хлороформе или четыреххлористом углероде. Полученную смесь встряхивают. В присутствии ионов цинка органический слой окрашивается в красный цвет.

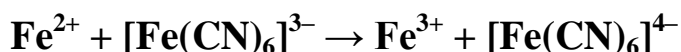
Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Опыт № 6. Реакции иона железа (Fe^{2+})

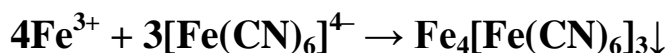
Ионы железа (II) образуют не растворимы в воде фосфат, сульфид, ферро и феррицианиды, а также некоторые основные соли. Растворы солей железа (II) окрашены в бледно-зеленый цвет, разбавленные растворы бесцветны.

1. Реакция с гексацианоферратом (III) калия (красная кровяная соль)

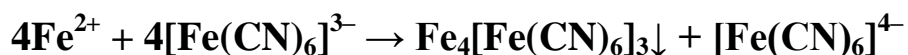
Ионы железа (II) реагируют с гексацианоферратом (III) калия $K_3[Fe(CN)_6]$ в кислой среде с образованием темно-синего осадка «турнбулевой сини». Ранее полагали, что состав осадка соответствует формуле $Fe_3[Fe(CN)_6]_2$ с переменным числом молекул воды. По современным представлениям состав этого осадка совпадает с составом «берлинской лазури», поскольку при его образовании осуществляется окислительно-восстановительная реакция с переносом электрона от «внешнесферного» железа (II) к «внутрисферному» железу (III):



Образующиеся ионы Fe^{3+} взаимодействуют с $[Fe(CN)_6]^{4-}$ -ионами, образуя осадок:



Суммарное уравнение реакции:



Различие в окраске «турнбулевой сини» и «берлинской лазури» объясняется тем, что в состав осадка входят ионы калия и этот состав меняется в зависимости от условий осаждения. Осадок «турнбулевой сини» не растворяется в кислотах, но разлагается в щелочной среде.

Предел обнаружения 0,5 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 2-3 капли исследуемого раствора, прибавляют 1-2 капли хлороводородной кислоты и 2-3 капли раствора гексацианоферрата (III) калия. В присутствии ионов железа (II) раствор окрашивается в синий цвет и выделяется синий осадок. Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

2. Реакция с диметилглиоксимом (реактив Чугаева)

Ионы железа (II) в аммиачной среде с диметилглиоксимом образуют растворимое в воде внутрикомплексное соединение красного цвета. При действии на образующееся соединение окислителей, например, перекиси водорода, ионы железа (II) окисляются до железа (III), и красная окраска исчезает.

Предел обнаружения 0,4 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 2-3 капли исследуемого раствора, 1-2 капли раствора диметилглиоксима и раствор аммиака до щелочной реакции. В присутствии ионов железа (II) появляется розово-красное окрашивание. Со временем окраска раствора исчезает, так как двухвалентное железо окисляется до трехвалентного.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АНИОНЫ

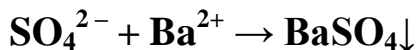
Опыт № 1. Реакция сульфат-иона (SO_4^{2-})

Сульфат-ион SO_4^{2-} является анионом серной кислоты. Почти все сульфаты растворяются в воде. Не растворимы в воде сульфаты щелочноземельных металлов и свинца, и довольно трудно растворяется

сульфат серебра. Анион SO_4^{2-} бесцветен, поэтому окраска растворов сульфатов определяется окраской катиона, входящего в состав соли.

Реакция с катионом бария

Сульфат-ионы при взаимодействии с растворимыми солями бария образуют белый мелкокристаллический осадок сульфата бария, не растворимый в минеральных кислотах (за исключением концентрированной серной кислоты):



Этим сульфат бария отличается от солей бария всех других анионов, что и используют при обнаружении SO_4^{2-} .

Предел обнаружения 10 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку помещают 3-4 капли анализируемого раствора, прибавляют равный объем концентрированной хлороводородной кислоты и 2-3 капли раствора хлорида бария. В присутствии сульфат-ионов выпадает белый кристаллический осадок.

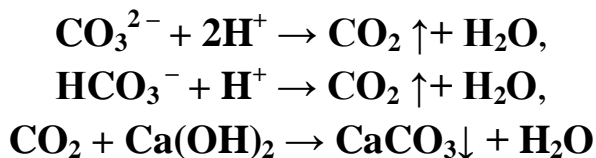
Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Опыт № 2. Реакции гидрокарбонат (HCO_3^-) и карбонат-ионы (CO_3^{2-})

Карбонат-ион CO_3^{2-} и гидрокарбонат-ион HCO_3^- являются анионами угольной кислоты, которая полностью разлагается на углекислый газ и воду при получении из солей. Карбонаты аммония, натрия, калия, рубидия и цезия растворимы в воде. Карбонаты других металлов мало-растворимы в воде. Карбонат-ионы в водных растворах бесцветны.

Реакция с кислотами

Разбавленные кислоты, в том числе и уксусная, при взаимодействии с карбонатами разлагают их. При этом выделяется углекислый газ, который можно обнаружить по помутнению известковой или баритовой воды:



Предел обнаружения 10 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку наливают 2-3 см³ исследуемого раствора (или 1-2 г твердого вещества) и 3-4 см³ хлороводородной кислоты, пробирку закрывают пробкой с газоотводной трубкой, конец который опускают в другую пробирку, содержащей 1-2 см³ известковой (или баритовой) воды. При наличии гидрокарбонат- или карбонат-ионов наблюдается выделение газа и помутнение известковой воды.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Опыт № 3. Реакции фосфат-иона (PO_4^{3-})

Фосфат-ион PO_4^{3-} является анионом ортофосфорной кислоты. В воде растворяются все фосфаты щелочных металлов и дигидрофосфаты щелочноземельных металлов. Остальные соли не растворимы в воде, но растворяются в минеральных кислотах, а многие также в уксусной кислоте.

1. Реакция с молибденовой жидкостью

Молибденовая жидкость (азотнокислый раствор молибдата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) из азотнокислых растворов фосфата при нагревании осаждает желтый осадок молибдофосфата аммония $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12}]$ (или $(\text{NH}_4)_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$), легко растворимый в щелочах и аммиаке и не растворимый в азотной кислоте:



Осадок молибдофосфата аммония растворяется в избытке фосфата, поэтому реагент необходимо добавлять в большом избытке.

Предел обнаружения 0,5 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 1-2 капли раствора фосфата, прибавляют 9-10 капель молибденовой жидкости и нагревают до 40–50°C. При этом раствор приобретает желтую окраску и из него выпадает желтый осадок.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

2. Реакция с магниезальной смесью

Гидрофосфат-ион при взаимодействии с магниезальной смесью (раствор хлорида магния, содержащий аммиак и хлорид аммония) образует белый мелкокристаллический осадок фосфата аммония – магния, растворимый в кислотах и не растворимый в аммиаке:



Предел обнаружения 5 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 3-4 капли исследуемого раствора, прибавляют столько же капель раствора магниевой смеси и перемешивают содержимое пробирки. В присутствии фосфат-ионов образуется белый кристаллический осадок.

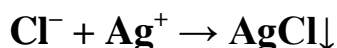
Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Опыт № 4. Реакции хлорид-иона (Cl^-)

Хлорид-ион Cl^- является анионом хлороводородной кислоты, относящейся к числу сильных минеральных кислот. Из хлоридов металлов малорастворимы в воде CuCl , AgCl , Hg_2Cl_2 , PbCl_2 , а также основные соли висмута, сурьмы и олова. Остальные хлориды растворимы в воде. В водных растворах хлорид-ион бесцветен.

1. Реакция с солями серебра

Растворимые соли серебра образуют с хлорид-ионами белый творожистый осадок, не растворимый в азотной кислоте и растворимый в растворах аммиака, тиосульфата натрия и т.д.:



Хлорид серебра растворим и в 10 % растворе карбоната аммония (отличие от бромида и йодида).

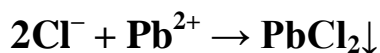
Предел обнаружения 10 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 3-4 капли исследуемого раствора и прибавляют по каплям раствор нитрата серебра. В присутствии хлорид-ионов выпадает белый творожистый осадок.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

2. Реакция с солями свинца

Растворимые соли свинца образуют с хлорид-ионами не растворимый в воде белый осадок:



Растворимость осадка увеличивается при нагревании и в присутствии избытка хлорид-ионов.

Предел обнаружения 25 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 2-3 капли исследуемого раствора и 3-4 капли раствора ацетата свинца. Раствор с осадком нагревают, перемешивая стеклянной палочкой, дают постоять несколько секунд. При медленном охлаждении раствора выделяются игольчатые кристаллы хлорида свинца.

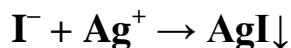
Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Опыт № 5. Реакции йодид-иона (I⁻)

Йодид-ион I⁻ является анионом сильной йодоводородной кислоты. Из йодидов не растворимы в воде соли серебра, ртути (I), свинца, а также меди (I). В водных растворах йодид-ион бесцветен, обладает выраженными восстановительными свойствами.

1. Реакция с солями серебра

Йодид-ионы осаждаются катионами серебра из водных растворов в виде светло-желтого творожистого осадка йодида серебра:



Осадок йодида серебра практически не растворим в воде, азотной кислоте и аммиаке (в отличие от AgCl и AgBr). Растворяется в растворах тиосульфата натрия и при большом избытке в растворе йодид-ионов.

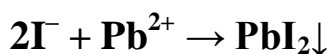
Предел обнаружения 1 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 3-4 капли исследуемого раствора, прибавляют 4-5 капель нитрата серебра. В присутствии йодид-ионов выпадает светло-желтый осадок.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

2. Реакция с солями свинца

Йодид-ионы образуют с катионами свинца желтый осадок йодида свинца:



Осадок растворяется при нагревании в воде, растворе уксусной кислоты. При охлаждении раствора йодид свинца выпадает в виде красивых золотистых кристаллов (реакция «золотого дождя»).

Предел обнаружения 10 мкг.

Выполнение реакции. В пробирку вносят 3-5 капель раствора соли свинца, прибавляют 3 капли раствора йодида. Выпадает желтый осадок йодида свинца. К смеси прибавляют несколько капель воды и уксусной кислоты и нагревают до растворения осадка. При охлаждении пробирки (погружение в холодную воду) выпадают красивые блестящие золотисто-желтые кристаллы йодида свинца.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

3. Реакция с концентрированной серной кислотой

Концентрированная серная кислота при действии на йодиды выделяет иодоводородную кислоту, которая окисляется серной кислотой до свободного йода. Серная кислота восстанавливается при этом до сернистого газа или сероводорода, например:



Образующийся йод выделяется в виде темно-серого осадка или окрашивает раствор в бурый цвет. При нагревании выделяются фиолетовые пары йода.

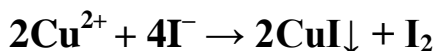
Предел обнаружения 0,1 мкг (в присутствии крахмала).

Выполнение реакции. В пробирку вносят 3-4 капли исследуемого раствора и прибавляют 4-5 капель концентрированной серной кислоты. В присутствии йодид-ионов раствор окрашивается в бурый цвет.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

4. Реакция с солями меди (II)

Соли меди (II) окисляют йодид-ион до элементарного йода, восстанавливаясь при этом до солей меди (I):



При этом выпадает осадок CuI цвета слоновой кости.

Предел обнаружения 0,1 мкг (в присутствии крахмала).

Выполнение реакции. В пробирку вносят 2-4 капли исследуемого раствора и прибавляют такое же количество соли меди (II). В присутствии йодид-ионов выпадает осадок йодида меди (I) и выделяется свободный йод.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Контрольные вопросы

1. Вывести простейшую формулу органического соединения, которое содержит 39,98% углерода, 6,60% водорода и 53,2% кислорода.
2. Вычислить молекулярную формулу углеводорода по данным состава: C – 85,7%, плотность по водороду 21.
3. При сгорании 2,3 г вещества образовалось 4,4 г оксида углерода (IV) и 2,7 г воды. Плотность паров этого вещества по воздуху 1,59. Какова молекулярная формула соединения?
4. Какова структурная формула этиленового углеводорода, если 11,2 г его при взаимодействии с избытком бромистого водорода превратилось в бромид, с положением брома у третичного углеродного атома (в количестве 27,4 г).
5. В результате сжигания 1,74 г органического соединения получено 5,58 г смеси CO_2 и H_2O . Количества веществ CO_2 и H_2O в этой смеси оказались равными. Определите молекулярную формулу органического соединения, если относительная плотность его по кислороду равна 1,8125.
6. Установите формулу гомолога этилена, 0,84 г которого полностью обесцвечивает 32 г раствора брома в хлороформе, в котором массовая доля брома 10%.
7. Анализ некоторого соединения, состоящего из кальция, углерода, водорода и кислорода, производили путем прокаливании навесок этого вещества на воздухе. При этом из 0,790 г вещества получили 0,280 г CaO , из 0,948 г – 1,056 г CO_2 , а из 0,869 г – 0,297 г H_2O . Найдите формулу соединения.
8. Напишите формулу спирта, при нагревании 37 г которого с серной кислотой получили этиленовый углеводород симметричного строения объемом 8,96 л, выход реакции составил 80%.
9. При взаимодействии 22 г предельной одноосновной кислоты с избытком раствора гидрокарбоната натрия выделилось 5,6 л газа (н.у.). Определите молекулярную формулу кислоты.
10. При гидролизе 14,8 г сложного эфира избытком раствора гидроксида натрия выделено 13,28 г ацетата натрия. Какова формула исходного эфира, если выход ацетата натрия 80%?

2. БЕЛКИ

Краткие теоретические сведения

Белки – это высокомолекулярные биологические полимеры, структурными (мономерными) звеньями которых являются α -аминокислоты. Аминокислотные остатки в белках соединены друг с другом пептидной связью, образование которой происходит за счет взаимодействия карбоксильной группы, стоящей у α -углеродного атома одной аминокислоты, и α -аминной группы другой аминокислоты с выделением молекулы воды. Мономерные звенья белков называют остатками аминокислот.

Белки имеют следующий усредненный элементный состав (в %):

- углерод – от 50,6 до 54,5;
- кислород – от 21,5 до 23,5;
- азот – от 15,0 до 17,6;
- водород – от 6,5 до 7,3;
- сера – от 0,3 до 2,5;
- минеральные вещества – в пределах 0-0,5.

Массовая доля белков в биологических объектах колеблется в широких пределах: молоке – 2,5-5,0%, мышечной ткани – 18-22%, содержанием куриного яйца – 12-14%, семенах зерновых культур (от сухой массы) – 12-40% (и более), картофеле – 0,7-4,6%, свекле, моркови и других корнеплодах 0,9-1,6%, фруктах и ягодах – 0,3-2,0%, грибах – 3-4%.

Все белки делятся на простые и сложные. Простые белки состоят только из остатков аминокислот. Их делят на 6 групп:

- альбумины и глобулины (широко распространенные кислые, глобулярные белки);
- гистоны и протамины (основные, относительно низкомолекулярные белки);
- глютелины и проламины (белки, встречающиеся только в растениях).

Сложные белки содержат в своем составе простые белки (апопротеины) и небелковые компоненты (простетические группы): углеводы, нуклеиновые кислоты, липиды, производные витаминов, ионы металлов, гем и др. Основные группы сложных белков и их простетические группы представлены в таблице 6.

Таблица 6

Сложные белки

Простетическая группа	Сложный белок	
	Групповое название	Примеры
Атомы (ионы) металлов	Металлопротеины	Ферритин, церулоплазмин, цитохромы
Фосфатные группы	Фосфопротеины	Казеин
Гемм	Хромопротеины (гемопротеины)	Миоглобин, гемоглобин, каталаза, пероксидаза
Флавопиримидины	Хромопротеины (флавопротеины)	Ферменты оксидоредуктазы
Моно- или олигосахариды	Гликопротеины	Белки-ингибиторы ферментов протеолиза
Триацилглицеролы и сложные липиды	Липопротеины	β -Липопротеин
РНК	Рибонуклеопротеины	Рибосомы
ДНК	Дезоксирибонуклеопротеины	Нуклеосомы

Белки имеют сложную структурную организацию, включающую четыре уровня:

- первичная структура – набор и последовательность аминокислот в полипептидной цепи;
- вторичная структура – способ укладки полипептидной цепи (α -спираль или β -структура складчатого слоя);
- третичная структура – форма белковой молекулы в трехмерном пространстве (глобулярная или фибриллярная);
- четвертичная структура (реализуется для некоторых белков) – ассоциация отдельных белковых субъединиц.

Виды вторичной и третичной структур, физико-химические свойства и биологические функции белков зависят от первичной структуры, т.е. от набора, количественного содержания и взаимного расположения остатков аминокислот, различающихся строением боковых радикалов.

Первичная структура белков представляет собой полипептидную цепь, содержащую, как правило, не менее 50 аминокислотных остатков протеиногенных аминокислот. Протеиногенными называются 20 *L*- α -аминокислот, включающихся в состав белка в процессе биологического синтеза. Десять из них в достаточном количестве синтезируются в организме человека и животных. Они называются заменимыми аминокислотами: глицин, аланин, серин, цистеин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аспарагин, глутамин, тирозин и пролин. Следующие 10 аминокислот являются незаменимыми: лизин, треонин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, фенилаланин, триптофан, гистидин и аргинин; из них две последние – условно незаменимые, так как они могут синтезироваться в живых организмах, но в недостаточном количестве.

Кроме белков, из аминокислот построены пептиды – соединения, содержащие до 20 аминокислотных остатков и полипептиды, содержащие от 20 до 50 аминокислотных остатков с молекулярной массой до 6 тыс. Да. Пептиды, полипептиды и белки отличаются не только количеством, строением, но и последовательностью соединения аминокислотных остатков, физико-химическими свойствами и функциями, выполняемыми в организме. Основными биологическими функциями белков являются: структурная, энергетическая, каталитическая, транспортная, сократительная, регуляторная, а также защитная.

Молекулярная масса белков варьирует от 6 тыс. до 1 млн. Да и более. Белки, различающиеся величиной молекулярной массы и, соответственно, размерами молекул, разделяют методом гельфильтрации (метод молекулярных сит).

Свойства белков обусловлены химической природой и физико-химическими свойствами радикалов, входящих в них остатков аминокислот. В водной среде белки образуют растворы, обладающие свойствами и коллоидных, и истинных растворов. Вследствие высокой молекулярной массы и большого размера частиц они проявляют свойства коллоидных растворов: белки не проходят через полупроницаемые мембраны (на этом основан метод очистки белков от низкомолекулярных примесей, который называется диализом) и рассеивают свет (эффект Тиндаля).

Растворы белков обладают также свойствами истинных растворов, так как образуются и существуют без внесения дополнительной энергии. Растворимость большинства белков в воде обусловлена наличием на их поверхности гидрофильных групп (гидроксильных, сульфгидрильных, амидных), принадлежащих полярным аминокислотам (серин, цистеин, аспарагин, глутамин и др.) и способных связывать воду. Неполярные аминокислоты, обладающие гидрофобными боковыми радикалами (аланин, валин, лейцин, фенилаланин и др.), снижают растворимость белка в воде. Вторым фактором, влияющим на количество связанной с белками воды (гидратная оболочка) и устойчивость белков в водных растворах, это заряд белковых молекул.

Суммарный заряд белка определяется соотношением отрицательно и положительно заряженных аминокислот на поверхности белковых молекул, а также величиной pH раствора. Отрицательный заряд могут приобретать в нейтральной и щелочной среде глутаминовая и аспарагиновая кислоты, в боковых радикалах которых содержатся свободные карбоксильные группы. Лизин, аргинин и гистидин в нейтральной и кислой среде заряжаются положительно благодаря наличию в их боковых радикалах, соответственно, аминогруппы, гуанидиновой группы и имидазольного кольца. Значение pH, при котором суммарный заряд белка является минимально возможным (нулевым), называется изоэлектрической точкой (ИЭТ, pI).

В изоэлектрической точке молекула белка электронейтральна (изоэлектрическое состояние), вследствие чего водный раствор белка при pH, равном pI, наименее устойчив и белок легче выпадает в осадок. Это явление применяется для определения изоэлектрической точки белка. Благодаря наличию заряда белки подвижны в электрическом поле. Метод исследования белков, основанный на различной скорости движения белковых частиц, различающихся величиной заряда при определенном значении pH, называется электрофорезом.

Одним из фундаментальных свойств белка является способность к денатурации. Денатурация – это нарушение нативной (природной) структуры, вызываемое действием физических и химических факторов и приводящее к изменению физико-химических свойств белка и утрате его биологических функций (структурной, транспортной,

каталитической и др.). Первичная структура денатурированных белков не изменяется, но пептидные связи становятся более доступными действию протеолитических ферментов. В сложных белках при денатурации ослабляются связи с простетическими группами.

Денатурированные белки хуже растворяются в воде, чем нативные. Из растворов белки могут осаждаться при нагревании, действии солей, кислот, спиртов и т.д. Водоотнимающие средства (соли аммония, щелочных и щелочноземельных металлов, спирт, ацетон) вызывают обратимую денатурацию белков и применяются для выделения и фракционирования белков методом высаливания. После очистки от осаждающих агентов и растворения в воде такие белки вновь приобретают присущие им нативные свойства.

Температура выше 50°C, минеральные и органические кислоты, а также соли тяжелых металлов и другие агенты, вызывающие ковалентную модификацию аминокислотных остатков, необратимо денатурируют белки. Необратимая денатурация применяется для дезинфекции, инактивации белков (в частности, обладающих токсическими, ферментными или ингибиторными свойствами), качественного обнаружения белков в растворах и их депротеинизации, т.е. получения безбелковых растворов.

Способы обнаружения и количественного определения белков в биологических объектах и продуктах питания, а также выделения их из тканей и биологических жидкостей основаны на физических и химических свойствах этих соединений.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ

Цель работы:

- 1) сформировать знания о строении, химических основах структурной организации белковых молекул;
- 2) изучить свойства растворов белков;
- 3) изучить осаждение белков из растворов под влиянием различных факторов.

Белки обладают высокой молекулярной массой, что обуславливает выраженный коллоидный характер их водных растворов. Основными факторами агрегативной устойчивости белковых коллоидов являются гидратация частиц и возникновение одноименного электрического заряда. Следовательно, выпадению белков из растворов способствуют уменьшение гидратации коллоидных частиц (разрушение гидратной оболочки) и значительное снижение или снятие их заряда. Выделение индивидуальных белков является ступенчатым процессом, так как на первых этапах очистки фракции они содержат множество примесей. На каждой ступени разделения должна получаться фракция, более богатая необходимым веществом, чем предыдущая. Такой процесс часто называют фракционированием. На каждой стадии разделения белок находится либо в виде раствора, либо в виде осадка.

Белки вступают во взаимодействие со многими соединениями (ионами металлов, кислотами и др.), а также конкурируют с ними за молекулы растворителя (воды). Во многих случаях результатом указанных процессов является осаждение белков. Реакции осаждения белков можно разделить на две группы:

- 1) обратимое осаждение белков (солями аммония, нейтральных щелочных и щелочноземельных металлов, спиртов);
- 2) необратимое – солями тяжелых металлов, нагреванием, минеральными и органическими кислотами, а также другими реагентами, вызывающими ковалентную модификацию белков.

Эффективно осаждает белки трихлоруксусная кислота, поэтому ее наиболее часто применяют для удаления белка из белковых растворов.

Опыт № 1. Осаждение белков органическими растворителями

Спирт (а также ацетон и другие органические растворители) дегидратирует белки. В результате происходит агрегация белковых частиц и их осаждение. Если в растворе белка присутствуют соли (хлорид натрия и др.), осадок образуется быстрее вследствие снятия заряда с коллоидных частиц. Реакция осаждения белков спиртом, проводимая на холоде и при непродолжительном его контакте с белком, обратима.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1%-ный раствор желатина.

Реактивы: этиловый спирт, ацетон, хлорид натрия кристаллический.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Выполнение реакции. В пробирку наливают около 2 см³ раствора яичного белка, добавляют несколько кристалликов хлорида натрия и по каплям добавляют этиловый спирт до выпадения хлопьев белка. После осаждения хлопьев надосадочную жидкость сливают, к осадку доливают воду и наблюдают растворение белка. Приведите вывод.

Опыт № 2. Осаждение белков солями тяжелых металлов

Соли тяжелых металлов (меди, свинца, ртути и др.) необратимо осаждают белки из растворов, что объясняется следующими причинами: образованием нерастворимых в воде белково-металлических комплексных соединений, разрушением вторичной, третичной и четвертичной структуры белка вследствие образования прочных связей с SH-группами остатков цистеина. Такой белок утрачивает свои биологические свойства. Свойства белков связывать тяжелые металлы широко используются в медицинской и ветеринарной практике. Белки применяются как противоядие при отравлениях солями ртути или свинца.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1%-ный раствор желатина.

Реактивы: 1%-ный раствор сульфата меди, 5%-ный раствор ацетата свинца.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Выполнение реакции. В пробирку наливают около 2 см³ раствора яичного белка и прибавляют медленно по каплям раствор соли тяжелого металла (1%-ный раствор сульфата меди или 5%-ный раствор ацетата свинца) и наблюдают коагуляцию белка. Выпавшие хлопья белка при добавлении воды не растворяются. Добавление избытка сульфата меди и ацетата свинца приводит к растворению (пептизации) первоначально образовавшегося осадка, что объясняется адсорбцией на белковых частицах ионов металла и их перезарядкой. Приведите вывод.

Опыт № 3. Осаждение белков при нагревании

Почти все белки денатурируют при нагревании (50-55°C и выше). Механизм тепловой денатурации связан с перестройкой структуры белковой молекулы, в результате которой белок теряет свои нативные свойства, уменьшается его растворимость (уменьшение гидрофильных свойств ведет к нарушению гидратной оболочки). Присутствие солей и концентрация водородных ионов играют важную роль в выпадении в осадок денатурированного при нагревании белка.

Наиболее полное и быстрое осаждение происходит в изоэлектрической точке белка, то есть при такой величине pH, при которой коллоидные частицы белка являются наименее устойчивыми. Поэтому для полного осаждения белка при нагревании следует создавать реакцию среды, соответствующую его изоэлектрической точке.

Белки, обладающие кислыми свойствами, осаждают в слабокислой среде, белки, обладающие щелочными свойствами, – в слабощелочной. В сильнокислых и сильнощелочных растворах денатурированный при нагревании белок не выпадает в осадок, так как частицы белка перезаряжаются (или происходит усиление имеющегося заряда) и несут в первом случае положительный, во втором – отрицательный заряд. Это повышает их устойчивость в растворе в результате электростатических сил отталкивания. Поэтому в сильнокислых и сильнощелочных растворах белки обычно не выпадают в осадок при нагревании. Однако в сильнокислых растворах белки могут коагулировать

при добавлении достаточного количества какой-либо нейтральной соли. Степень влияния ионов нейтральных солей на осаждаемость белков зависит от их способности адсорбироваться на частицах белка. Адсорбированные ионы солей (если они противоположны по знаку заряду коллоидной частицы) нейтрализуют заряд частицы. Наступает момент, когда силы притяжения между молекулами превышают силы отталкивания – и белок выпадает в осадок.

Исследуемый материал: раствор яичного белка.

Реактивы: 1%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный раствор гидроксида натрия, насыщенный раствор хлорида натрия.

Оборудование: пробирки, капельницы, спиртовка.

Ход работы. В 5 пробирок наливают по 5 капель раствора яичного белка (без хлорида натрия).

В 1-ой пробирке нейтральный раствор нагревают до кипения. Жидкость мутнеет, поскольку разрушаются водные оболочки вокруг молекул белка и происходит укрупнение его частиц. Мицеллы белка несут заряд и удерживаются во взвешенном состоянии.

Во 2-й пробирке раствор белка нагревают до кипения и прибавляют 1 каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты (для слабого подкисления). Через некоторое время выпадает хлопьевидный осадок белка. Частицы белка теряют заряд и приближаются к изоэлектрическому состоянию.

В 3-ю пробирку добавляют 5 капель 1%-ного раствора уксусной кислоты (для получения сильноокислой реакции среды). При кипячении жидкости осадка не образуется, поскольку белковые мицеллы перезаряжаются и несут положительный заряд, что повышает их устойчивость.

В 4-ю пробирку добавляют 2 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия, создавая щелочную среду. При кипячении жидкости осадка не образуется, поскольку в щелочной среде отрицательный заряд на частицах белка увеличивается.

В 5-ю пробирку наливают 5 капель 15%-ного раствора уксусной кислоты и 2 капли насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают. Выпадает белый хлопьевидный осадок белка, так как частицы белка теряют заряд вследствие взаимодействия белка с разноименно заряженными ионами хлористого натрия.

Оформление работы. Записать в табл. 7 результаты осаждения белков, при кипячении в различных средах и в каждом случае указать причину появления или отсутствия осадка белка. Приведите вывод.

Таблица 7

Результаты опытов по осаждению белков при нагревании

Щелочная среда	Нейтральная среда	Слабокислая среда	Сильнокислая среда	Сильнокислая среда + электролит

Опыт № 4. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Концентрированные минеральные кислоты (кроме фосфорной кислоты) вызывают необратимое осаждение белков из растворов. Осаждение белка объясняется явлениями дегидратации частиц, уменьшения заряда, разрушения электростатических связей и т.д. Избыток минеральных кислот (за исключением азотной) растворяет выпавший осадок белков вследствие их гидролиза.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1%-ный раствор желатина.

Реактивы: концентрированные растворы азотной, серной и соляной кислот.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Выполнение реакции. В три пробирки осторожно наливают по 0,5 см³ следующих концентрированных кислот: в первую – серную, во вторую – соляную и в третью – азотную. Во всех пробирках осторожно наслаивают на кислоту по 1 см³ раствора яичного белка. На границе двух жидкостей появляется осадок белка в виде небольшого белого кольца. Каждую пробирку осторожно встряхивают. В первой и второй пробирках осадок растворяется; в третьей – с азотной кислотой – осадок при встряхивании не исчезает. Реакция используется для качественного определения белка в биологических средах. Приведите вывод.

Опыт № 5. Осаждение белков органическими кислотами

Трихлоруксусная кислота (ТХК, CCl_3COOH) является специфическим реактивом на белок и широко используется в исследовательской практике. ТХК осаждает только белки и не действует на продукты их расщепления – пептиды, аминокислоты и др. ТХК используют для полного удаления белков из биологических жидкостей (сыворотки крови, молока и др.). При этом продукты расщепления белков остаются в растворе. Реакция имеет большое значение для отдельного определения белкового и небелкового азота.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1%-ный раствор желатина.

Реактивы: 5% раствор трихлоруксусной кислоты.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Выполнение реакции. В пробирку наливают 2-3 см^3 раствора белка и добавляют несколько капель 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Наблюдают выпадение осадка белка. Приведите вывод.

Опыт № 6. Осаждение белков алкалоидными реактивами

Реакции осаждения белков такими реагентами, как пикриновая кислота, танин, железосинеродистый калий, обуславливаются тем, что белки, как и алкалоиды, имеют аминогруппы, которые в нейтральной и кислой среде приобретают положительный заряд. Перечисленные реагенты образуют с ними нерастворимые в воде солеобразные соединения. Поскольку большинство белков являются кислыми, эти реакции необходимо проводить в кислой среде, так как в данных условиях эти белки перезаряжаются и переходят из анионов в катионы, с которыми взаимодействуют реагенты на алкалоиды.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1%-ный раствор желатина.

Реактивы: 1%-ный раствор уксусной кислоты, насыщенный раствор пикриновой кислоты, 10%-ный раствор танина, 5%-ный раствор железосинеродистого калия.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Выполнение реакции. В три пробирки наливают по 2 см^3 раствора белка и подкисляют их 2-3 каплями 1%-ного раствора уксусной кислоты.

Затем в одну пробирку вносят 5-6 капель насыщенного раствора пикриновой кислоты, в другую – 2-3 капли 10%-ного раствора танина, в третью – 3 капли 5%-ного раствора железосинеродистого калия, взбалтывая после добавления каждой капли. Во всех пробирках выпадает осадок белка. Приведите вывод.

Опыт № 7. Высаливание белков

Высаливание – это широко используемый способ выделения белков из различных биологических объектов, основанный на осаждении белков водоотнимающими средствами. Применяется при получении ферментов, а также для фракционного разделения белков. Альбумины и глобулины являются наиболее распространенными в природе белками. Они содержатся в крови человека, молоке, белке куриного яйца, мышечной ткани, растениях и т.д. В тканях и биологических жидкостях альбумины и глобулины обычно встречаются вместе. Их выделение и разделение основано на различной растворимости в воде и солевых растворах. Так, глобулины выпадают в осадок в полунасыщенном растворе сульфата аммония, а альбумины – в насыщенном растворе. Это объясняется тем, что у глобулинов более высокая молекулярная масса и они менее гидратированы, чем альбумины.

Материалы: молочная сыворотка, яичный белок, обезжиренный мясной фарш.

Реактивы насыщенный раствор сульфата аммония, сульфат аммония кристаллический; 10%-ный раствор гидроксида натрия; 10%-ный раствор хлорида натрия; 1%-ный раствор сульфата меди.

Оборудование: штатив с пробирками, воронка, бумажный фильтр.

Ход определения (вариант А). В пробирку наливают 2-3 см³ молочной сыворотки или раствора яичного белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Наблюдают выпадение белого хлопьевидного осадка глобулинов. Мутную жидкость по истечении 5-7 мин. фильтруют через сухой складчатый фильтр. К прозрачному фильтрату при перемешивании добавляют избыток сульфата аммония (в порошке) до прекращения его растворения. Появляется муть или хлопья выпадающих в осадок альбуминов. Раствор фильтруют, отбирают 2-3 см³ фильтрата и проводят биуретовую реакцию.

Отрицательная реакция указывает на отсутствие белков в фильтрате и полноту осаждения. Осадок альбуминов вместе с фильтратом переносят в пробирку и растворяют в 4-5 см³ воды, взбалтывая содержимое пробирки. Раствор альбуминов отфильтровывают и проводят с ним биуретовую реакцию.

Ход определения (вариант В). Обезжиренный мясной фарш в количестве 40-50 г смешивают с 80-100 см³ 10%-ного раствора хлорида натрия и оставляют стоять 15-20 мин. при частом перемешивании.

Отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр или через двойной слой марли окрашенную в красный цвет жидкость. В растворе главным образом содержатся растворимые белки ткани – мышечные альбумины и глобулины.

Отбирают в пробирку 2-3 см³ белкового раствора, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Наблюдают выпадение белого хлопьевидного осадка глобулинов. Мутную жидкость после 5-7 мин. отстаивания фильтруют через сухой складчатый фильтр. К фильтрату добавляют при перемешивании избыток сульфата аммония (в порошке) до прекращения его растворения.

Появляется муть или хлопья выпадающих в осадок альбуминов. Раствор фильтруют, берут 2-3 см³ фильтрата и проводят биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белков в фильтрате и полноту осаждения.

Осадок альбуминов вместе с оставшимся фильтратом переносят в пробирку и растворяют в 4-5 см³ воды, взбалтывая содержимое пробирки. Раствор альбуминов отфильтровывают и проводят с ним биуретовую реакцию.

Приведите вывод.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

МЕТОДЫ КАЧЕСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОСТЫХ БЕЛКОВ

Цель работы:

- 1) сформировать знания о строении, химических основах структурной организации белковых молекул;
- 2) изучить качественные реакции на белки и аминокислоты;
- 3) определить изоэлектрическую точку белка.

Качественные реакции на белки и аминокислоты

Присутствие белка в растворах можно обнаружить с помощью качественных цветных реакций, обусловленных наличием в белке остатков аминокислот, их специфических групп и пептидных связей. Существуют универсальные цветные реакции, т.е. на все белки, например, биуретовая и нингидриновая, и специфические, т.е. на определенные функциональные группы аминокислотных остатков (реакции Миллона, Фоля, ксантопротеиновая и др.).

Цветные реакции применяются для качественного и количественного определения белка и аминокислот.

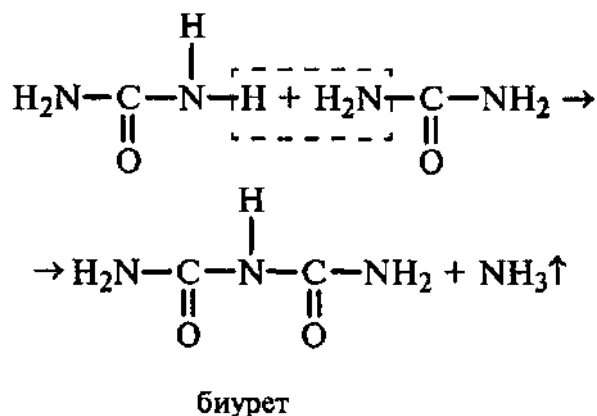
Опыт № 1. Универсальные реакции на белки

1. Биуретовая реакция

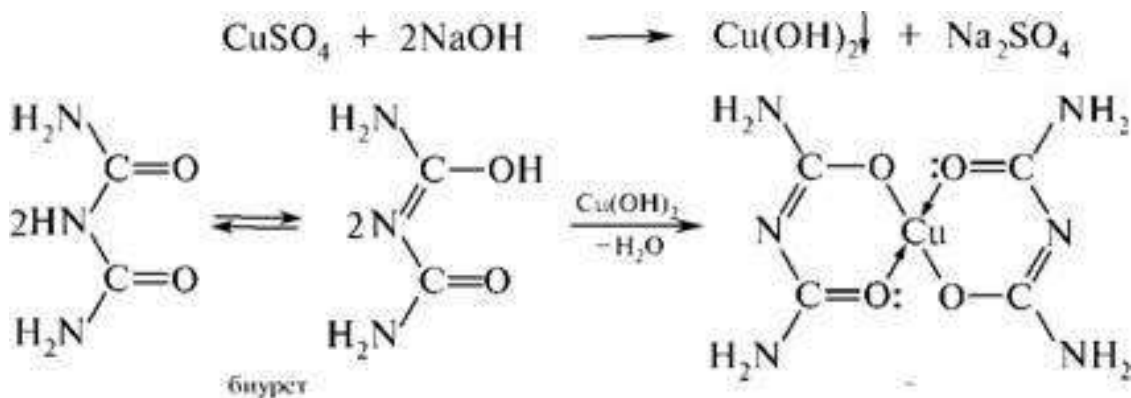
Эта реакция открывает в белке пептидную связь ($-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$). В результате взаимодействия в щелочной среде пептидных связей белка с ионами меди (II) образуется комплексное соединение, окрашенное в сине-фиолетовый цвет (с красным или с синим оттенком). Интенсивность окраски зависит от количества белка в растворе. Это позволяет использовать данную реакцию и для количественного определения белка. Цвет окрашенных растворов зависит от длины полипептидной цепи. Белки дают сине-фиолетовое окрашивание, а продукты их гидролиза (поли- и олигопептиды) – красную или розовую окраску. Биуретовую реакцию дают не только белки, пептиды и полипептиды, но и биурет ($\text{NH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), оксамид ($\text{NH}_2-\text{CO}-\text{CO}-\text{NH}_2$), гистидин.

Биуретовую реакцию способны давать вещества, имеющие не менее двух пептидных связей.

Реакция получила свое название от производной мочевины – биурета, молекула которого образуется при нагревании мочевины с отщеплением аммиака.



В щелочной среде биурет переходит в енольную форму, поэтому биуретовая реакция протекает по следующей схеме:



Енольная форма полипептида, образованная в сильнощелочной среде при диссоциации ОН-групп, дает отрицательный заряд, с помощью которого кислород взаимодействует с медью, и возникает ковалентная связь. Кроме того, медь образует дополнительные координационные связи с атомами азота, участвующими в пептидной связи.

Степень окраски биуретового комплекса зависит от концентрации белка и количества медной соли в растворе.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1%-ный раствор желатина.

Реактивы: 10%-ный раствор NaOH, 1%-ный раствор сульфата меди.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Проведение реакции. В две пробирки с 1 мл 1%-ного раствора яичного белка и желатина прибавляют 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и 5 капель 1%-ного раствора сульфата меди. При перемешивании содержимое пробирки приобретает фиолетовый цвет. Приведите вывод. Результаты этой и всех других цветных реакций на белки и аминокислоты вносят в табл. 8.

Таблица 8

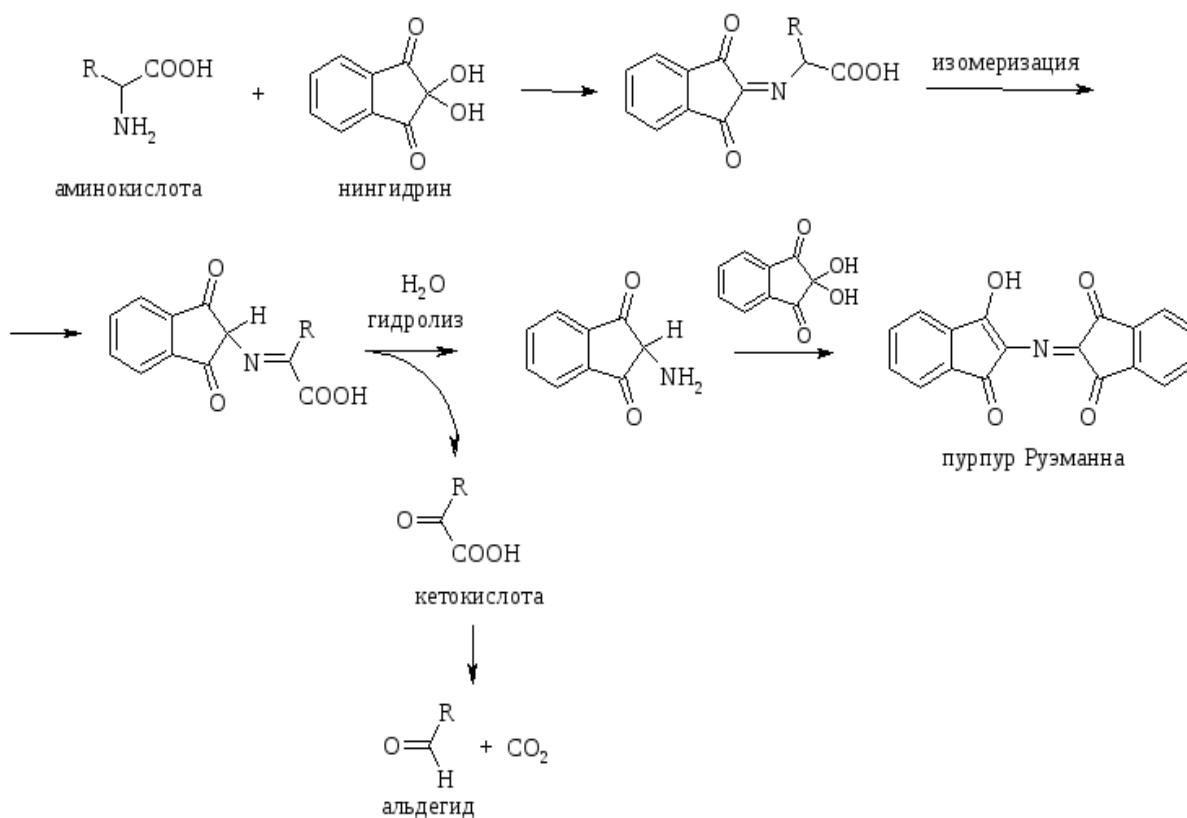
Цветные реакции на белки и аминокислоты

Исследуемый материал	Окраска продукта	Реагирующая группа
<i>Биуретовая реакция</i>		
Вода		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		
Аминокислота		
<i>Нингидриновая реакция</i>		
Вода		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		
Аминокислота		
<i>Ксантопротеиновая реакция</i>		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		
Фенол		
<i>Реакция Фоля (на слабосвязанную серу)</i>		
Вода		
Казеин		
Яичный белок		
Желатин		

2. Нингидриновая реакция

Белки, полипептиды, а также свободные аминокислоты при кипячении с водным раствором нингидрина дают синее, сине-фиолетовое или розово-фиолетовое окрашивание. В результате взаимодействия аминокислот с нингидрином происходит их декарбоксилирование и дезаминирование. Далее восстановленный нингидрин вступает в реакцию с одной молекулой невосстановленного нингидрина и с аммиаком, образуя окрашенный в сине-фиолетовый цвет комплекс. Пролин и оксипролин дают с нингидрином желтую окраску.

Нингидрин образует с аминокислотами соединения, называемые имидами или основаниями Шиффа. Эти соединения обладают высокой реакционной способностью. Дальнейшее их превращение приводит к промежуточному амину, который может реагировать со второй молекулой нингидрина, давая соединение, окрашенное в сине-фиолетовый (пурпурный) цвет, сине-фиолетовый (пурпурный) Руэмана:



Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1%-ный раствор желатины.

Реактивы: нингидрин, 1%-ный водный раствор.

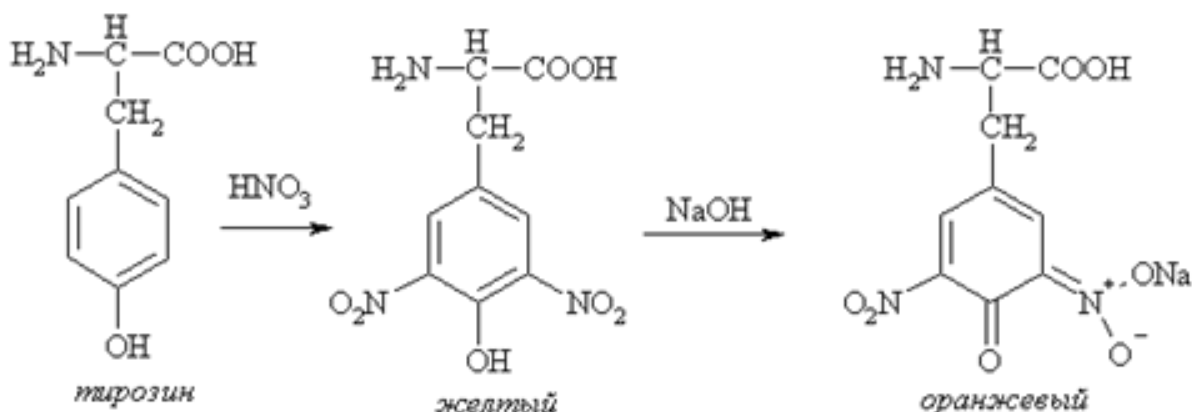
Оборудование: пробирки, капельницы.

Проведение реакции. В две пробирки с 1 мл раствора яичного белка и желатина добавляют по 5 капель 1%-ного раствора нингидрина и доводят до кипения. В пробирках появляется розово-фиолетовое окрашивание, а с течением времени раствор синее. Приведите вывод.

Опыт № 2. Специфические реакции на аминокислоты

1. Ксантопротеиновая реакция

Эта реакция основана на способности ароматических аминокислот (тирозина, триптофана, фенилаланина) легко нитроваться с образованием соединений, окрашенных в желтый цвет (на греческом языке «ксантос» – желтый). При подщелачивании окраска усиливается. Так, тирозин при нитровании переходит в динитротирозин, который под влиянием щелочи переходит в соль, имеющую хиноидную структуру:



Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1%-ный раствор желатина.

Реактивы: концентрированная азотная кислота, 10%-ный раствор гидроксида натрия.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Проведение реакции. В одну пробирку наливают 1 мл 1%-ного раствора яичного белка, а во вторую – 1 мл 1%-ного раствора желатина. Затем в обе пробирки добавляют по 5 капель концентрированной азотной кислоты и осторожно кипятят. В первой пробирке появляется осадок желтого цвета, а во второй – очень слабое окрашивание. После охлаждения в каждую пробирку прибавляют приблизительно 10-15 капель 20% раствора гидроксида натрия. При наличии в белке ароматических аминокислот в пробе образуется желтый или оранжевый осадок вследствие образования натриевой соли динитротирозина. Приведите вывод.

2. Реакция на триптофан

Реакция основана на способности триптофана вступать в кислой среде во взаимодействие с альдегидами, образуя при этом окрашенные продукты конденсации.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1%-ный раствор желатина.

Реактивы: 10%-ный раствор сахарозы, концентрированная серная кислота.

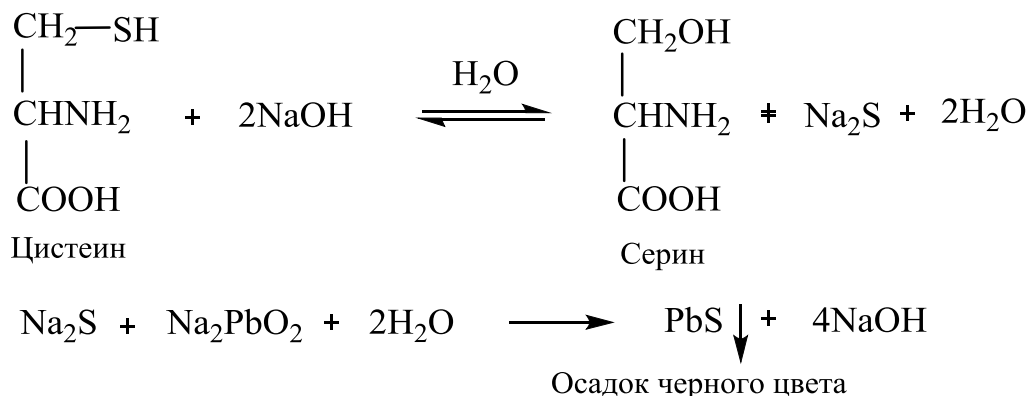
Оборудование: пробирки, капельницы.

Проведение реакции. В одну пробирку наливают около 1 см³ 1%-ного раствора яичного белка, а в другую – 1 см³ 1%-ного раствора желатина. В обе пробирки добавляют по три капли 10%-ного раствора сахарозы, после чего пипеткой наслаивают по 0,5 см³ концентрированной серной кислоты. На границе раздела жидкостей в пробе, содержащей триптофан, появляется красно-фиолетовое окрашивание в виде кольца, при отсутствии триптофана окрашивания не происходит.

Сущность реакции сводится к тому, что под действием серной кислоты происходит гидролиз сахарозы до моносахаридов, которые при нагревании превращаются в 5-гидроксиметилфурфурол. Триптофан, реагируя с 5-гидрокси-метилфурфуролом, образует комплекс, окрашенный в красно-фиолетовый цвет. Приведите вывод.

Реакция на цистеин (реакция Фоля)

Применяется для обнаружения слабосвязанной серы в молекуле цистеина. Этой реакцией открывают в белках радикалы цистеина, содержащие как свободные -SH (тиольную группу), так и окисленные с образованием дисульфидных (-S-S-) связей цистина. Метионин в этой реакции не выявляется. При нагревании белка, содержащегося в молекуле остатки цистеина и цистина, с концентрированным раствором щелочи и ацетатом (или другой растворимой солью) свинца (реактив Фоля) образуется бурое или черное окрашивание. Это объясняется тем, что под действием щелочи от радикалов цистеина отщепляются сульфгидрильные группы (-SH), а атом серы превращается в ион со степенью окисления минус два в виде сульфида натрия, который, взаимодействуя с ацетатом свинца, дает бурый или черный нерастворимый осадок сульфида свинца:



Белки, в составе которых нет цистина и цистеина, не дают положительную реакцию Фоля.

Исследуемый материал: раствор яичного белка, 1%-ный раствор желатина.

Реактивы: 30%-ный раствор гидроксида натрия, 5%-ный раствор ацетата свинца (II).

Оборудование: пробирки, капельницы.

Проведение реакции. В одну пробирку наливают 1 см³ неразбавленного яичного белка, в другую – 1 см³ раствора желатина. В обе пробирки добавляют равный с белковым объемом 20%-ного гидроксида натрия, нагревают до кипения и прибавляют 1-2 капли 5%-ного раствора ацетата свинца. Появление черного или бурого осадка сульфида свинца свидетельствует о положительной реакции Фоля. Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Опыт № 3. Реакция глицина с формальдегидом

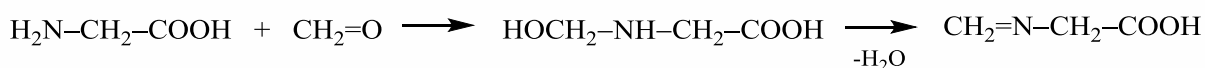
Исследуемый материал: 1%-ный раствор глицина.

Реактивы: раствор метилового красного, формалин.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Проведение реакции. В пробирку помещают 5 капель 1%-ного раствора глицина и добавляют 1 каплю индикатора метилового красного. Раствор окрашивается в желтый цвет (нейтральная среда).

К полученной смеси добавляют равный объем формалина. Наблюдают за изменением окраски индикатора.



Сделайте вывод о реакции среды в растворе и напишите уравнение реакции.

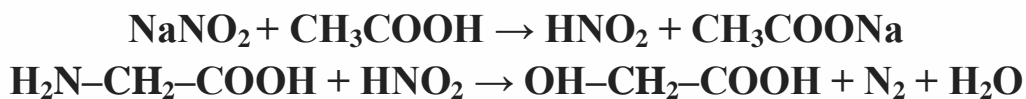
Опыт № 4. Реакция глицина с азотистой кислотой

Исследуемый материал: 1%-ный раствор глицина.

Реактивы: 5%-ный раствор нитрита натрия, уксусная кислота концентрированная.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Проведение реакции. В пробирку поместите 5 капель 1%-ного водного раствора глицина и равный объем 5%-ного водного раствора нитрита натрия. Добавьте 2 капли концентрированной уксусной кислоты и осторожно взболтайте смесь. Наблюдается выделение пузырьков газа (азота):



Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Контрольные вопросы

1. Что такое белок?
2. Как связаны между собой аминокислоты в молекуле белка?
3. Напишите трипептид из различных аминокислот. С помощью какой реакции можно их открыть?
4. Напишите аминокислоты, имеющие в своем составе бензольное кольцо. С помощью какой реакции их можно открыть?
5. Напишите аминокислоты, содержащие серу. С помощью какой реакции их можно открыть?
6. Что открывает нингидриновая реакция?
7. Значение цветных реакций на белки.
8. Классификация аминокислот. Строение (формулы) и номенклатура аминокислот.
9. Перечислите структуры белков.
10. Какие существуют дополнительные связи (помимо основной пептидной), сохраняющие пространственную конфигурацию молекулы белка?

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ

Цель работы:

- 1) сформировать знания о строении, химических основах структурной организации белковых молекул;
- 2) рассмотреть гидролиз простых и сложных белков;
- 3) исследовать продукты гидролиза белков.

Гидролиз – распад сложного вещества на более простые составные части, связанный с присоединением воды в месте разрыва связей. В зависимости от применяющегося катализатора, различают кислотный, щелочной и ферментативный гидролиз. При гидролизе простого белка конечными продуктами являются аминокислоты. В организме гидролиз белка постоянно протекает в процессе как пищеварения, так и в ходе жизнедеятельности клеток под действием протеолитических ферментов. При кислотном гидролизе белка разрушаются некоторые аминокислоты (триптофан подвергается полному разрушению, серин, треонин, цистин, тирозин, фенилаланин – частичному). При щелочном гидролизе отмечается значительно более сильное разрушение аминокислот. При кислотном гидролизе белки распадаются сначала на высокомолекулярные пептиды, а затем – на низкомолекулярные пептиды, дипептиды и аминокислоты.

Сложные белки состоят из аминокислот и небелкового компонента (простетической группы). К сложным белкам относятся нуклеопротеиды, хромо протеиды, фосфопротеиды, гликопротеиды, сложные белки-ферменты, металлопротеиды.

Опыт № 1. Кислотный гидролиз простого белка

Исследуемый материал: раствор яичного белка.

Реактивы: концентрированная соляная кислота, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди.

Оборудование: круглодонная колба с воздушным холодильником, пробирки, капельницы.

Ход работы.

1. Для гидролиза в круглодонную колбу отмеривают 20 мл раствора яичного белка и 5 мл концентрированной соляной кислоты. Колбочку закрывают пробкой с длинной стеклянной трубкой и закрепляют на штативе с асбестовой сеткой. Содержимое колбы кипятят под тягой в течение 45 мин.

2. Открытие промежуточных продуктов распада белка в гидролизате при помощи биуретовой реакции. В процессе гидролиза проводят биуретовую реакцию (см. лабораторную работу №4) с несколькими каплями предварительно нейтрализованного гидролизата. Промежуточные продукты распада белка - пептоны - при проведении биуретовой реакции дают розовое или красное окрашивание, а белки – сине-фиолетовое. Приведите выводы.

Опыт № 2. Хромопротеиды

Хромопротеиды являются сложными белками, простетическая группа которых представлена каким-либо окрашенным соединением небелкового характера (пигментом). Окрашенная простетическая группа различных хромопротеидов может принадлежать к разным классам органических соединений (порфиринам, каротиноидам, производным витаминов и др.). Важнейшую группу хромопротеидов составляют белки, содержащие окрашенное соединение порфириновой природы; к ним относятся гемоглобин крови, миоглобин мышц, некоторые ферменты (каталаза, пероксидаза, пситохромы и др.).

Гемоглобин состоит из белка глобина и пигментной части – гема. По химической природе гем представляет собой соединение протопорфирина с двухвалентным железом, которое в особых условиях может переходить в трехвалентное.

Геминная проба Тейхмана

При нагревании высушенной крови с ледяной уксусной кислотой кровяной пигмент распадается на глобин и гематин. Гематин под действием хлористого водорода, возникающего при взаимодействии хлористого натрия (имеющегося в крови или добавленного) и уксусной кислоты, переходит в хлорпроизводное – гемин, который выкристаллизовывается при остывании. Пробой Тейхмана пользуются в судебно-

медицинской экспертизе для доказательства наличия кровяных пятен. Гемин отличается от гема наличием трехвалентного железа, соединенного с атомом хлора.

Исследуемый материал: кровь.

Реактивы: ледяная уксусная кислота, насыщенный раствор хлорида натрия.

Оборудование: стекла предметные и покровные, стеклянная палочка, микроскоп.

Ход работы. Каплю свежей крови помещают на предметное стекло и дают ей высохнуть, держа стекло высоко над пламенем горелки во избежание нагревания выше 60°C (не кипятить, контролировать нагрев прикосновением стекла к тыльной поверхности кисти руки). К подсушенной крови добавляют 1-2 капли концентрированной уксусной кислоты, смесь тщательно перемешивают стеклянной палочкой, накрывают покровным стеклом и осторожно нагревают до начала кипения кислоты. При этом предметное стекло следует держать высоко над пламенем горелки, чтобы избежать выкипания жидкости. Затем препарат охлаждают и рассматривают под микроскопом образовавшиеся при разрушении гемоглобина кристаллы солянокислого гемина, имеющие форму ромбоидальных палочек. Если обнаружить кристаллы не удастся, то приподнимают покровное стекло, добавляют 2-3 капли концентрированной уксусной кислоты, нагревают смесь и после охлаждения вновь исследуют под микроскопом.

При исследовании старых пятен геминовую пробу производят с соскобом пятна или же кусочек ткани с пятном режут на мелкие части. Перед обработкой ледяной уксусной кислотой добавляют один маленький кристаллик хлористого натрия. Приведите вывод.

Опыт № 3. Фосфопротеиды

Фосфопротеиды представляют собой сложные белки, состоящие из простого белка и небелковой части – фосфорной кислоты. Фосфорная кислота связана с белком через гидроксильную группу оксиаминокислот – серина и треонина. К этой группе белков относятся казеиноген молока, вителлин яичного желтка, ихтулин икры и некоторые другие. Фосфопротеиды служат одним из питательных материалов для развития эмбрионов.

Исследуемый материал: молоко.

Реактивы: 10%-ный раствор уксусной кислоты, 1%-ный раствор сульфата меди, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 10%-ный раствор азотной кислоты, фенолфталеин, молибденовый реактив.

Оборудование: воронки, фильтры, пробирки, стеклянная палочка, пипетки, спиртовка.

Ход работы.

1. Выделение казеина из молока. К 2 мл молока добавляют 2 мл дистиллированной воды и 2 капли 10%-ной уксусной кислоты. Образуется осадок казеина, который отфильтровывают. Фильтрат отбрасывают, а осадок казеина осторожно снимают с фильтра стеклянной палочкой и помещают в чистые пробирки.

2. Гидролиз казеина. В пробирку помещают выделенный из молока казеин и приливают 2 мл 10%-ного раствора едкого натра. Кипятят 10-15 мин на асбестовой сетке с обратным холодильником, затем охлаждают пробирку и проводят реакцию на продукты гидролиза.

3. Обнаружение белка. Белок обнаруживают биуретовой реакцией (см. лабораторную работу №4). В пробирку к трем каплям гидролизата добавляют одну каплю 1%-ного раствора сернокислой меди. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

4. Обнаружение фосфата (см. лабораторную работу №2). Оставшийся гидролизат подкисляют несколькими каплями 10%-ного раствора азотной кислоты в присутствии 1-2 капель фенолфталеина (до обесцвечивания) и отфильтровывают в сухую пробирку. К 5 каплям фильтрата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят несколько минут. Жидкость окрашивается в желтый цвет, а затем при охлаждении выпадает желтый осадок фосфорно-молибденового аммония, указывающий на присутствие фосфата в гидролизате:



Опыт № 4. Гликопротеиды

Гликопротеиды – сложные белки, в простатические группы которых входят углеводы и их производные. Гликопротеиды содержатся почти во всех тканях и жидкостях организма, носят общее название муцинов и мукоидов и выполняют опорную и защитную функции.

Открытие углеводного компонента в яичном белке

Исследуемый материал: яичный белок.

Реактивы: концентрированная серная кислота, 1%-ны раствор тимола, концентрированная уксусная кислота.

Оборудование: пробирки, капельницы.

Ход работы. При взаимодействии концентрированной серной кислоты с пентозами или гексозами происходит их дегидратация с образованием соответственно фурфурола и 5-гидроксиметилфурфурола. Они дают с тимолом или α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты продукты конденсации красного цвета. К 10 каплям профильтрованного гидролизата добавляют 2-3 капли 1%-ного раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно наслаивают 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфурола с тимолом. Приведите вывод.

Оформление работы. Результаты работ по сложным белкам представить в виде следующей таблицы.

Наименование сложного белка	Химическая структура простетической группы	Используемые реактивы	Продукты реакции	Чем обусловлена реакция?

Опыт № 5. Определение изоэлектрической точки белков

Изоэлектрической точкой белка называется определенная величина рН среды, при которой белок находится в виде нейтральных молекул (в изоэлектрическом состоянии), несущих равные количества положительных и отрицательных зарядов. При других концентрациях ионов водорода в растворе имеются преимущественно положительные и отрицательные ионы белка. Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы и легко выпадают в осадок. Для большинства белков изоэлектрическая точка близка к нейтральной среде, но не вполне совпадает с ней; для многих белков она сдвинута в кислую сторону, а некоторые белки имеют изоэлектрическую точку при слабощелочной реакции среды. Определение изоэлектрической точки

может быть сведено к определению рН раствора, при котором наблюдается наиболее быстрое и полное выпадение белка в осадок.

Исследуемый материал: молоко.

Реактивы: 10%-ный раствор уксусной кислоты, дистиллированная вода, 0,2 М раствор ацетата натрия, 0,2 М раствор уксусной кислоты.

Оборудование: пробирки, воронка, фильтры, пипетка, стеклянная палочка.

Ход работы: 1. Выделение казеина из молока. К 2 мл молока добавляют 2 мл дистиллированной воды и 2 капли 10%-ного раствора уксусной кислоты. Образуется осадок казеина, который отфильтровывают. Фильтрат отбрасывают, а осадок казеина осторожно снимают с фильтра стеклянной палочкой и помещают в 7 чистых пробирок.

2. Определение изоэлектрической точки казеина. Для определения изоэлектрической точки в 7 пробирок с казеином наливают с помощью пипетки нужные реактивы в количествах, указанных в табл. 9. При смешивании растворов в каждой пробирке устанавливается определенная концентрация ионов водорода. Содержимое пробирок хорошо перемешивают. Через 5-10 мин. во всех пробирках появляется осадок (помутнение). Наибольшее количество осадки наблюдается в той пробирке, рН которой соответствует изоэлектрической точке данного белка.

Оформление работы. Результаты опытов представить в виде табл. 9.

Таблица 9

Количество реактивов для приготовления растворов

Количество 0,2М CH ₃ COOH, мл	Количество воды, мл	Количество 0,4% раствора казеина в 0,2 М CH ₃ COONa, мл	рН смеси	Степень помутнения
1,6	0,4	0,2	3,8	
0,8	1,2	0,2	4,1	
0,4	1,6	0,2	4,4	
0,2	1,8	0,2	4,7	
0,1	1,9	0,2	5,0	
0,06	1,94	0,2	5,3	
0,3	1,97	0,2	5,6	

В графе «Степень помутнения» отсутствие осадка обозначить знаком «минус» (-), наличие его – знаком «плюс» (+), значительное помутнение – несколькими «плюсами». Приведите вывод.

Контрольные вопросы

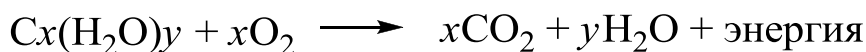
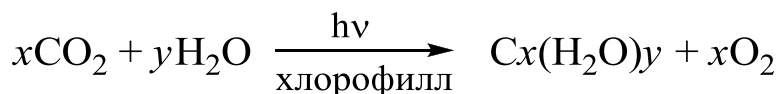
1. Что такое гидролиз белка, и какие виды гидролиза вы знаете?
2. В чем заключается отличие сложных белков от простых?
3. Напишите классификацию сложных белков. К какой группе сложных белков относится гемоглобин, и из каких компонентов он состоит?
4. Что такое гликопротеиды, и какие существуют качественные реакции на их углеводную группу?
5. Что такое фосфопротеиды, и с помощью какой реакции можно открыть их фосфорную кислоту? Как связана фосфорная кислота с белковой частью в фосфопротеидах?
6. Как ведут себя аминокислоты и белки в водном растворе и в присутствии избытка кислоты и щелочи?
7. От чего зависит заряд белка в водном растворе?
8. От чего зависит растворимость белка? Какие факторы стабилизируют белок в растворе?
9. Каковы общие механизмы осаждения белка из раствора? Какими способами можно осадить белок, не вызывая его денатурацию?
10. Что такое изоэлектрическая точка, и как ее определить?
11. Что такое высаливание белка?
12. Что такое денатурация белка? Какие агенты, денатурирующие белки вам известны?
13. В чем заключается разница между осаждением и денатурацией?
14. Каким образом можно разделить альбумины и глобулины сыворотки крови?
15. Назовите мероприятия при отравлении человека солями тяжелых металлов, основанные на необратимых реакциях осаждения

3. УГЛЕВОДЫ

Краткие теоретические сведения

Углеводы – это большая группа органических веществ, широко распространенных в живой природе. Они входят в состав клеток и тканей всех растительных и животных организмов, поэтому играют исключительную роль во многих жизненных процессах. Представителями углеводов являются крахмал и гликоген (источники энергии метаболических процессов), целлюлоза, мурамин и хитин (структурные компоненты клеточных стенок растений, бактерий и грибов), виноградный сахар или глюкоза (источник энергии для клеточных реакций, обязательный компонент крови и тканей животных), свекловичный или тростниковый сахар (сахароза) и др. Углеводы входят в состав таких жизненно важных веществ как нуклеиновые кислоты, коферменты, витамины, а некоторые из них используются как лекарственные средства.

Углеводы образуются в растениях в результате процесса фотосинтеза из углекислого газа и воды с использованием солнечной энергии. В животных организмах эта энергия высвобождается в результате метаболизма углеводов, представляющего собой процесс их окисления.



Таким образом, углеводы действуют как консерванты солнечной энергии.

Ежегодная масса синтезируемых углеводов оценивается содержанием углерода в $4 \cdot 10^{10}$ т. Поэтому углеводы являются наиболее распространенными органическими соединениями. Они составляют 80% от сухой массы растений и 2% от сухой массы животных организмов. Углеводы являются одним из основных пищевых продуктов и служат исходным веществом для промышленного производства искусственного волокна, бумаги, взрывчатых веществ и этилового спирта.

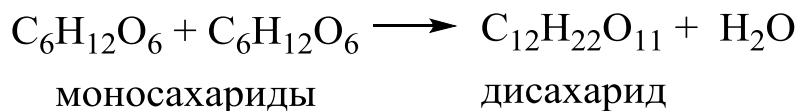
Термин углеводы был предложен К. Шмидтом (1844 г.). Известные тогда углеводы имели элементный состав, который мог быть

выражен как сочетание углерода с водой $C_n(H_2O)_m$. Когда позднее стали известны углеводы, не отвечающие указанному составу, этот термин сохранился. По номенклатуре ИЮПАК предложено название *гликаны*.

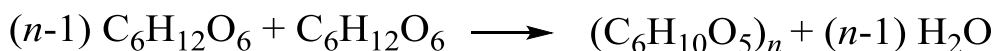
Углеводы можно разделить на две основные группы:

- *простые углеводы или моносахариды* (монозы) – вещества, не способные гидролизоваться (например, глюкоза, фруктоза и др.);
- *сложные углеводы* – вещества, способные гидролизоваться и распадаться при этом с образованием моносахаридов.

Сложные углеводы в свою очередь подразделяются на *олиго-* и *полисахариды*. Олигосахариды (от греческого *олигос* – немногий) – вещества, образованные из остатков нескольких молекул моносахаридов (от 2 до 10). Простейшими из них являются дисахариды (например, сахароза, манноза, лактоза и др.):

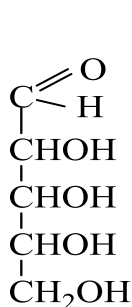


Полисахариды (полиозы) образуются из моносахаридов в результате процесса поликонденсации:

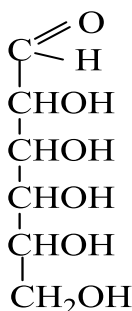


3.1. МОНОСАХАРИДЫ

Классификация моносахаридов. Моносахариды относятся к наиболее простой группе углеводов. По строению они являются полигидроксиальдегидами или полигидроксикетонами, которые называются соответственно альдозами и кетозами. В зависимости от количества атомов углерода в молекуле монозы подразделяются на тетразы ($C_4H_8O_4$), пентозы ($C_5H_{10}O_5$), гексозы ($C_6H_{12}O_6$), гептозы ($C_7H_{14}O_7$) и т.д. Для них характерно наличие неразветвленной углеродной цепи. В природе наиболее распространены два вида моноз – пентозы $C_5H_{10}O_5$ и гексозы $C_6H_{12}O_6$.



Альдопентоза

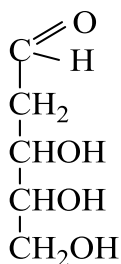


Альдогексоза

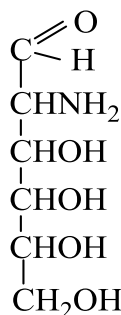


Кетогексоза

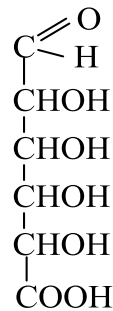
Наряду с типичными моносахаридами существуют так называемые дезоксисахара, отличающиеся тем, что в цепи моносахаридов у одного или нескольких углеродных атомов отсутствуют гидроксильные группы. К моносахаридам также относятся аminosахара, в молекулах которых вместо одной или нескольких гидроксильных групп содержится аминогруппа. Особой разновидностью моносахаридов являются уроновые кислоты, отличающиеся наличием карбоксильной группы вместо первичной спиртовой группы CH_2OH :



2-Дезоксипентоза

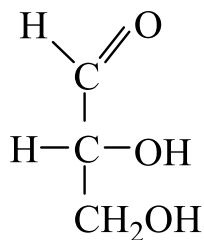


2-Амино-
2-дезоксигексоза

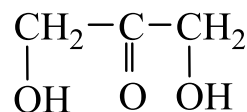


Уроновая кислота

Родоначальными соединениями для альдоз и кетоз являются простейшие триозы – глицериновый альдегид и дигидроксиацетон:



D-глицериновый альдегид



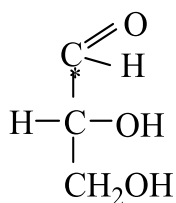
дигидроксиацетон

Глицериновый альдегид и дигидроксиацетон не мутаротируют, и по другим свойствам сильно отличаются от моноз, поэтому они не относятся к моносахаридам.

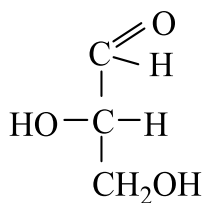
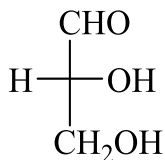
Стереоизомерия и номенклатура моносахаридов.

Моносахариды содержат несколько асимметрических углеродных атомов, поэтому для них характерна пространственная изомерия. При наличии «n» асимметрических атомов углерода количество оптических изомеров выражается формулой 2^n . Молекулы моносахаридов построены несимметрично, т.к. имеют различные концевые группы: $\text{CH}=\text{O}$ и CH_2OH , поэтому для них не существуют оптически неактивные мезо-формы. Следовательно, возможны восемь стереоизомерных альдопентоз, шестнадцать стереоизомерных альдогексоз или соответственно четыре и восемь пар зеркальных изомеров.

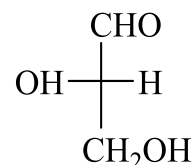
Для обозначения конфигурации стереоизомерных моносахаридов обычно используют *D, L* – систему (М. А. Розанов, 1906 г.). Она исходит из фишеровских проекций цепных (открытых или незамкнутых) форм моносахаридов. Углеродная цепь в них записывается вертикально: у альдоз наверху помещают альдегидную группу, у кетоз – соседнюю с карбонильной первичную спиртовую группу. С этих групп начинают нумерацию углеродной цепи. Конфигурационным стандартом служит глицериновый альдегид, правовращающий стереоизомер которого обозначается как *D*-изомер, а левовращающийся – как *L*-изомер. У *D*-изомера гидроксильная группа располагается справа при расположении альдегидной группы сверху. Естественно, для *L*-изомера наблюдается обратная конфигурация, т.е. OH-группа располагается слева:



D (+)-глицериновый альдегид



L (-)-глицериновый альдегид



Если в моносахариде конфигурация асимметрического атома углерода, наиболее удаленного от карбонильной группы, совпадает с конфигурацией такого же атома в *D* (+) – глицериновом альдегиде, то моносахарид принадлежит к *D*-ряду. И наоборот, если в моносахариде конфигурация асимметрического атома углерода, наиболее удаленного от карбонильной группы, совпадает с конфигурацией такого же атома в *L* (-) – глицериновом альдегиде, то моносахарид принадлежит к *L*-ряду.

D,L-Система обозначений стереоизомерных моносахаридов основывается на конфигурации одного из многих центров хиральности, и поэтому не вполне универсальна. Несмотря на это, она продолжает широко использоваться в химии углеводов и лишь в редких случаях заменяется на *R,S*-номенклатуру. Например, *D*-глюкоза имеет следующее название: (2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-2,3,4,6- тетрагидроксигексанааль.

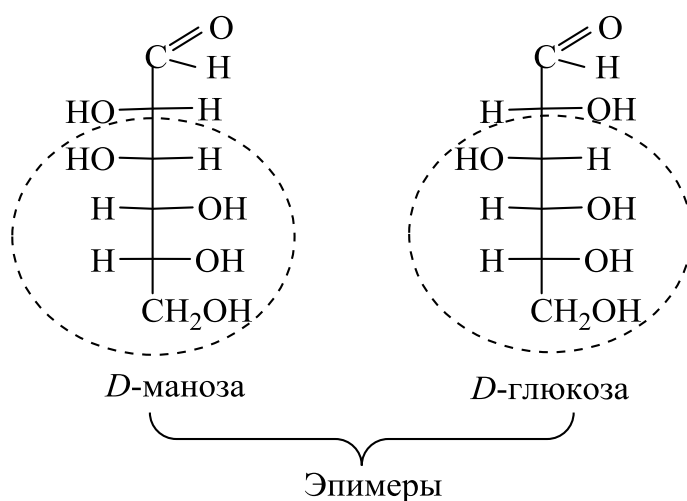
Следует подчеркнуть, что не существует непосредственной зависимости между знаком вращения и принадлежностью вещества к *D*-или *L*-ряду. Направление вращения плоскополяризованного луча света растворами моносахаридов зависит от конфигурации всех асимметрических атомов. Направление вращения обозначают знаками (+) и (-) после указания конфигурации (или генетического ряда).

Для моносахаридов (и вообще углеводов) обычно используют тривиальные названия с характерным окончанием *-оза*. Диастереоизомеры имеют различные названия, что подчеркивает различие их свойств. Зеркальные изомеры имеют одинаковые названия, отличающиеся символами *D* и *L* (например, *D*- и *L*- глюкоза). Общее название кетотетроз и -пентоз образуется введением суффикса *-ул* в названия соответствующих альдоз. Например, рибозе соответствует рибулоза, ксилозе – ксилулоза и т.д. Исключением являются названия кетогексоз, которые не имеют связи с названием альдогексоз.

Пара диастеремеров, отличающихся конфигурацией только одного из асимметрических атомов углерода, называются эпимерами. Цифра перед словом «эпимер» указывает на атом углерода с различной конфигурацией. Например, *D*-глюкоза и *D*-галактоза являются 4-эпимерами, а *D*-манноза и *D*-глюкоза – 2-эпимерами (обычно цифра «2» не ставится).

Подавляющее число природных моносахаридов принадлежат к *D*-ряду.

Моносахариды могут существовать в виде нескольких таутомерных форм вследствие явления *оксо-цикло-таутомерии* (или кольчатая таутомерии). Гипотезу об этом впервые высказал русский ученый А. А. Колли (1870 г.), а затем и немецкий химик-органик Б. Толленс (1883 г.). Они предположили, что монозы существуют не в алифатической оксо-форме, а в виде циклических полуацеталей.



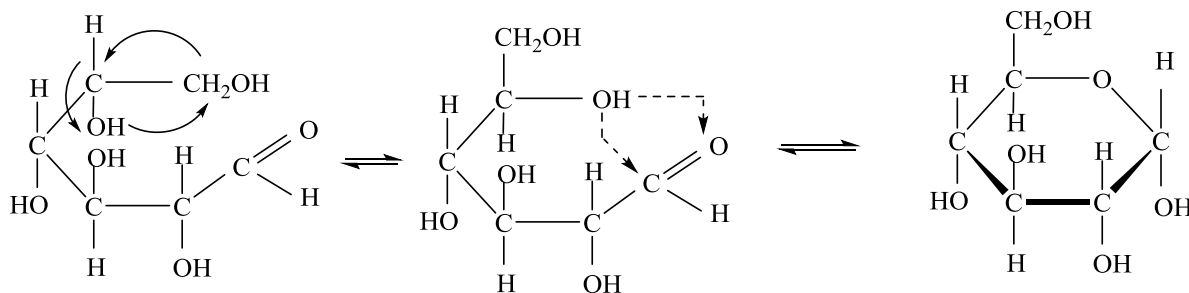
В 1923 г. В. Хеурс и Херст доказали, что пентозы и гексозы преимущественно существуют в виде шестичленных δ -полуацетальных (пиранозных) циклов.

Образование циклических полуацетальных форм на примере *D*-глюкозы можно представить, как результат реакций нуклеофильного присоединения гидроксильной группы при C5 (или C4) по альдегидной группе. В результате образования клешневидной конформации цепной формы моносахарида с учетом валентных углов тетраэдрических атомов углерода происходит сближение в пространстве OH-группы у C5 (или C4) с альдегидной группой углерода, что благоприятствует протеканию реакции внутримолекулярного нуклеофильного присоединения и образованию внутреннего циклического полуацетала шестичленных

(или пятичленных) гетероциклов, содержащих четыре или пять углеродных и один кислородный атомы.

Такие шестичленные циклы называются *пиранозными* (исходя от названия гетероцикла – пирана), а пятичленные – *фуранозными* (исходя из названия гетероцикла – фурана).

При образовании циклической структуры происходит поворот по связи C4-C5 на 90°. После такого поворота гидроксил пятого углеродного атома занимает положение, благоприятное для замыкания кольца (ОН приближается к –СНО):

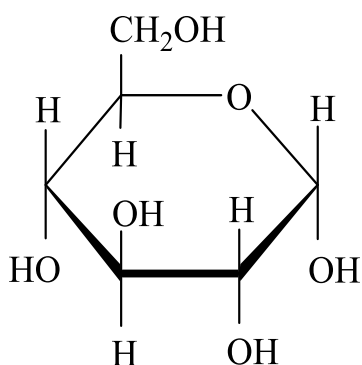


В результате циклизации атом углерода карбонильной группы превращается в асимметрический (его называют *аномерный*), т.к. создаются две качественно новые связи ($\text{H}-\text{O}-\text{CH}-\text{O}-\text{C}$). Вновь образовавшаяся гидроксильная группа называется *гликозидной* или *полуацетальной*. Таким образом, дополнительно возникают два диастереоизомерных циклических полуацетала. Они отличаются расположением гликозидного гидроксила и называются *аномерами* (от греческого «ано» – вверх). Аномеры называют, применяя условные обозначения «альфа» (α -) и «бета» (β -). α -Формой называют стереоизомер, у которого расположение гликозидного гидроксила такое же, как у гидроксила последнего асимметричного атома углерода моносахарида. У β -формы этот гидроксил расположен по другую сторону по отношению к гидроксиду последнего асимметричного атома углерода. Для альдогексоз образование пятичленного цикла менее выгодно, поэтому для них чаще характерно образование пиранозных форм.

Для более реального изображения моносахаридов как циклических полуацеталей чаще всего используют так называемые перспективные формулы, которые были предложены английским ученым В. Хеуорсом. В этих формулах кольца изображают в виде правильных плоских пяти- или шестиугольников, расположенных перпендикулярно

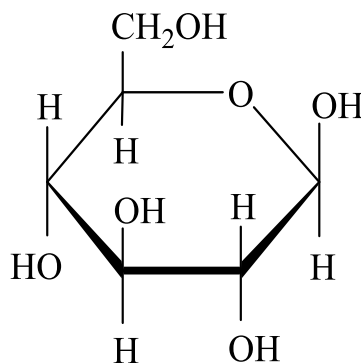
плоскости чертежа. Часть кольца, обращенная к читателю, обозначается утолщенными линиями, а углеродные атомы не пишутся. Через них проводят вертикальные линии, на концах которых пишут водородные атомы и гидроксильные группы в соответствии с их пространственным расположением в молекуле.

Углерод, с которым связан полуацетальный гидроксил, обычно помещают в правом углу от наблюдателя, кислородный атом в кольце за плоскостью чертежа. Например, для *D*-глюкозы формулы Хеуорса имеют следующий вид:



α -*D* (+)-Глюкопираноза

т. пл. 146 °C; $[\alpha]_D = +112,2^\circ$

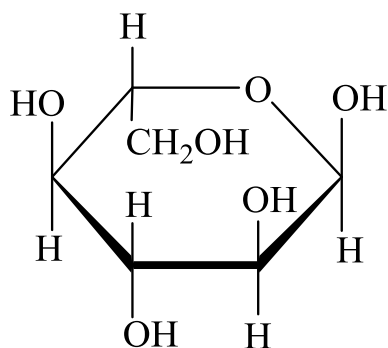


β -*D* (+)-Глюкопираноза

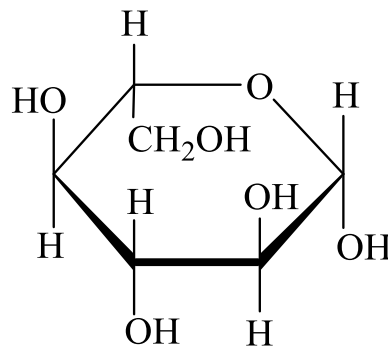
т. пл. 150 °C; $[\alpha]_D = +18,7^\circ$

У α -аномера гликозидный гидроксил расположен под плоскостью цикла, а у β -аномера он находится над плоскостью цикла.

Для *L*-гексоз группа CH₂OH пишется под плоскостью. Например:



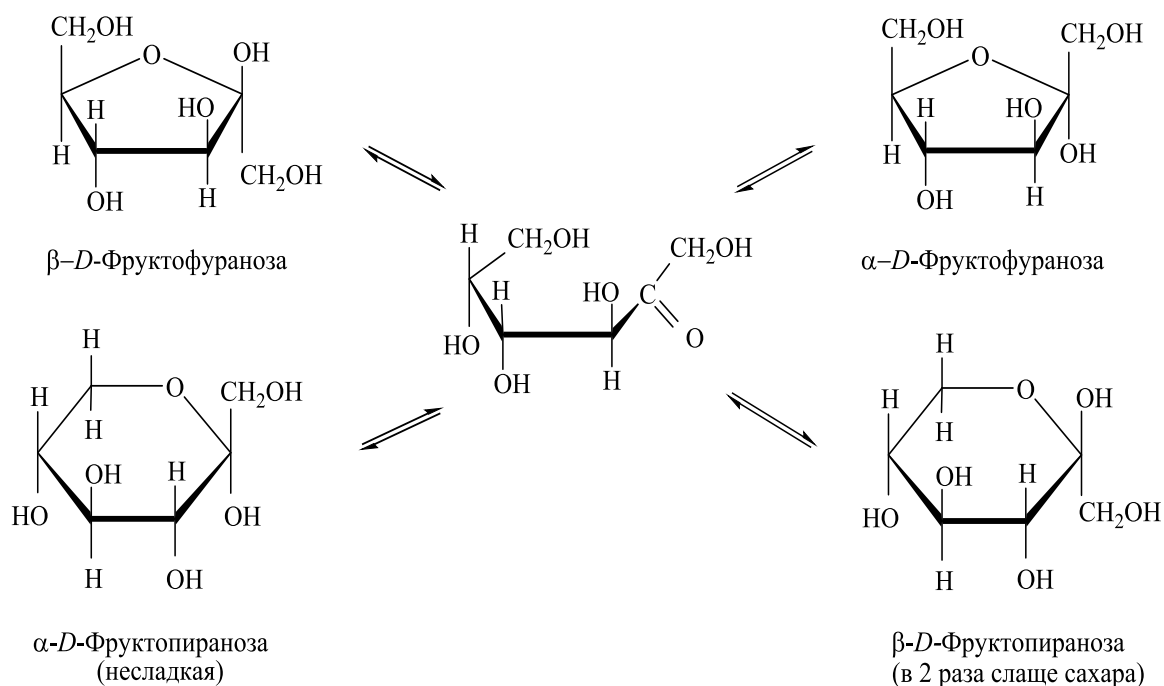
α -*L*-Глюкопираноза



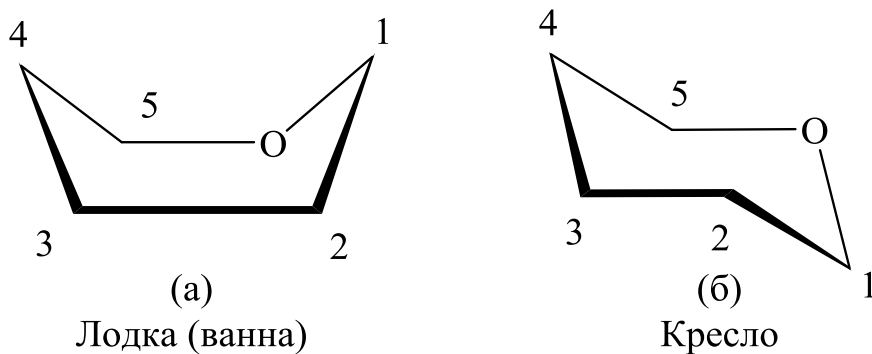
β -*L*-Глюкопираноза

Формулы Хеуорса достаточно хорошо изображают фуранозные формы, поскольку молекулы цикlopентанов почти плоские.

Аналогично можно показать образование циклических форм *D*-фруктозы. Если для гексоза характерно образование в основном пиранозных структур, то для кетогексоз характерны как фуранозные (пятичленные), так и пиранозные (шестичленные):

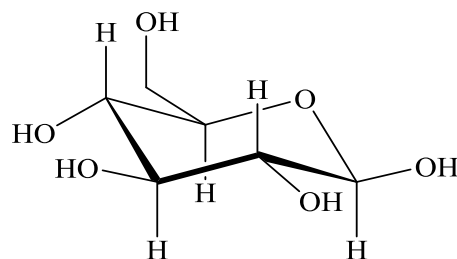
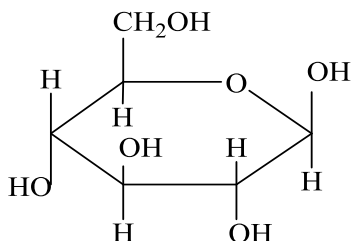


Изучение стереохимии моносахаридов показало, что пиранозное кольцо не является плоским, т.к. при этом валентные углы сильно отличались бы от тетраэдрического ($109^\circ 28'$) и такие кольца должны быть сильно напряженными. Установлено, что пиранозное кольцо может существовать в виде 8 наиболее стойких конформаций. Часть из них имеет форму «лодки» (а), часть форму «кресла» (б):



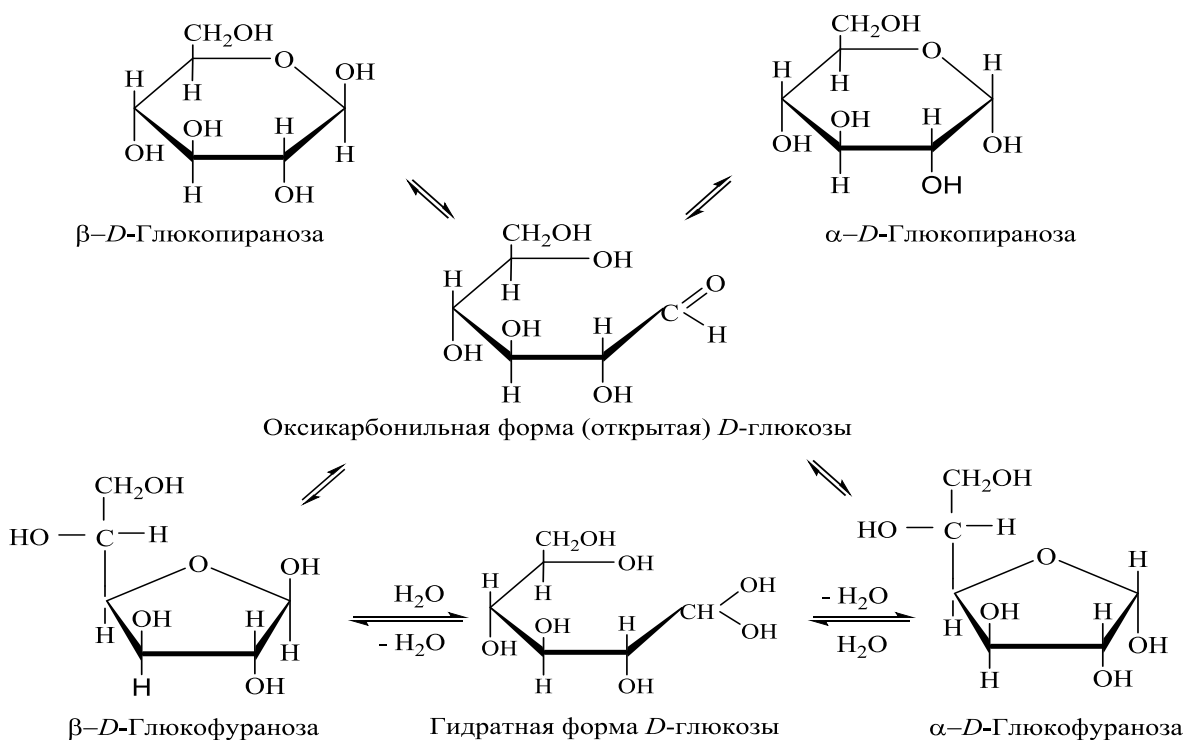
Наиболее стойкой и часто встречающейся является форма кресла. Более устойчивой является конформация с максимальным числом

заместителей (ОН-группа и др.), расположенных экваториально (е), т.е. в плоскости кольца и максимальным числом аксиальных заместителей (а), перпендикулярных плоскости кольца. В β -глюкозе взаимодействие между гидроксилами при С1 и С2 меньше, поэтому она больше распространена:



β -D-Глюкопираноза (е, е, е, е)

Таутомерия моносахаридов. Моносахариды (пентозы, гексозы, гептозы) в кристаллическом состоянии существуют исключительно в форме циклических полуацеталей [α - или β -пиранозы (преимущественно) или фуранозы]. При растворении моносахаридов в воде происходит частичное превращение одной формы в другую вплоть до установления определенного равновесия. В связи с этим свежеприготовленные растворы сахаров в воде со временем изменяют угол вращения плоскости поляризованного света до некоторой определенной величины. Это явление получило название мутаротации.



Изменение во времени угла вращения плоскости поляризации света растворами углеводов называется мутаротацией.

Химическая сущность мутаротации состоит в способности моносахаридов к существованию в виде равновесной смеси таутомеров – открытой и циклических форм. Такой вид таутомерии называется *цикло-оксо-таутомерией* (или кольчато-цепная таутомерия).

Так, таутомерные превращения *D*-глюкозы, протекающие через открытую оксо-форму, можно представить приведенной выше схемой:

Например, первоначальное удельное вращение растворов α -*D*-глюкопиранозы равно $+112,2^\circ$, и β -*D*-глюкопиранозы – $+18,7^\circ$ со временем достигает постоянного значения $+52,7^\circ$. В растворах установление равновесия между четырьмя таутомерами моносахаридов. В смеси таутомеров преобладают пиранозные формы.

В нейтральных средах мутаротация протекает медленно. При добавлении в раствор углевода кислот или оснований мутаротация резко ускоряется, а иногда проходит почти мгновенно. В щелочных средах мутаротация осложняется параллельно и другими реакциями, например, эпитеризации или распада моносахарида. Таутомерия лежит в основе множественности химических свойств моносахаридов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА МОНОСАХАРИДЫ

Цель работы:

- 1) сформировать знания о строении, физических и химических свойствах моносахаридов;
- 2) рассмотреть качественные реакции, подтверждающие наличие гидроксильных и альдегидной групп в молекулах моносахаридов.

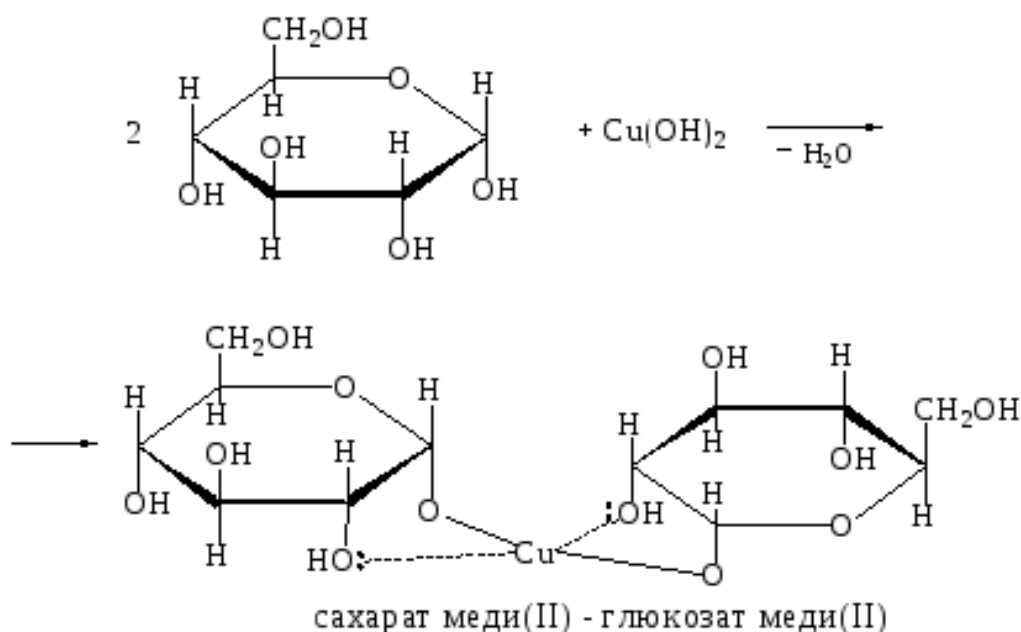
Опыт № 1. Доказательство наличия гидроксильных групп в молекулах моносахаридов

Исследуемый материал: 1%-ный раствор глюкозы. 1%-ный раствор фруктозы.

Реактивы: 10%-ный раствор гидроксида натрия, 2%-ный раствор сульфата меди (II).

Приборы: штатив с пробирками.

Ход работы. В 2 пробирки поместите по 10 капель 1%-ного раствора глюкозы и 1%-ного раствора фруктозы; добавьте в обе пробирки по 1 мл 10%-ного раствора NaOH и 1-2 капли раствора сульфата меди. В присутствии моносахаридов образующийся голубой осадок гидроксида меди (II) растворяется, окрашивая жидкость в голубой цвет:



Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

Опыт № 2. Доказательство наличия альдегидной группы в молекулах моносахаридов

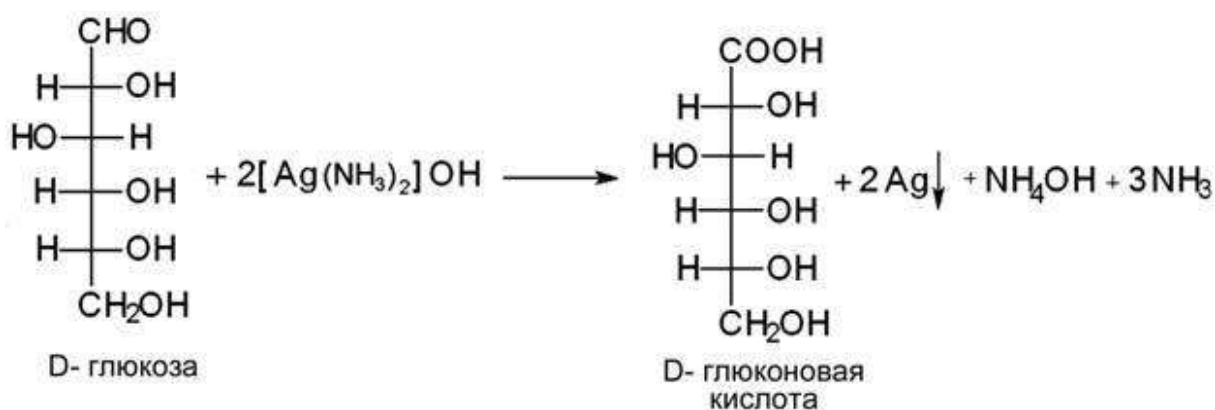
1. Реакция «серебряного зеркала»

Исследуемый материал: 1%-ный раствор глюкозы.

Реактивы: нитрат серебра, 0,2 н. раствор; аммиак, 2 н. раствор; едкий натр, 2 н. раствор.

Приборы: штатив с пробирками, водяная баня, электрическая плитка.

Ход работы. В пробирку помещают 1-2 капли раствора нитрата серебра, 1-2 капли раствора едкого натра и приливают по каплям раствор аммиака до растворения образовавшегося осадка гидроксида серебра. К образовавшемуся аммиачному раствору оксида серебра (реактив Толленса) добавляют 1,5 мл 1%-ного раствора глюкозы. Пробирку нагревают на водяной бане при температуре 70-80°C и наблюдают выделение металлического серебра на стенках пробирки («серебряное зеркало»). Если пробирка была недостаточно чистой или во время нагревания сильно встряхивалась, серебро выпадает в виде черного осадка:

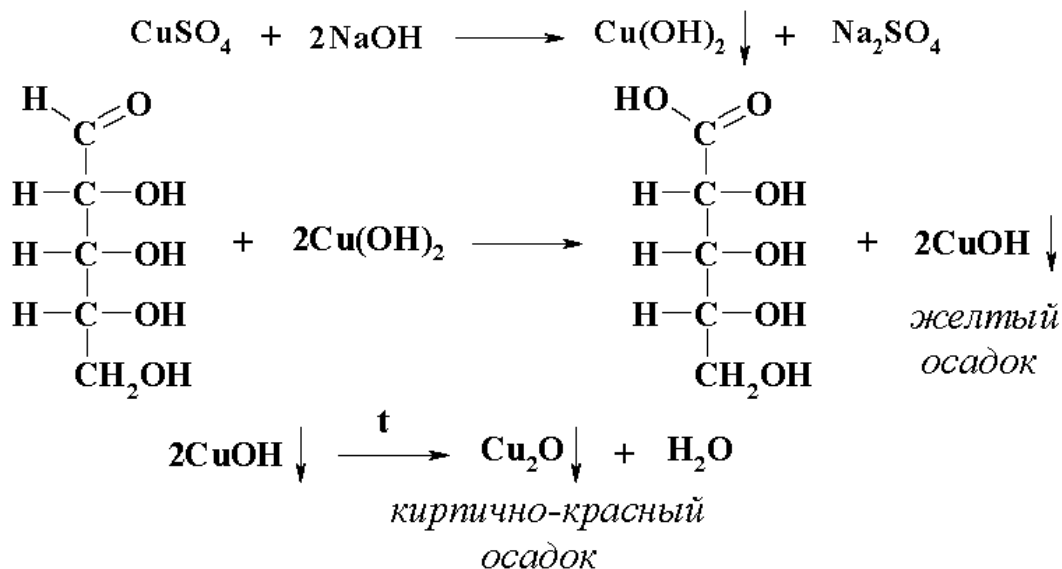


Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

2. Реакция Троммера

Все моносахариды, имеющие свободную карбонильную группу (альдегидную или кетонную), обладают способностью в щелочной среде при нагревании восстанавливать окисные формы металлов в закисные или даже до свободного состояния. Моносахариды при этом образуют соответствующие кислоты. Это свойство моносахаридов используется для некоторых качественных и количественных реакций.

Реакция Троммера заключается в восстановлении моносахаридами (альдозами) гидроксида меди (II) в гидроксид меди (I) желтого цвета. Последний при нагревании разлагается до оксида меди (I), который выпадает в виде красного осадка. Например, глюкоза в щелочной среде окисляется гидроксидом меди (II) до глюконовой кислоты:



При более глубоком окислении глюкозы образуются соли сахарной кислоты и ряд других соединений.

Исследуемый материал: 1%-ный раствор глюкозы.

Реактивы: 10%-ный раствор гидроксида натрия, 1%-ный раствор сульфата меди.

Приборы: штатив с пробирками, спиртовка.

Ход работы.

а) В пробирку наливают 1-2 мл раствора глюкозы, равный объем раствора гидроксида натрия, и при встряхивании добавляют 1-2 капли раствора сульфата меди. В присутствии глюкозы образующийся осадок гидроксида меди (II) растворяется, окрашивая жидкость в голубой цвет. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появление желтого [гидроксид меди (I)], а затем красного (оксид меди (I)) осадка указывает на положительную реакцию Троммера.

Напишите уравнения протекающих реакций и приведите вывод.

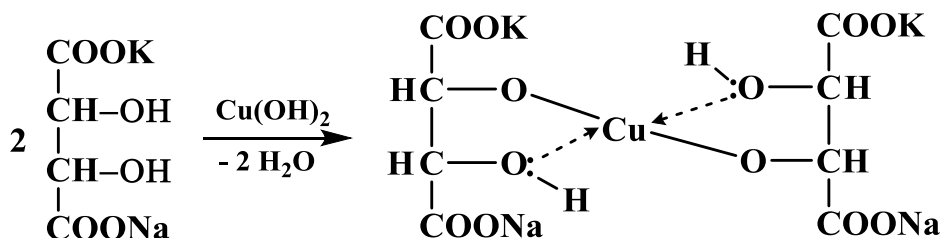
б) В другой пробирке смешивают 2-3 мл раствора гидроксида натрия с несколькими каплями сульфата меди. Раствор глюкозы не добавляют. Получается осадок гидроксида меди (II) голубого цвета. Поэтому при реакции Троммера следует избегать излишка сульфата

меди, т.к. реакция между редуцирующим углеводом и гидроксидом меди (II) идет количественно. Избыток последнего при нагревании теряет воду и переходит в черный оксид меди (II), что затемняет основную реакцию и является недостатком метода.

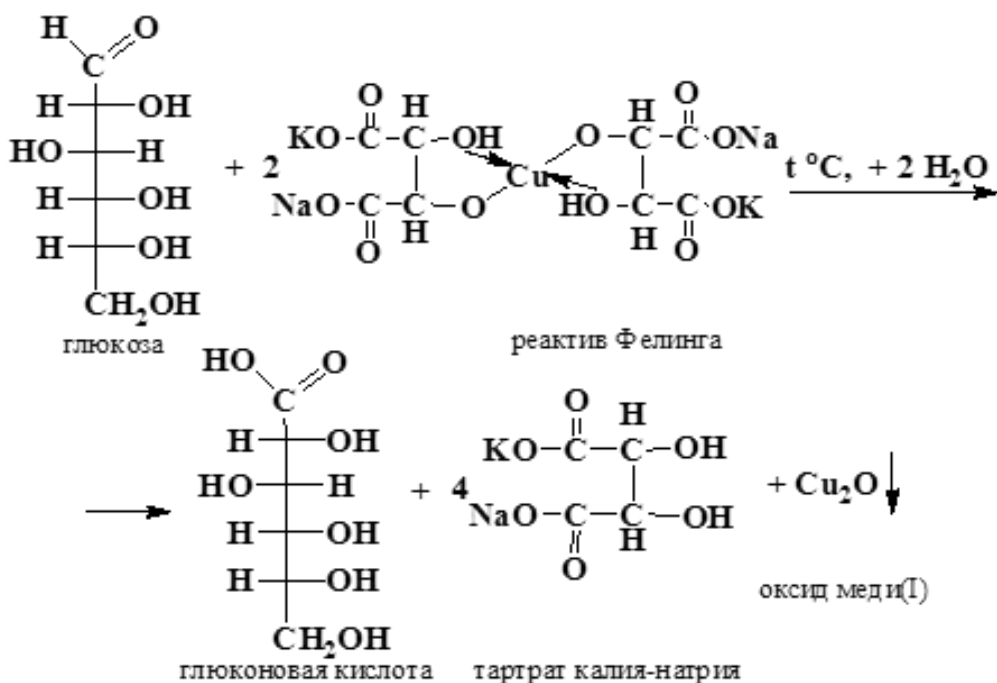
Напишите уравнения протекающих реакций и приведите вывод.

3. Реакция с реактивом Фелинга

Для проведения реакции используется реактив Фелинга, который является медным алкоголятом сегнетовой соли. Для его приготовления смешивают растворы сульфата меди и сегнетовой соли (К, Na – виннокислый) в щелочной среде. Первоначально образующийся голубой осадок гидроксида меди (II) в присутствии сегнетовой соли переходит в растворимое комплексное соединение фиолетового цвета:



Моносахариды при кипячении с реактивом Фелинга окисляются до глюконовой кислоты и восстанавливают его до оксида меди (I) красного цвета:



Исследуемый материал: глюкоза, 1%-ный раствор.

Реактивы: реактив Фелинга.

Приборы. Штатив с пробирками, спиртовка.

Ход работы. К 1-2 мл 1%-ного раствора глюкозы прибавляют равный объем реактива Фелинга и перемешивают. Верхний слой жидкости осторожно нагревают в пламени спиртовки до кипения. Появляется, как и в реакции Троммера, желтый осадок гидроксида меди (I) или же красный осадок оксида меди (I).

Напишите уравнения протекающих реакций и приведите вывод.

3.2. ДИСАХАРИДЫ

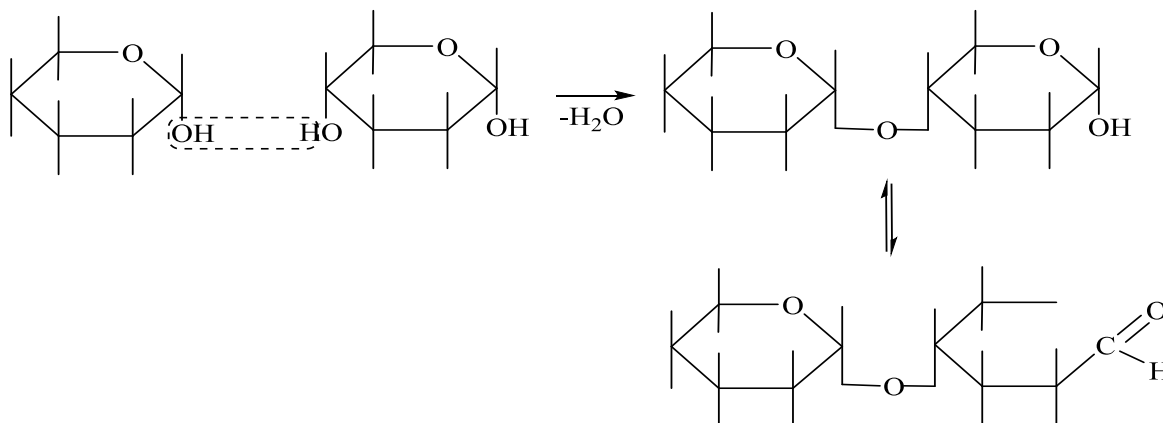
Краткие теоретические сведения

Дисахариды образуются при частичном гидролизе полисахаридов. Они содержатся в плодах, овощах, фруктах. При гидролизе (кислотном или ферментативном) дисахариды расщепляются на две молекулы моносахаридов. Все дисахариды построены по типу гликозидов, т. е. молекула воды выделяется из двух OH-групп молекул моносахаридов с обязательным участием гликозидного (полуацетального) гидроксила.

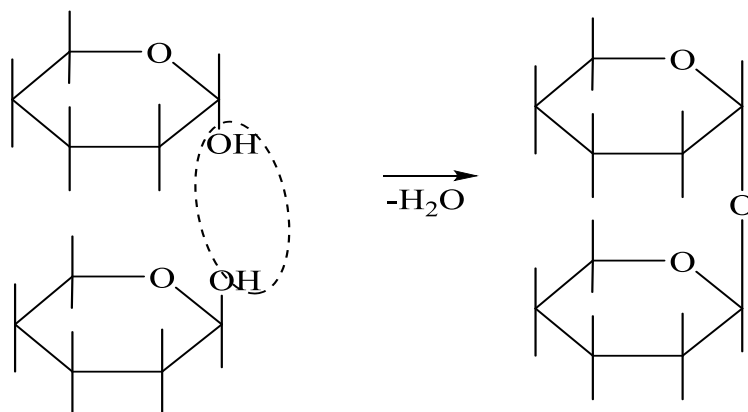
По строению и химическим свойствам дисахариды делят на 2 типа:

- ✓ *восстанавливающие*;
- ✓ *невосстанавливающие*.

Восстанавливающие дисахариды образуются за счет выделения воды из гликозидного гидроксила одной молекулы моносахарида и одного из спиртовых гидроксидов второй молекулы моносахарида:



Эти дисахариды имеют один гликозидный гидроксил, поэтому по химическим свойствам они аналогичны моносахаридам. В частности, они могут восстанавливать такие окислители, как оксиды серебра и меди (II) и поэтому они называются восстанавливающими дисахаридами.



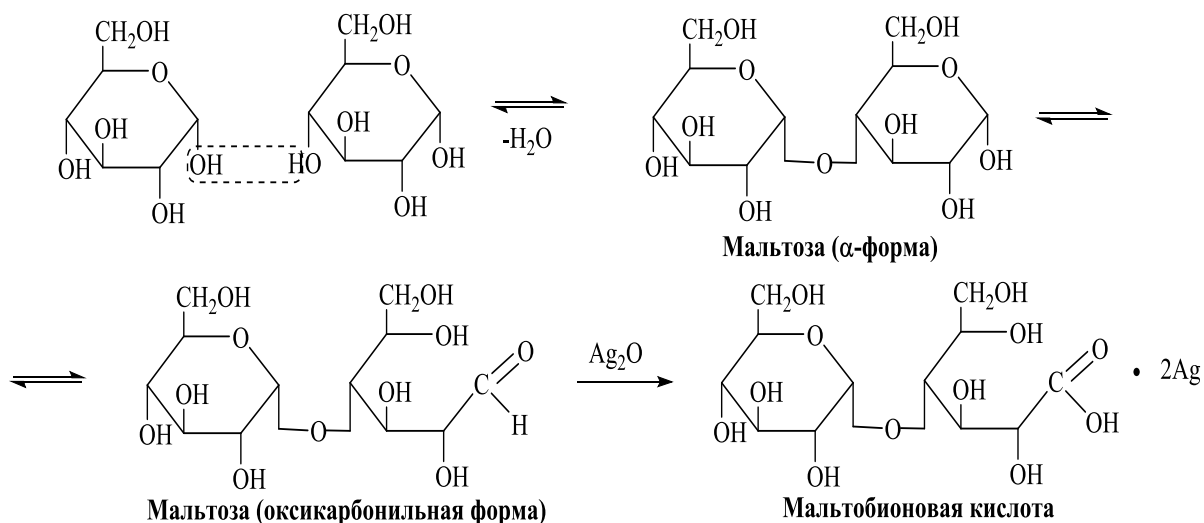
Невосстанавливающие дисахариды образуются так, что вода выделяется за счет гликозидных гидроксильных групп обоих моносахаридов, как показано выше.

В дисахаридах такого типа нет гликозидного гидроксила, поэтому они не восстанавливают оксиды серебра и меди (II) и называются невосстанавливающими дисахаридами. Рассмотрим подробнее каждый из типов дисахаридов.

Восстанавливающие дисахариды.

Важнейшими восстанавливающими дисахаридами являются мальтоза, целлюлоза и лактоза. Благодаря наличию гликозидного гидроксила они способны к таутомерным превращениям. Это проявляется в мутаротации растворов и в том, что они вступают в химические реакции, характерные для моносахаридов (восстановление оксида серебра, образование озаонов и т.д.).

Мальтоза представляет собой замещенную *D*-глюкозу, содержащую в положении «4» остаток α -*D*-глюкопиранозы. Поэтому мальтоза называется 4-(α -*D*-глюкопиранозил)-*D*-глюкопираноза или α -*D*-глюкопиранозил-1,4- α (или β)-*D*-глюкопираноза. Для нее возможны циклические (α - или β -) и открытая (оксикарбонильная) таутомерные формы. При окислении (например, оксидом серебра) альдегидная группа превращается в карбоксильную и получается мальтобионовая кислота:

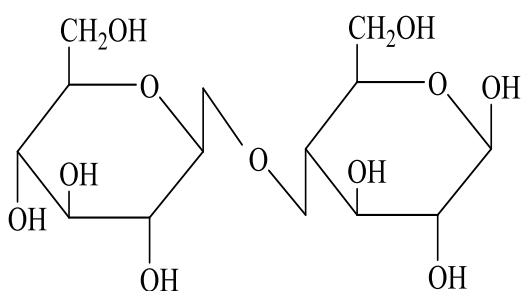


Мальтозу получают в технике при неполном гидролизе крахмала ферментами, содержащимися в солоде (проросшие зерна злаков).

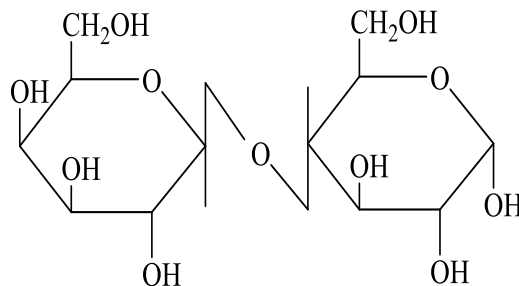
Целлобиоза построена из двух молекул *D*-глюкозы, соединенных β -1,4-гликозидной связью (одна из которых всегда является β -аномером), т.е. является 4-(β -*D*-глюкопиранозил)-*D*-глюкопиранозой. Целлобиоза образуется при неполном гидролизе целлюлозы. При ее окислении образуется целлобионовая кислота.

Лактоза (молочный сахар) состоит из остатков *D*-глюкозы и *D*-галактозы (β -аномер) и представляет собой 4-(β -*D*-галактопиранозил)-*D*-глюкопиранозу, т.е. имеет β -гликозидную связь или β -*D*-галактопиранозил-1,4- α -*D*-глюкопираноза.

В кристаллическом состоянии выделены и α - и β -формы. Лактозу получают из молочной сыворотки после удаления творога. Содержание лактозы в коровьем молоке 4-5%, а в женском – 5,5-8,4%.



Целлобиоза (β -форма)

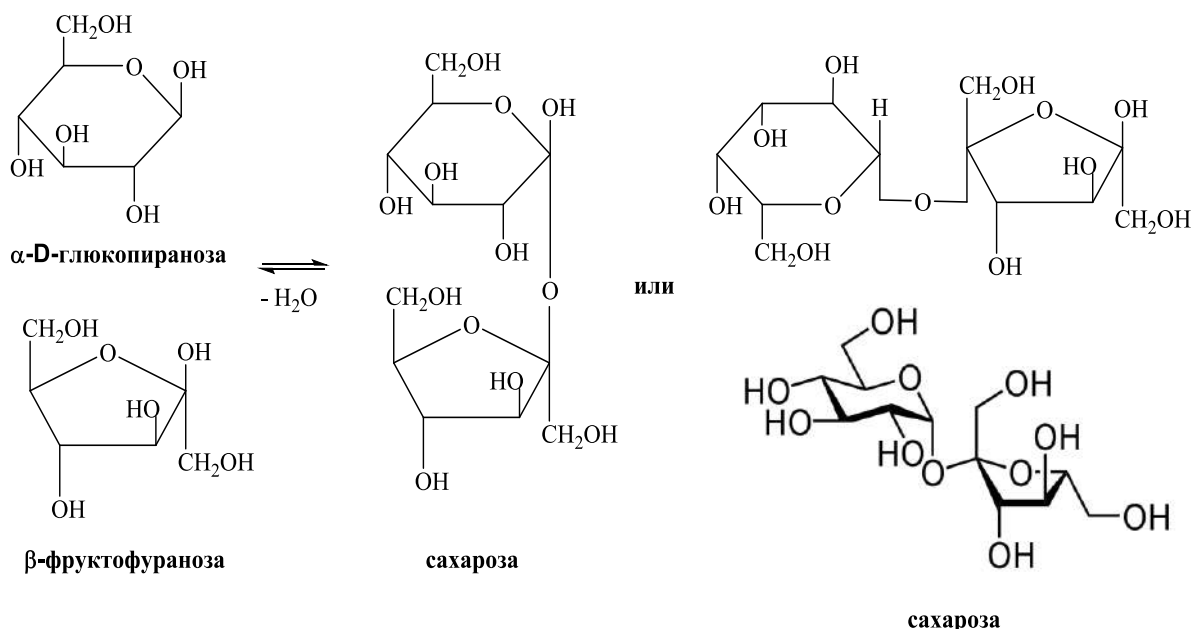


Лактоза (α -форма)

Невосстанавливающие дисахариды.

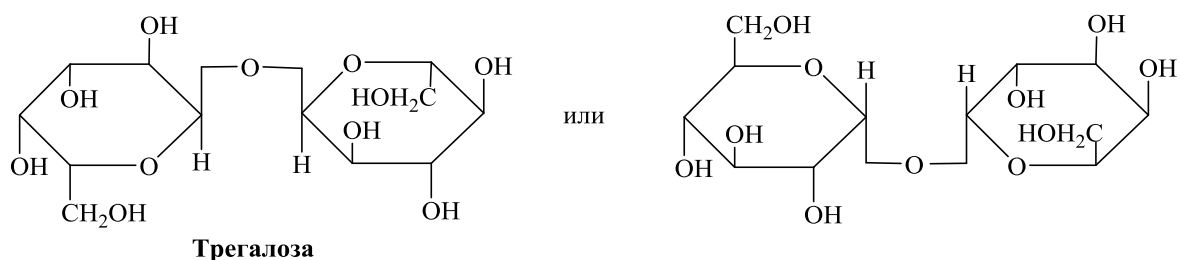
Эти дисахариды не имеют гликозидных гидроксильных групп, поэтому они подобны многоатомным спиртам и способны к реакциям образования простых и сложных эфиров. Они также легко гидролизуются.

Важнейшим и наиболее распространенным дисахаридом этого типа является *сахароза* (свекловичный или тростниковый сахар). Она состоит из остатков α -*D*-глюкозы и β -*D*-фруктозы, поэтому называется α -*D*-глюкопиранозил- β -*D*-фруктофуранозидом (или β -*D*-фруктофуранозил- α -*D*-глюкопиранозидом):



Сахароза очень легко гидролизуется даже в присутствии слабых кислот. При этом образуется смесь равных количеств *D*-глюкозы и *D*-фруктозы. Сахароза содержится в листьях, семенах и плодах растений. Сахарная свекла содержит 16-20% (до 27%), а в стеблях сахарного тростника – 14-26% сахарозы. Она является одним из важнейших пищевых продуктов.

К невосстанавливающимся дисахаридам относится также *трегалоза* (глюкозидоглюкозид) (грибной сахар):



Трегалоза представляет собой белое кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде, не имеет запаха, сладковатая на вкус (сладость трегалозы составляет примерно 45% от сладости сахарозы).

Благодаря $\alpha(1 \rightarrow 1)$ -связи, трегалоза имеет высокую температуру плавления – 203°C, устойчива к кислотному гидролизу при высоких температурах и в сильнокислой среде. Трегалоза впервые была выделена из спорыньи; содержится также в водорослях, дрожжах, высших грибах, лишайниках, в некоторых высших растениях, гемолимфе ряда червей и насекомых.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

СВОЙСТВА ДИСАХАРИДОВ

Цель работы:

- 1) сформировать знания о строении, физических и химических свойствах дисахаридов;
- 2) рассмотреть качественные реакции, подтверждающие наличие гидроксильных и альдегидной групп в молекулах дисахаридов;
- 3) выявить различия в химических свойствах моно- и дисахаридов.

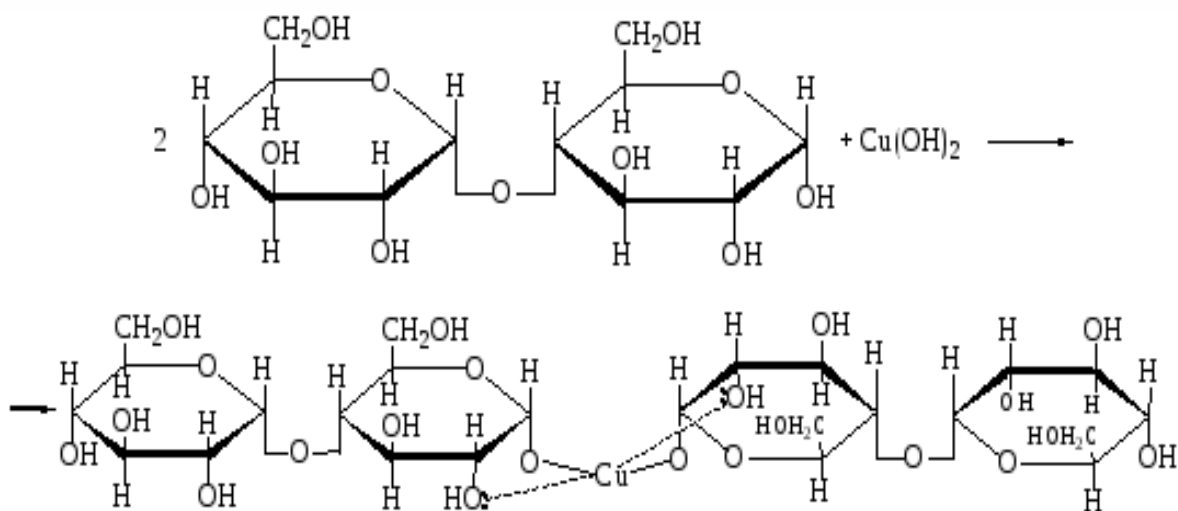
Опыт № 1. Доказательство наличия гидроксильных групп в молекулах дисахаридов

Исследуемый материал: 1%-ные растворы сахарозы, лактозы, мальтозы.

Реактивы: 10%-ный раствор гидроксида натрия, 2%-ный раствор сульфата меди (II).

Приборы: штатив с пробирками.

Ход работы. В три пробирки поместите по 10 капель 1%-ного раствора мальтозы, сахарозы и лактозы соответственно; добавьте в каждую пробирку 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1-2 капли раствора сульфата меди. В присутствии дисахаридов образующийся голубой осадок гидроксида меди (II) растворяется, окрашивая жидкость в голубой цвет:



Напишите уравнения протекающих реакций и приведите вывод.

Опыт № 2. Дисахариды как восстановители

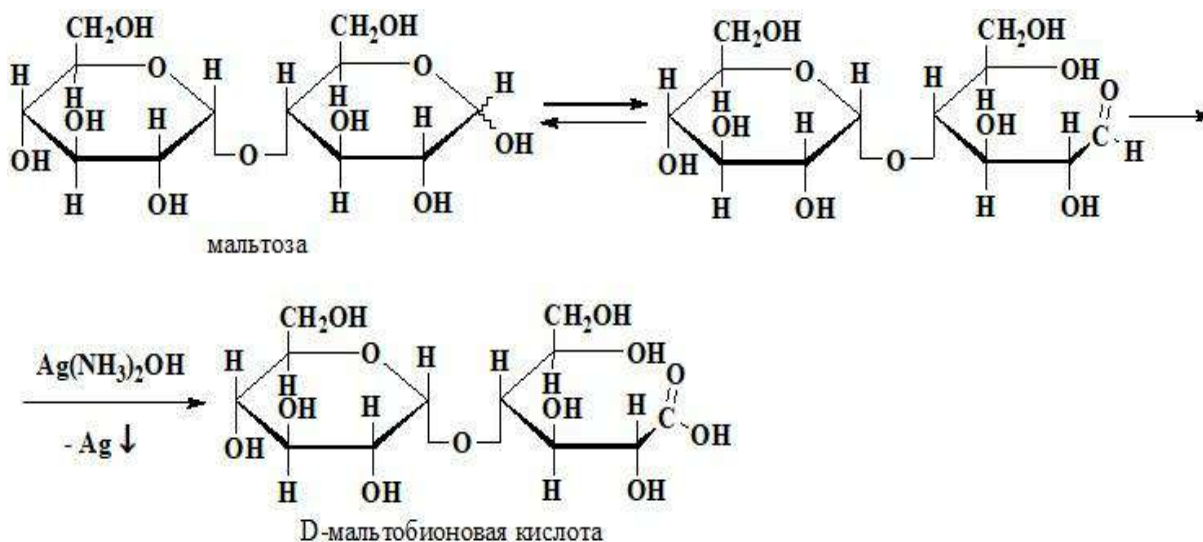
1. Реакция «серебряного зеркала»

Исследуемый материал: 1%-ные растворы сахарозы, лактозы и мальтозы.

Реактивы: реактив Толленса.

Приборы: штатив с пробирками, водяная баня, электрическая плитка.

Ход работы. В пробирку наливают 3 мл аммиачного раствора оксида серебра (реактива Толленса) и добавляют 1,5 мл 1%-ного раствора мальтозы. Пробирку нагревают на водяной бане при температуре 70-80°C, наблюдают выделение металлического серебра на стенках пробирки («серебряное зеркало»). Если пробирка была недостаточно чистой или во время нагревания сильно встряхивалась, серебро выпадает в виде черного осадка:



По такой же методике проводят реакцию аммиачного раствора оксида серебра с 1%-ными растворами лактозы и сахарозы. В случае лактозы реакция протекает аналогично, а в случае сахарозы выделение металлического серебра не наблюдается.

Напишите уравнения протекающих реакций и приведите вывод.

2. Реакция Троммера

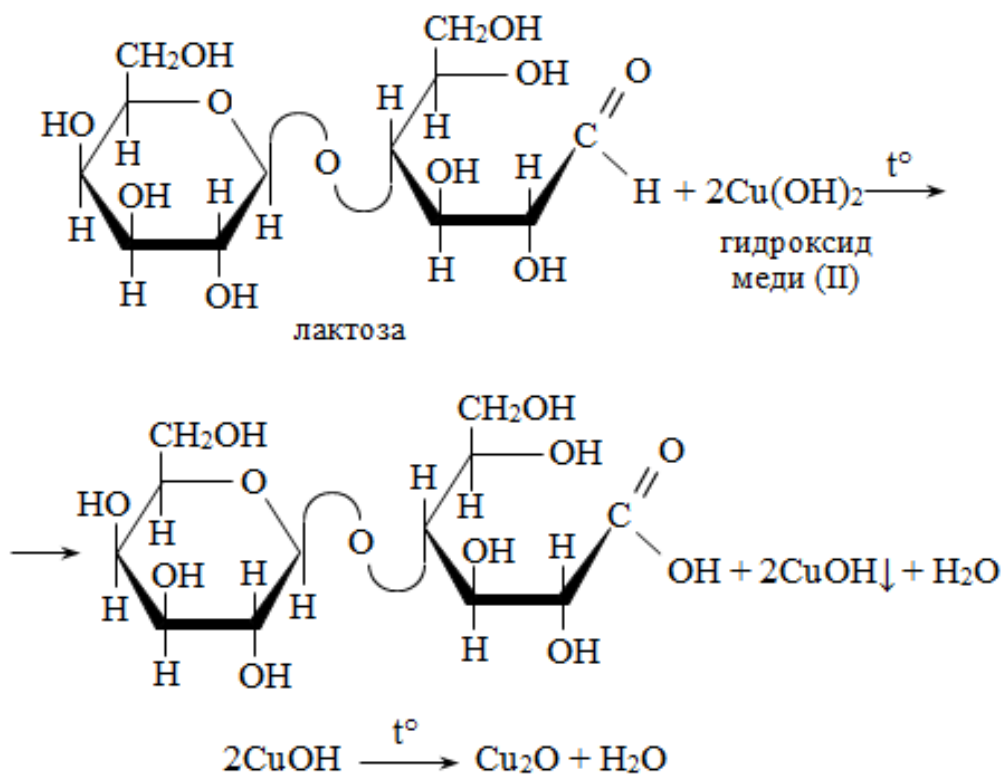
Исследуемый материал: 1%-ные растворы сахарозы, лактозы и мальтозы.

Реактивы: 10%-ный раствор гидроксида натрия, 2%-ный раствор сульфата меди (II).

Приборы: штатив с пробирками, спиртовка.

Ход работы. В пробирку наливают 1-2 мл раствора мальтозы, равный объем раствора гидроксида натрия, и при встряхивании добавляют 1-2 капли раствора сульфата меди. В присутствии мальтозы образующийся осадок гидроксида меди (II) растворяется, окрашивая жидкость в голубой цвет. Верхний слой жидкости нагревают до кипения. Появление желтого [гидроксид меди (I)], а затем красного (оксид меди (I)) осадка указывает на положительную реакцию Троммера.

По такой же методике проводят реакцию Троммера с 1%-ными растворами лактозы и сахарозы. В случае лактозы реакция протекает аналогично, а в случае сахарозы выделение красного осадка оксида меди (I) не наблюдается.



Опыт № 3. Качественная реакция на сахарозу

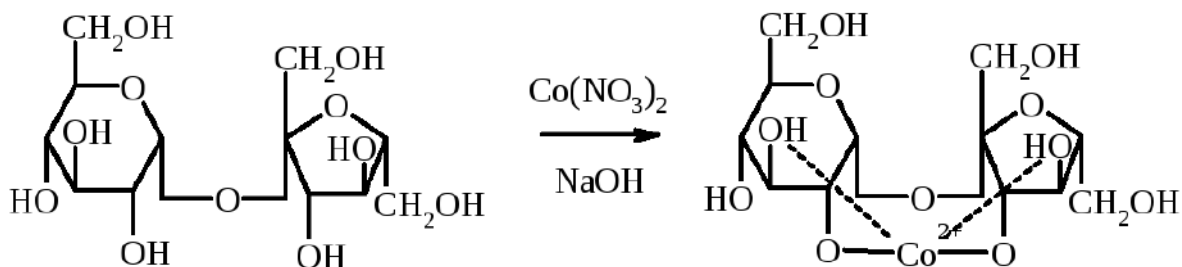
Исследуемый материал: 1%-ный раствор сахарозы.

Реактивы: 2%-ный раствор нитрата (или сульфата) кобальта, 10%-ный раствор гидроксида натрия.

Приборы. Штатив с пробирками.

Ход работы. В пробирку наливают 2-3 мл раствора сахарозы, приливают несколько капель раствора нитрата (или сульфата) кобальта.

При дальнейшем прилипании к смеси 1 мл раствора щелочи (избыток) жидкость окрашивается в фиолетовый цвет:



Напишите уравнения протекающих реакций и приведите вывод.

Опыт № 4. Гидролиз сахарозы

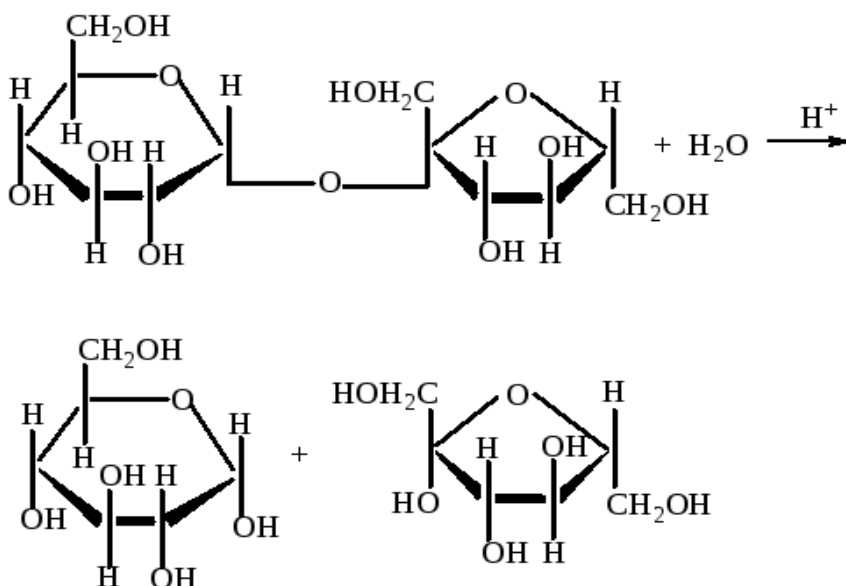
Исследуемый материал: 2%-ный раствор сахарозы.

Реактивы: 20%-ный раствор серной кислоты, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 2%-ный раствор сульфата меди (II), реактив Фелинга, раствор сахарозы (10 г дрожжей гомогенизируют в 100 мл воды).

Приборы: штатив с пробирками, водяная баня, термометр, спиртовка.

Ход работы. 1) Кислотный гидролиз сахарозы

В пробирку с 5 каплями раствора сахарозы добавьте 1 каплю разбавленного 20%-ного раствора серной кислоты и смесь нагрейте на пламени спиртовки. После этого прибавьте 1 каплю 2%-ного раствора сульфата меди (II) и избыток раствора гидроксида натрия. Зачем нужно добавлять именно избыток щелочи? Что наблюдается? Что произошло с сахарозой?



Объясните изменение окраски, напишите уравнения реакций и приведите вывод.

2) *Ферментативный гидролиз сахарозы*

В пробирку налить 4-5 мл раствора сахарозы и добавить 2 мл раствора сахаразы. Поставить пробирку на водяную баню, нагретую до температуры 37°C на 20 минут. Затем добавить 1 мл жидкости Фелинга и нагреть смесь на спиртовке до кипения. Изменяется ли окраска смеси?

Объясните изменение окраски, напишите уравнения реакций и приведите вывод.

3.3. ПОЛИСАХАРИДЫ

Краткие теоретические сведения

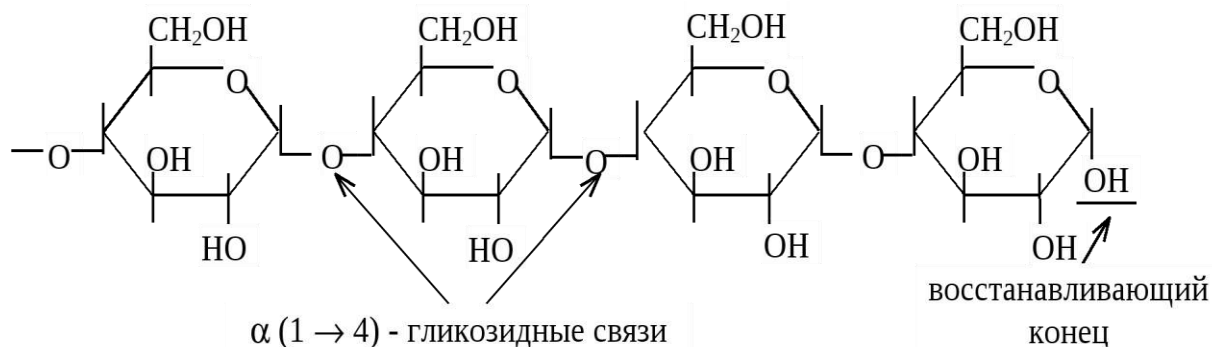
Полисахариды, построенные из моносахаридных звеньев одного типа, называются гомополисахаридами или гомогликанами. Наиболее распространенными из них являются *крахмал, гликоген и целлюлоза*, часто называемая клетчаткой.

Крахмал – это второй по распространенности в природе (после целлюлозы) полисахарид. Он накапливается во многих частях растений, но особенно много крахмала в семенах и клубнях, где его содержание может достигать 40-80%. В больших количествах крахмал содержится в зерне злаковых культур, картофеля, бобовых и других растениях. Так, в зерне риса содержание крахмала от 75 до 80%, в зерне пшеницы, ржи, овса, кукурузы – от 50 до 75%, в горохе – в среднем 34%, в фасоли – 44%, в сое – 3%.

Крахмал – это главный усвояемый человеком углевод. На его долю приходится 80% всех потребляемых человеком углеводов. Мономером глюкозы является α -D-глюкопираноза, из которой формируются два полимерных соединения: линейной формы – *амилоза*, и разветвленной – *амилопектин*. Крахмал, таким образом, не является химически индивидуальным соединением и состоит из структурных фрагментов двух полисахаридов – амилозы (10-20%) и амилопектина (80-90%), которые различаются по строению и свойствам.

Амилопектин с трудом растворяется в горячей воде с образованием вязкого клейстера, который при охлаждении переходит в студнеобразное состояние. Амилоза хорошо растворяется в теплой воде, и это различие в растворимости используется для отделения амилозы от амилопектина. Молекулярная масса амилозы составляет $(1,0-4,0) \cdot 10^5$, а у амилопектина она значительно выше и может достигать значений $1,0 \cdot 10^6 \dots 5,0 \cdot 10^8$.

В амилозе α -D-глюкопиранозные фрагменты связаны между собой α -1,4-О-гликозидными связями, причем полисахаридная цепь не содержит разветвленных участков (точек ветвления). В этом смысле структуру амилозы определяют, как линейную:



По данным рентгеноструктурного анализа макромолекула амилозы свернута в спираль (см. рис. 2). Шаг спирали составляет 10,6 Å и на каждый виток спирали приходится 3 остатка глюкозы. Максимальная длина амилозы достигает 7000 Å. В водном растворе спираль сжимается за счет увеличения витка, в котором уже участвует 6 остатков глюкозы:

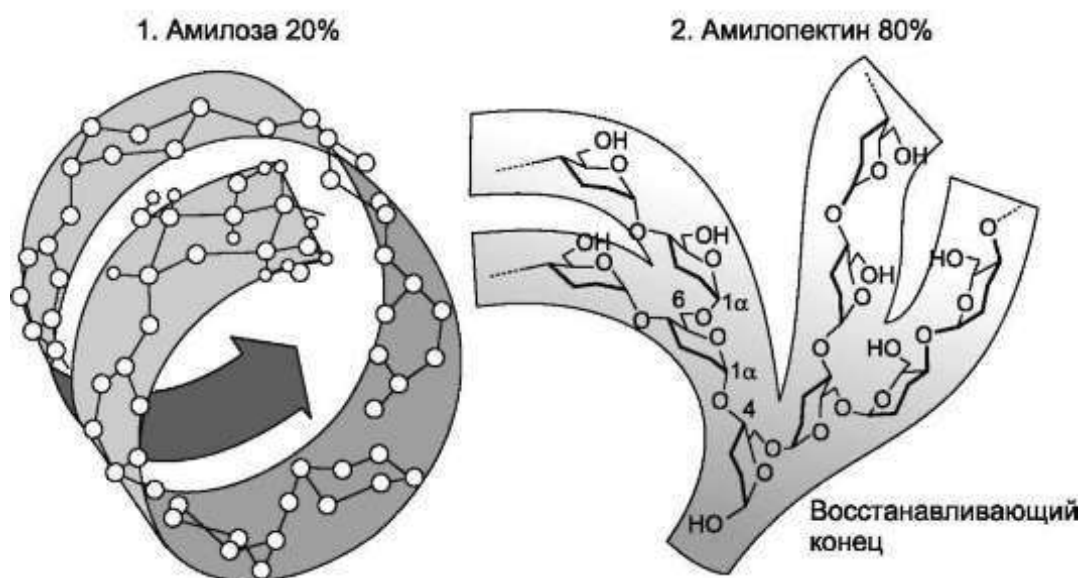
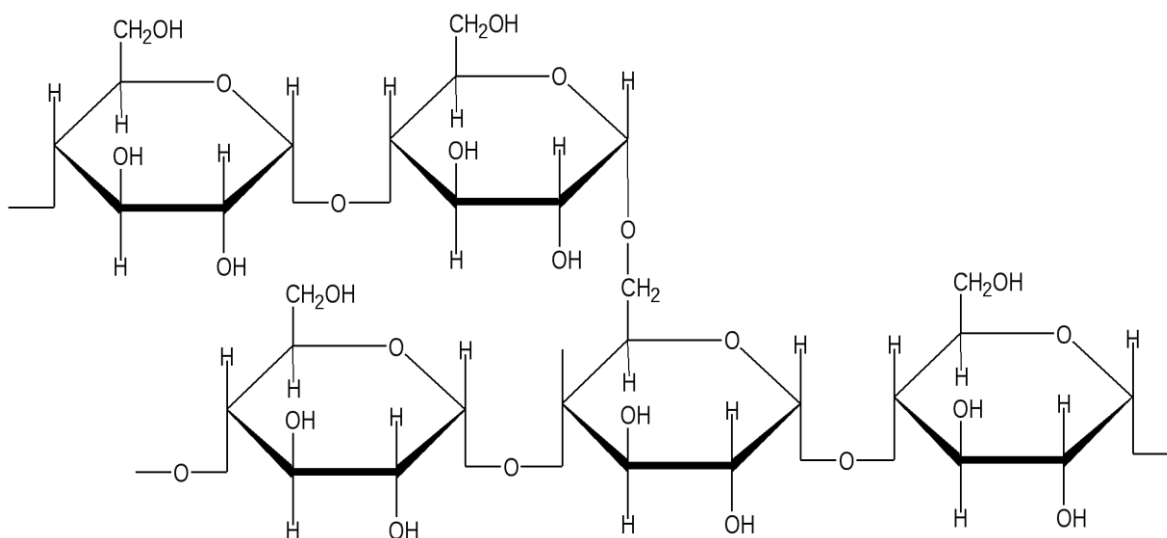


Рисунок 2. Макромолекулы амилозы и амилопектина

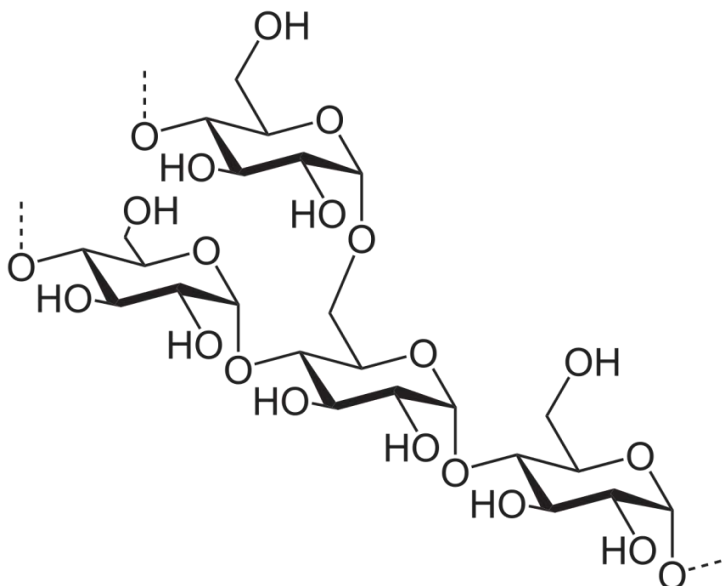
Во внутренний канал спирали могут входить соответствующие по размеру молекулы, например, молекулы йода, образуя комплексы, называемые соединениями включения. Комплекс амилозы с йодом имеет синий цвет. Это используется в аналитических целях для обнаружения как крахмала, так и йода.

Амилопектин имеет разветвленное строение. Его молекула состоит из большого числа коротких цепочек, содержащих около 20-30 моносахаридных фрагментов. В пределах короткой цепочки остатки

глюкозы соединены α -1,4-О-гликозидными связями. Короткие цепи связаны между собой α -1,6-О-гликозидными связями. Количество α -1,6-связей составляет 4-5% от суммы α -1,4- и α -1,6-связей в амилопектине:



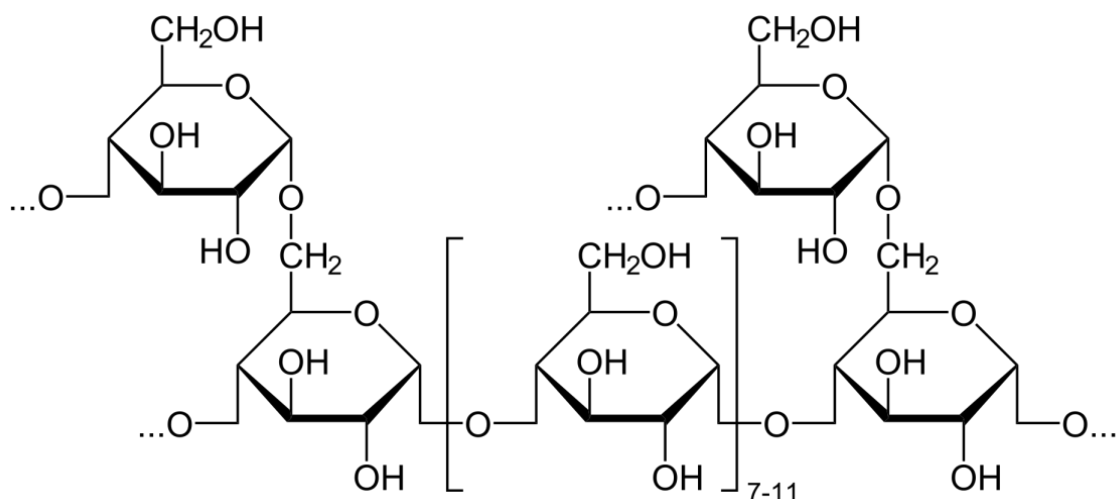
При полимеризации α -D-глюкоза находится в конформации «кресла»:



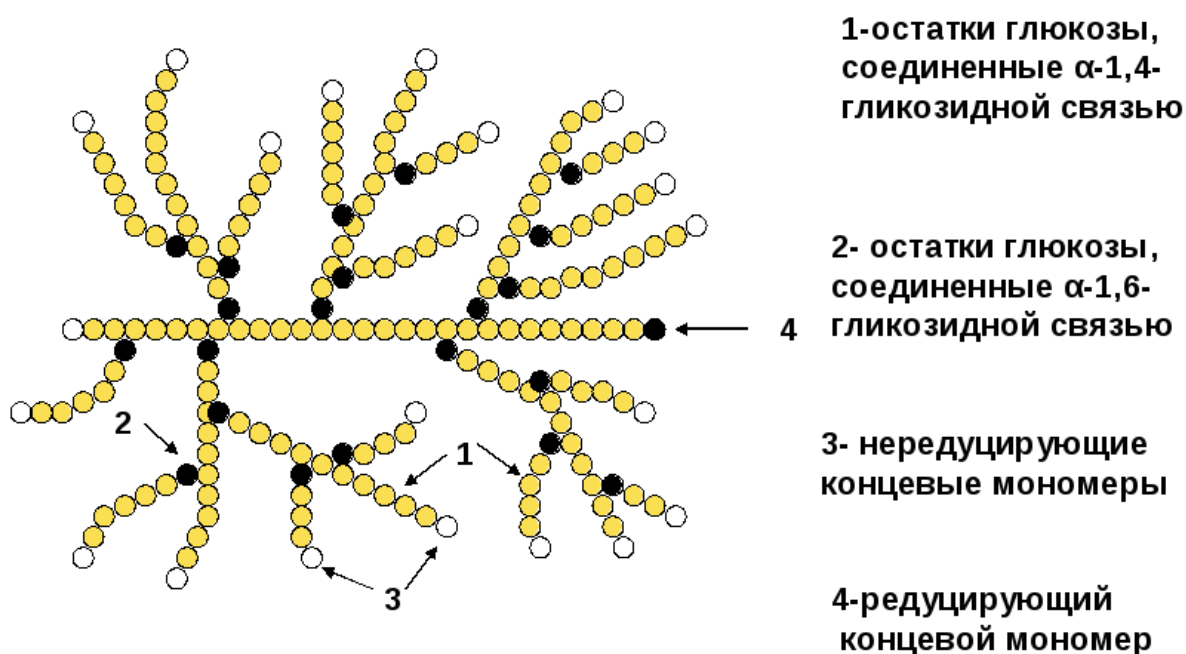
Установлено, что в состав амилопектина входит от 0,012 до 0,111% фосфора, который, вероятнее всего, через фрагменты фосфорной кислоты присоединяется по положению С6.

Гликоген – это полисахарид животного происхождения, являющийся резервным питательным веществом в организме человека и животных. Гликоген имеет строение, близкое к амилопектину. Различие состоит в том, что в молекуле гликогена короткая полипептидная

цепь состоит всего из 10-14 остатков α -D-глюкопиранозы, соединенных α -1,4-О-гликозидными связями. В точках ветвления линейные фрагменты соединяются α -1,6-О-гликозидными связями:



По-видимому, структура гликогена основана на строгой регулярности ветвления, что и определяет компактность молекулы. Так как длина цепей небольшая, то быстро наступает предел ветвления:

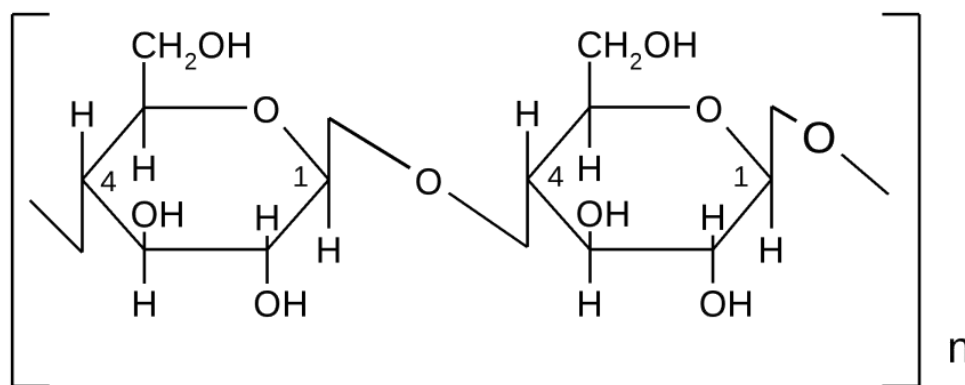


Гликоген в отличие от крахмала легко растворяется в воде и окрашивается йодом от красного до красно-фиолетового цвета. Различие в окраске обусловлено длиной внешней цепи: чем она короче, тем ближе окраска к цвету йода.

Целлюлоза – наиболее распространенный в природе полисахарид, на долю которой приходится 50% всего органического углерода в биосфере. Целлюлоза – главный структурный элемент клеточных стенок растений и самих растений в целом. Содержание целлюлозы в природных материалах колеблется в широких пределах. Например, волокна семян хлопчатника (собственно хлопок) более чем на 98% состоят из целлюлозы, в древесине ее содержание может быть от 39,4% (береза) до 58% (ель). Целлюлоза присутствует и в листьях растений, хотя ее количество там меньше, чем в стеблях и стволах.

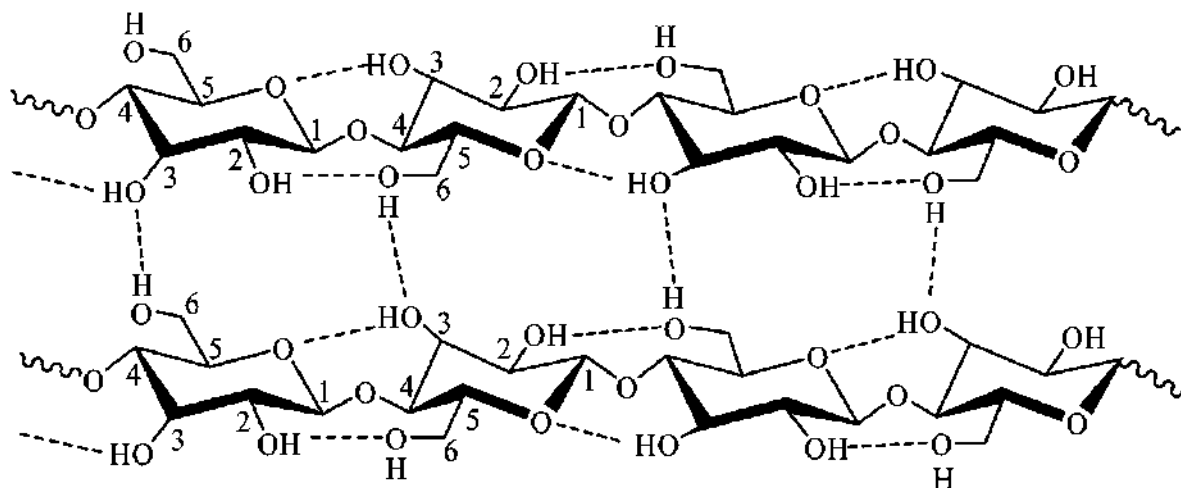
Целлюлоза относится к неусвояемым углеводам, но она крайне важна для пищеварения и составляет так называемые пищевые волокна. Они стимулируют функции кишечника, препятствуют развитию болезнетворных микроорганизмов. Суточная доза пищевых волокон 20-25 г.

Целлюлоза – это линейный полимер, состоящий из β -D-глюкопиранозных остатков, соединенных между собой β -1,4-О-гликозидными связями:



Фрагменты β -D-глюкозы в молекуле целлюлозы повернуты относительно друг друга на 180° , что способствует образованию водородных связей между пиранозным кислородом одного фрагмента и гидроксильной группой при C3 соседней β -D-глюкозы.

Такие водородные взаимодействия стабилизируют линейную структуру молекулы целлюлозы, препятствуя вращению расположенных рядом остатков глюкозы вокруг связывающей их О-гликозидной связи. В результате формируется жесткая линейная структура, определяющая высокую механическую прочность, устойчивость к химическому и ферментативному гидролизу нативной целлюлозы.



Между отдельными молекулами целлюлозы также возникают водородные взаимодействия по всей длине линейной молекулы. В результате объединения 10-100 молекул образуется элементарная фибрилла диаметром около 4 нм. Примерно 20 таких элементарных фибрилл формируют микрофибриллу. В пределах микрофибриллы отдельные цепочки молекул целлюлозы начинаются и заканчиваются в различных местах, что позволяет микрофибрилле достигать в длину сотен мкм, но при этом все молекулы целлюлозы в микрофибриллах ориентированы одинаково, т.е. редуцирующие концы всех цепочек находятся с одной стороны.

Отсутствие возможности спирализации приводит к отсутствию комплекса йод-целлюлоза и характерного синего окрашивания.

Молекулярная масса целлюлозы, определяемая числом структурных единиц $C_6H_{10}O_5$, зависит от природы источника и способа ее выделения. Обычно молекулы целлюлозы содержат не менее 10⁴ остатков глюкозы (молекулярная масса от $1,0 \cdot 10^5$ до $1,0 \cdot 10^6$ и выше).

При воздействии химических реагентов, разрушающих водородные взаимодействия, например концентрированного раствора хлористого цинка, молекула целлюлозы переходит в амилоидное состояние, что проявляется в появлении синей окраски с йодом.

Гидролиз крахмала. Гликаны способны гидролизоваться под действием катализатора – минеральной кислоты. Кислотный гидролиз длительное время был главным при получении глюкозы из крахмала. Предполагают, что под действием кислот сначала происходит ослабление и разрыв связей между молекулами амилозы и амилопектина.

Это сопровождается нарушением структуры крахмальных зерен и образованием гомогенной массы. Далее идет разрыв α -1,4- и α -1,6-О-гликозидных связей по схеме гомогенного кислотного катализа.

Кислотный гидролиз крахмала происходит ступенчато. На первых стадиях гидролиза получают высокомолекулярные декстрины, которые мало отличаются от крахмала по размерам молекулы и свойствам. С йодом дают синюю или фиолетовую окраску. По мере протекания гидролиза молекулярная масса декстринов уменьшается, увеличиваются их редуцирующие свойства. Изменяется и цветовая окраска с йодом. Поскольку характерный синий цвет связан с образованием комплексов йода с пиранозным кислородом внутри полигликозидной спирали, то с уменьшением длины полисахаридной цепи резко снижается их способность к спирализации, а соответственно наблюдается изменение окраски.

Различают следующие типы промежуточных декстринов:

1. *Амлодекстрины*, окрашивающиеся раствором йода в фиолетово-синий цвет и представляющие собой белый порошок, растворимый в 25% растворе этанола и осаждаемый 40%-ным раствором спирта.

2. *Эритродекстрины*, окрашивающиеся йодом в красно-бурый цвет, растворяются в 55%-ном растворе этанола, но осаждаются при его концентрации 65%, из теплых спиртовых растворов кристаллизуются в виде сферокристаллов.

3. *Ахродекстрины*, не окрашивающиеся йодом, растворимые в 70%-ном растворе этилового спирта, кристаллизуются при упаривании горячих спиртовых растворов.

4. *Мальтодекстрины* не дают окраски с йодом и не осаждаются спиртом. Мальтодекстрины фактически представляют собой дисахарид мальтозу.

Конечным продуктом кислотного гидролиза крахмала является D-глюкоза.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

СВОЙСТВА ПОЛИСАХАРИДОВ

Цель работы:

- 1) сформировать знания о строении, физических и химических свойствах полисахаридов;
- 2) провести качественную реакцию с раствором Люголя на гликоген, клетчатку и крахмал;
- 3) провести кислотный гидролиз крахмала;
- 4) по изменению окраски исследуемых растворов показать ступенчатый характер гидролиза, протекающего через образование декстринов различной молекулярной массы;
- 5) выделить гликоген из печени животного.

Опыт № 1. Отношение крахмала к воде

Исследуемый материал: крахмал (порошок).

Реактивы: вода дисиллированная.

Оборудование: штативы с пробирками, пипетки, спиртовка.

Ход работы. В пробирку с 1 мл воды поместите на кончике шпателя сухого крахмала. Содержимое пробирки взболтайте. Растворяется ли крахмал в воде при комнатной температуре? Содержимое пробирки порциями залейте при перемешивании в стакан с 5 мл горячей воды. При этом образуется крахмальный клейстер.

Сделайте вывод о растворимости крахмала в холодной и горячей воде.

Опыт № 2. Отношение крахмала к гидроксиду меди (II)

Исследуемый материал: 1%-ный раствор крахмала.

Реактивы: 10%-ный раствор гидроксида натрия, 2%-ный раствор сульфата меди (II).

Оборудование: штативы с пробирками, пипетки, спиртовка.

Ход работы. В пробирку вносят 5 капель крахмального клейстера, одну каплю сульфата меди (II) и 5 капель раствора гидроксида натрия. Смесь нагревают на пламени спиртовки, не доводя до кипения. Отметьте наблюдаемые в этом опыте явления и приведите вывод.

Опыт № 3. Качественные реакции на крахмал

Исследуемый материал: 1%-ный раствор крахмала.

Реактивы: реактив Люголя (водный раствор йода в иодиде калия).

Оборудование: штативы с пробирками, пипетки на 2 мл.

Ход работы. Для проведения качественной реакции на крахмал к 1 мл 1%-ного раствора крахмала добавить 2 капли раствора Люголя. Раствор окрашивается в синий цвет. При нагревании раствор обесцвечивается, а при охлаждении окраска восстанавливается.

Объясните полученные результаты и приведите вывод.

Опыт № 4. Гидролиз крахмала

Исследуемый материал: 1%-ный раствор крахмала, печень животного.

Реактивы: 10%-ный раствор серной кислоты, раствор Люголя, 5%-ный раствор трихлоруксусной кислоты, концентрированный раствор хлористого цинка.

Оборудование: пробирки, пипетки, водяная баня, электроплитка, фарфоровая ступка с пестиком, воронка, бумажный фильтр.

Порядок выполнения работы (вариант А).

1) В 8 пронумерованных пробирок наливают по 5 мл дистиллированной воды и по 1 капле раствора йода в йодистом калии.

2) В сухую и чистую пробирку приливают 5 мл 1%-ного раствора крахмала и 1 мл 10%-ного раствора серной кислоты. Смесь помещают в кипящую водяную баню. Через 2-3 минуты из пробирки берут пипеткой немного содержимого и выливают в одну из пробирок с раствором йода. Появляется синяя окраска. Спустя 1-2 минуты процедуру повторяют: несколько капель из пробирки с крахмалом переносят пипеткой в пробирку с раствором йода. Наблюдают изменение синей окраски. Операцию повторяют с интервалом 1-2 минуты до появления в одной из пронумерованных пробирок светло-желтой окраски, характерной для йода.

Полученная таким образом шкала окрашенных растворов свидетельствует о многостадийном, ступенчатом характере гидролиза крахмала. Сначала образуются амилодекстрины (фиолетовая окраска с йодом), затем эритродекстрины (вишневая окраска), далее ахродекстрины и мальтодекстрины, уже не дающие окраски с йодом.

Порядок выполнения работы (вариант Б).

Печень животного в количестве около 0,5 г помещают в фарфоровую ступку, добавляют 3 мл 5%-ного раствора трихлоруксусной кислоты для осаждения белков и растирают пестиком в течение 10 минут, после чего приливают 5 мл дистиллированной воды, суспензию перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, смоченный водой. К фильтрату прикапывают раствор Люголя, появляется красное бурое окрашивание, соответствующее комплексу йод-гликоген.

Порядок выполнения работы (вариант В).

На небольшой кусочек фильтровальной бумаги (фильтровальная бумага является почти чистой клетчаткой) наносят на некотором расстоянии каплю раствора йода в йодистом калии и каплю раствора йода в хлористом цинке. Отметить изменения, произошедшие при проведении реакций.

Объясните полученные результаты, напишите уравнения реакции и приведите выводы.

Опыт № 5. Растворение целлюлозы

Целлюлоза нерастворима в воде, спирте и других обычных растворителях. Она растворяется в концентрированных растворах некоторых солей (ZnCl_2 , SnCl_2 и др.), а также в некоторых щелочных жидкостях, например, аммиачном растворе гидрата окиси меди (реактив Швейцера).

Исследуемый материал: хлопковая вата.

Реактивы: реактив Швейцера, концентрированная серная кислота, дистиллированная вода.

Оборудование: пробирки, пипетки, стакан, стеклянная палочка.

Ход работы. В пробирку наливают 4-5 мл реактива Швейцера, погружают в него небольшой кусочек хлопковой ваты (или измельченной фильтровальной бумаги) и помешивают стеклянной палочкой до растворения. Получается прозрачная густая вязкая жидкость. В стеклянный стакан с 50 мл тёплой воды, подкисленной 2-3 мл концентрированной серной кислоты, выливают тонкой струёй раствор целлюлозы. Целлюлоза выделяется из раствора в виде нитей. Объяснить полученные результаты и привести вывод.

Опыт № 6. Гидролиз целлюлозы

При кислотном гидролизе целлюлозы образуется β -D-глюкоза.

Исследуемый материал: хлопковая вата, фильтровальная бумага.

Реактивы: 72%-ный раствор серной кислоты, 40%-ный раствор гидроксида натрия, реактив Фелинга, вода дистиллированная.

Оборудование: пробирки, пипетки, стакан, стеклянная палочка, водяная баня, электроплитка.

Ход работы. В пробирку помещают кусочек хлопковой ваты (или измельченной фильтровальной бумаги), заливают его 72%-ным раствором серной кислоты, растирают стеклянной палочкой в течение 20 минут, после чего раствор осторожно разводят водой в 3 раза, тщательно перемешивают и выдерживают в кипящей водяной бане 30 минут. После этого раствор охлаждают, перемешивают, берут $\frac{1}{4}$ объема гидролизата с остатками ваты, нейтрализуют 40%-ным раствором гидроксида натрия и проводят реакцию Фелинга. Положительная реакция свидетельствует о том, что при гидролизе целлюлозы образуется восстанавливающий сахар – β -D-глюкоза.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

Вопросы для самоконтроля

1. Что представляет собой крахмал? В каких органах растений он накапливается?
2. Из каких фракций состоит крахмал? Укажите различия и черты сходства между этими фракциями.
3. В чем заключаются особенности качественной реакции на крахмал с йодом?
4. Какими свойствами обладают редуцирующие (восстанавливающие) сахара?
5. Какие функциональные группы сахаров обеспечивают их способность к окислению?
6. Приведите примеры дисахаридов, которые относятся к редуцирующим.
7. Каков химизм реакции с реактивом Фелинга? В каком случае образуется красный осадок?
8. Будет ли сахароза вступать в реакцию с реактивом Фелинга?

9. Приведите структурную формулу *D*-рибозы и 2-дезоксид-*D*-рибозы. Какова их биологическая роль?
10. Напишите уравнение реакции *D*-галактозы с гидроксидом меди (II).
11. Напишите уравнение реакции гидролиза сахарозы и мальтозы.
12. Напишите химические формулы олигосахаридов, которые получают при ферментативном гидролизе крахмала.
13. Приведите качественную реакцию на крахмал и гликоген.
14. Напишите химические структуры амилозы и амилопектина.
15. Какой дисахарид образуется при гидролизе целлюлозы? Напишите уравнение реакции.

4. ФЕРМЕНТЫ

Краткие теоретические сведения

Все химические реакции, происходящие в клетке, протекают под действием биологических катализаторов, которые называются ферментами (энзимами). Они присутствуют в тканях и клетках всех живых организмов и способны существенно ускорять протекающие в них химические реакции. *Ферменты (энзимы)* – это биологические катализаторы, имеющие преимущественно белковой природы. Однако в 80-х годах XX века были обнаружены ферменты рибонуклеотидной природы – рибозимы.

Ферменты по составу делятся на простые (однокомпонентными) и сложные (двухкомпонентные). *Простые ферменты* являются белками и состоят только из остатков аминокислот (например, ферменты 3 класса – гидролазы). *Сложные ферменты* состоят из белкового компонента (*апофермента*) и небелкового (*кофактора*). Кофактор может быть неорганической (ионы металлов) или органической природы. В зависимости от прочности связи с апоферментом они делятся на *простетические группы*, (они прочно, ковалентно, связаны с апоферментом, (например, ФАД, ФМН, биотин, липоевая кислота) и *коферменты* (они слабо, нековалентно, связаны с апоферментом, например, НАД⁺, НАДФ⁺).

Один и тот же кофермент, взаимодействуя с различными апоферментами, может участвовать в разных химических превращениях субстрата. В состав коферментов входит большинство водорастворимых витаминов. В целом сложный фермент (апофермент + кофактор) называется *холоферментом*.

Более 25% всех ферментов для проявления полной каталитической активности нуждается в ионах металлов. Ионы металлов выполняют в ферментах разнообразные функции. Одни непосредственно участвуют в каталитическом акте, другие стабилизируют активный центр или поддерживают конформацию молекулы фермента; ионы двухвалентных металлов могут стабилизировать фермент-субстратный комплекс.

В отличие от большинства катализаторов неорганической природы ферменты обладают более *высокой эффективностью* и *специфичностью* действия. В то время как небелковые катализаторы обычно ускоряют реакции в 10 - 10^3 раз, степень ускорения реакций под действием ферментов составляет 10^6 - 10^{12} . Один и тот же неорганический катализатор может быть использован для ускорения многих реакций, в которых участвуют самые разнообразные вещества.

Что же касается ферментов, то они воздействуют либо только на один субстрат (*абсолютная субстратная специфичность*), либо на определенный класс субстратов (*относительная субстратная специфичность*). Например, уреазы катализируют только гидролиз мочевины, а пепсин – только гидролиз белков. Субстратная специфичность объясняется пространственным соответствием активного центра фермента и его субстрата.

Молекула фермента (E) взаимодействует с субстратом (S) не всей своей поверхностью, а определенными участками. На поверхности фермента различают: *активный и аллостерический центры*.

Активный центр – это участок фермента, который взаимодействует с субстратом. Их может быть 2, 4, 6, 8 и в каждый входят 7-15 аминокислот. Наиболее часто в состав активных центров ферментов входят функциональные группы таких аминокислот:

- OH – группы серина, треонина, тирозина;
- SH – группы цистеина;
- NH – группа гистидина;
- COOH – группы глутамата и аспартата;
- NH_2 – группы аргинина и лизина.

В сложных ферментах в активный центр входят кофакторы (небелковые компоненты): простетические группы, коферменты, ионы металлов. Активный центр является комплементарным к строению (S), имеется соответствие (комплементарность) E и S как «ключа и замка».

В структуре активного центра выделяют два участка:

- *контактный* («якорный»), который связывается с субстратом;
- *каталитический*, в состав которого входят химические группы, принимающие непосредственное участие в преобразовании субстрата ($-\text{OH}$, $-\text{SH}$, $=\text{N}$, $-\text{NH}_3^+$, COOH).

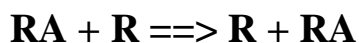
Алlostерический центр (*allos* – другой, *steros* – пространственный), с которым взаимодействуют алlostерические регуляторы (эффекторы, модуляторы). Алlostерические эффекторы могут быть позитивными (активаторами), которые повышают каталитическую активность фермента или негативными (ингибиторами), которые ее снижают.

При взаимодействии алlostерического центра с эффекторами происходят конформационные изменения активного центра фермента, что приводит к увеличению или снижению его активности. Ферменты, имеющие алlostерический центр, называются *регуляторными*.

В настоящее время известно более 4000 ферментов. Современные классификация и номенклатура ферментов были разработаны Комиссией по ферментам Международного биохимического союза и утверждены на V Международном биохимическом конгрессе в 1961 г. в Москве. Основой принятой классификации является *тип катализируемой реакции*, который является специфичным для действия любого фермента. Согласно Международной классификации, ферменты делят на *шесть главных классов*:

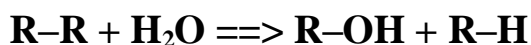
1) **оксидоредуктазы**: катализируют окислительно-восстановительные процессы (дегидрогеназы, оксидазы, цитохромы);

2) **трансферазы**: катализируют обратимые реакции внутримолекулярного или межмолекулярного переноса атомов или группы атомов:



Трансферазы участвуют в реакциях метаболизма, связывающих процессы обмена углеводов, белков и липидов. Название фермента они берут от группы, которую переносят (метилтрансферазы, сульфотрансферазы, аминотрансферазы, фосфотрансферазы, ацилтрансферазы);

3) **гидролазы**: катализируют реакции гидролиза, т.е. расщепление субстрата с участием воды (пептидазы, эстеразы, фосфатазы, гликозидазы):



4) **лиазы**: катализируют реакции расщепления ковалентных связей между атомами C, O, N, S негидролитическим путем (декарбоксилазы, альдолазы, дегидратазы);

5) **изомеразы:** катализируют реакции изомеризации (эпимеразы, рацемазы, изомеразы);

6) **лигазы: (синтетазы)** катализируют необратимые реакции синтеза молекул за счет энергии АТФ (АТФ-синтаза, пируваткарбоксилаза).

Внутри основных классов выделяются *подклассы*.

Например, гидролазы по типу гидролизуемых субстратов делятся на ферменты, катализирующие гидролиз эфиров карбоновых кислот (подкласс 3.1), гликозидов (подкласс 3.2), простых эфиров и тиоэфиров (подкласс 3.3), пептидов (подкласс 3.4) и т.д.

В свою очередь подклассы делятся на подподклассы, а внутри подподклассов каждый фермент получает порядковый номер. В соответствии с этим каждому ферменту присваивается четырехзначный цифровой шифр. Например, шифр ацетилхолинэстеразы КФ 3.1.1.7, где КФ – классификация ферментов, шифр алкогольдегидрогеназы – КФ 1.1.1.1. Разделение ферментов на классы строгое и не допускает произвольного изменения номеров.

Общепринятыми являются названия ферментов с окончанием «аза», прибавляемым к названию субстрата, превращение которого ускоряется данным ферментом. Например, амилаза от греч. *Amylon* – крахмал, или липаза от греч. *Lypos* – жир и т.д.

Ферменты, кроме того, имеют названия, которые разделяются на *рабочие и систематические*. Рабочее название образуется из объединения названия субстрата, типа реакции и окончания «-аза». Например, лактат + дегидроген(изация) + аза = лактатдегидрогеназа.

Систематическое название фермента формируется следующим образом: (название субстратов (через дробь), название типа химического превращения + аза). Лактатдегидрогеназа будет иметь систематическое название «L-лактат : NAD + оксидоредуктаза».

Ферменты **термолабильны**, поэтому нагревание до температуры 70-80°C приводит к инактивации большинства из них за счет денатурации – разрушения вторичной и третичной структуры белка, т.е. потери пространственной конфигурации молекулы фермента, в том числе его активного центра.

Ферменты *чувствительны также к изменению рН среды*, при которой они действуют. Это связано с изменением пространственной конфигурации молекулы фермента при присоединении или отщеплении протонов.

Для каждого из ферментов существуют определенные *оптимальные значения температуры и рН среды*, при которых они проявляют свою максимальную активность. Например, пепсин наиболее активен при рН 1,5-2,0 (кислая среда), а трипсин – при 7,8-8,0 (слабощелочная среда). Если рН среды значительно отличается от оптимума, то фермент полностью или частично теряет свою активность.

Температура и рН относятся к неспецифическим факторам, так как в той или иной мере влияют на активность всех ферментов. Кроме того, существуют специфические факторы, которые в очень низких концентрациях повышают активность ферментов (*активаторы*) или, напротив, снижают ее (*ингибиторы*).

Как правило, ферменты присутствуют в биологических объектах в ничтожно малых концентрациях, поэтому больший интерес представляет не количественное содержание ферментов, а их активность по скорости ферментативной реакции. Скорость реакции измеряется по убыли субстрата или накоплению продукта за единицу времени.

Международная единица активности ферментов соответствует такому количеству фермента, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата за 1 мин в оптимальных для данного фермента условиях. В Международной системе единиц (СИ) единицей активности фермента является *катал (кат)* – количество фермента, необходимое для каталитического превращения 1 моля субстрата за 1 с.

Характеристикой ферментативной реакции является величина «число оборотов фермента», показывающая, сколько молекул субстрата подвергается превращению за единицу времени в расчете на одну молекулу фермента.

Регуляция активности ферментативных реакций многообразна. Она может осуществляться за счет изменения факторов, влияющих на активность фермента, в том числе рН, температуры, концентрации субстратов, активаторов и ингибиторов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 9

СВОЙСТВА ФЕРМЕНТОВ

Цель работы:

- 1) ознакомиться с влиянием различных физических и химических факторов на активность ферментов;
- 2) изучить некоторые ферменты молока и мышечной ткани;
- 3) определить амилазную активность слюны.

Опыт № 1. Термолабильность ферментов

Одним из характерных свойств ферментов является *термолабильность*, т.е. чувствительность фермента к небольшим изменениям температуры среды. Большинство ферментов при нагревании выше температуры 70°C утрачивают свои каталитические свойства – инактивируются. Степень инактивации зависит от длительности теплового воздействия. В термолабильности ферментов можно убедиться при исследовании гидролиза крахмала с помощью *амилазы*.

Исследуемый материал: 1%-ный раствор крахмала на 0,3%-ном растворе хлорида натрия.

Приборы: штатив с пробирками, стакан со льдом, спиртовка, водяная баня с термометром.

Реактивы: разбавленная слюна (предварительно ополаскивают рот дистиллированной водой, затем, набрав в рот приблизительно 20-25 мл дистиллированной воды и продержав ее там, в течение нескольких минут, собирают и фильтруют ее), раствор йода в йодистом калии (реактив Люголя), реактив Фелинга.

Ход работы. В три пробирки наливают по 4 мл 1%-ного раствора крахмала, добавляют по 1 мл раствора слюны и хорошо перемешивают. Первую пробирку прокипятить в течение 3-4 мин, вторую поставить в лед, а третью – в водяную баню с температурой 38°C. Через 20 минут содержимое каждой пробирки разделяют пополам. В первой части провести реакцию с реактивом Фелинга (к раствору добавляют 1 мл реактива Фелинга и нагревают почти до кипения), которая является качественной реакцией на альдегидную группу; во второй – пробу с йодом (качественная реакция на крахмал).

Результаты опыта представить в виде следующей таблицы:

№ пробирки	Температура, °С	Реакция с реактивом Фелинга	Проба с йодом
1	100		
2	0		
3	38		

Напишите уравнения соответствующих реакций и приведите вывод.

Опыт № 2. Влияние pH на активность ферментов

Для разных ферментов существуют определенные значения pH (кислотности раствора), при котором фермент наиболее активен (оптимум pH). Например, для пепсина оптимум pH 1,5-2,5, для щелочной фосфатазы pH 9-10 и т.д. Для амилазы слюны оптимум pH 6,8; в кислой и щелочной среде активность амилазы снижается. Оптимум pH для амилазы слюны можно установить при определении степени гидролиза крахмала при различных значениях pH. О расщеплении крахмала судят по его реакции с раствором йода.

Исследуемый материал: 1%-ный раствор крахмала.

Приборы: штатив с пробирками, пипетки, водяная баня.

Реактивы: фосфатная буферная смесь с pH 5,0; 6,8; 8,0, разбавленная слюна, реактив Люголя.

Ход работы: Готовят буферные растворы по следующей схеме (см. табл.):

Реактивы	Номер пробирки		
	1	2	3
NaH ₂ PO ₄ (мл)	4,7	2,5	0,3
Na ₂ HPO ₄ (мл)	0,3	2,5	4,7
pH буферной смеси	5,6	6,0	8,1

В три пробирки наливают по 2-3 мл буферных растворов с различными pH (5,6; 6,8; 8,1). Во все пробирки добавляют по 2-3 мл разбавленной слюны (амилазы) и по 4-5 мл 1%-ного раствора крахмала, перемешивают и инкубируют 10 мин на водяной бане при температуре

37-38°C. Затем в каждую пробирку добавляют по 1 капле реактива Люголя. Результаты наблюдения заносят в таблицу, показывающую влияние рН на активность ферментов.

№ пробирки	Фермент	рН среды	Субстрат	Условия	Окраска с йодом
1	амилаза	5,0	крахмал	10 мин, 37°C	
2	амилаза	6.8	крахмал	10 мин, 37°C	
3	амилаза	8,0	крахмал	10 мин, 37°C	

Приведите вывод.

Опыт № 3. Специфичность ферментов

Исследуемый материал: 1%-ный раствор крахмала на 0,3%-ном растворе хлорида натрия.

Приборы: штатив с пробирками, пипетки, водяная баня с термометром.

Реактивы: разбавленная слюна, раствор сахаразы (10 г дрожжей гомогенизируют в 100 мл воды), 2%-ный раствор сахарозы, реактив Фелинга, реактив Люголя.

Ход работы. Берут четыре пробирки. В пробирки 1 и 2 наливают по 4-5 мл раствора крахмала, а в пробирки 3 и 4 по 4-5 мл раствора сахарозы. Затем в пробирки 1 и 3 приливают по 2 мл разбавленной слюны, а в пробирки 2 и 4 по 2 мл раствора сахаразы. Содержимое каждой пробирки тщательно перемешивают. Пробирки помещают в водяную баню при 38°C. Через 20 минут содержимое каждой пробирки делят на две части: с одной из них проводят реакцию с жидкостью Фелинга, с другой – пробу с йодом. Полученные результаты оформляют в виде следующей таблицы:

№ пробирки	Субстрат	Фермент	Реакция с реактивом Фелинга	Проба с йодом
1	Крахмал	Амилаза		
2	Крахмал	Сахараза		
3	Сахароза	Амилаза		
4	Сахароза	Сахараза		

Напишите уравнения соответствующих реакций и приведите вывод.

Опыт № 4. Влияние активаторов и ингибиторов

Активаторы и ингибиторы прямо или косвенно (аллостерически) влияют на активный центр фермента и изменяют его каталитическую активность. Активаторами часто служат ионы металлов I или II групп, некоторые анионы, трипептид глутатион и др. Ингибиторами могут быть соли тяжелых металлов, промежуточные или конечные продукты реакции, структурные аналоги субстратов, некоторые белки и другие вещества. Действие активаторов и ингибиторов можно наблюдать на примере активности амилазы.

Исследуемый материал: 1%-ный раствор крахмала.

Приборы: штатив с пробирками, пипетки, водяная баня с термометром.

Реактивы: разбавленная слюна, хлорид натрия, 1%-ный раствор, сульфат меди, 1% раствор-ный, реактив Люголя.

Ход работы. В 2 пробирки наливают по 4-5 мл 1%-ного раствора крахмала. В пробирку 1 добавляют 1-2 мл 1%-ного раствора хлорида натрия, в пробирку 2 – 1-2 мл 1%-ного раствора сульфата меди. В обе пробирки приливают по 1-2 мл разбавленной слюны, содержимое пробирок перемешивают и выдерживают на водяной бане 10 минут при температуре 37-38°C. Затем в обе пробирки добавляют по 1 капле реактива Люголя. Наблюдения заносят в следующую таблицу:

№ пробирки	Фермент	Эффектор	Субстрат	Условия	Окраска с йодом
1	амилаза	NaCl	крахмал	10 мин, 37°C	
2	амилаза	CuSO ₄	крахмал	10 мин, 37°C	

Приведите вывод.

Опыт № 5. Обнаружение активности уреазы в соевой муке

Уреаза – фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз мочевины до диоксида углерода и аммиака. Она содержится в соевых

бобах, синтезируется некоторыми микроскопическими грибами и бактериями.

Исследуемый материал: соевая мука.

Реактивы: 2%-ный раствор мочевины, 1%-ный раствор фенолфталеина.

Приборы: штатив с пробирками, пипетка емкостью 5 мл, водяная баня.

Ход определения. В две пробирки наливают по 5 мл 2%-ного раствора мочевины и вносят по 0,5 г соевой муки. Во вторую пробирку добавляют 2 капли фенолфталеина. Содержимое обеих пробирок встряхивают, и пробирки ставят на 5-10 мин. в водяную баню с температурой 37-40°C. Активность уреазы определяют путем обнаружения аммиака. Выделение аммиака в первой пробирке определяют по характерному запаху или по посинению влажной лакмусовой бумажки у отверстия пробирки. Содержимое второй пробирки приобретает малиновую окраску вследствие смещения реакции среды в щелочную сторону за счет образования аммиака.

Приведите вывод.

Контрольные вопросы

1. Ферменты и их химическая природа.
2. Строение молекулы фермента. Активные и регуляторные центры.
3. Ферменты четвертичной структуры. Изоферменты.
4. Общие свойства ферментов с другими катализаторами.
5. Отличия ферментов от небелковых катализаторов.
6. Механизм действия ферментов. Схема ферментативной реакции.
7. Влияние температуры и pH среды на активность ферментов.
8. Оптимумы pH и температуры, их значение для определения ферментативной активности.
9. В каких единицах выражается активность ферментов?
10. Принципы и методы определения активности ферментов.
11. Оксидоредуктазы. Биологическое значение.
12. Трансферазы. Особенности катализируемых реакций и их роль в обмене веществ.

13. Гидролазы. Примеры катализируемых реакций, промышленное применение.
14. Лиазы. Примеры реакций и их механизм.
15. Изомеразы. Примеры реакций и их значение в обмене веществ.
16. Синтетазы. Особенности катализируемых реакций и их биологическая роль.
17. Влияние концентрации субстрата на скорость реакции.
18. Константа Михаэлиса и максимальная скорость реакции.
19. Перечислите источники ферментов.
20. Приведите примеры использования ферментных препаратов в пищевой промышленности. Напишите уравнения реакций с использованием структурных формул субстратов и коферментов.

5. ЛИПИДЫ

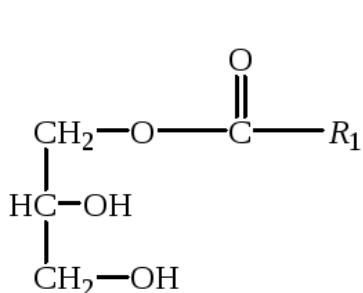
Краткая теоретическая часть

Липиды представляют собой сложную смесь органических веществ, выделяемых из объектов растительного, животного и микробиологического происхождения. К липидам относят растворимые в неполярных органических растворителях вещества с достаточно большой молекулярной массой, обладающие биологической активностью.

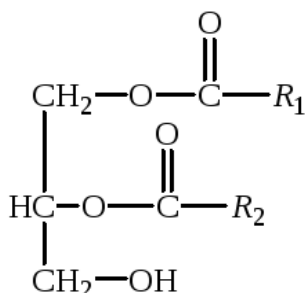
Существует несколько классификаций липидов. По химическому составу липиды делят на: *простые* – состоящие только из атомов углерода, водорода и кислорода и *сложные* – содержащие, кроме углерода, водорода и кислорода, еще и атомы фосфора, азота, иногда серы

К простым липидам относят:

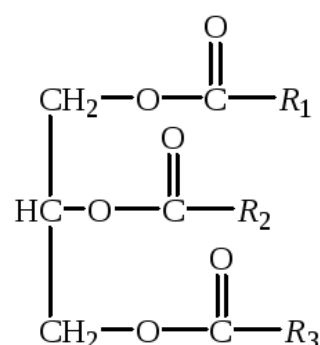
- ацилглицерины;
- глицерогликолипиды;
- сложные эфиры двухатомных спиртов (диольные эфиры);
- высшие спирты и воски;
- жирные кислоты и их эфиры;
- простые эфиры (церолы);
- стеролы;
- углеводороды жирного ряда (терпены).



моноацилглицерин



диацилглицерин

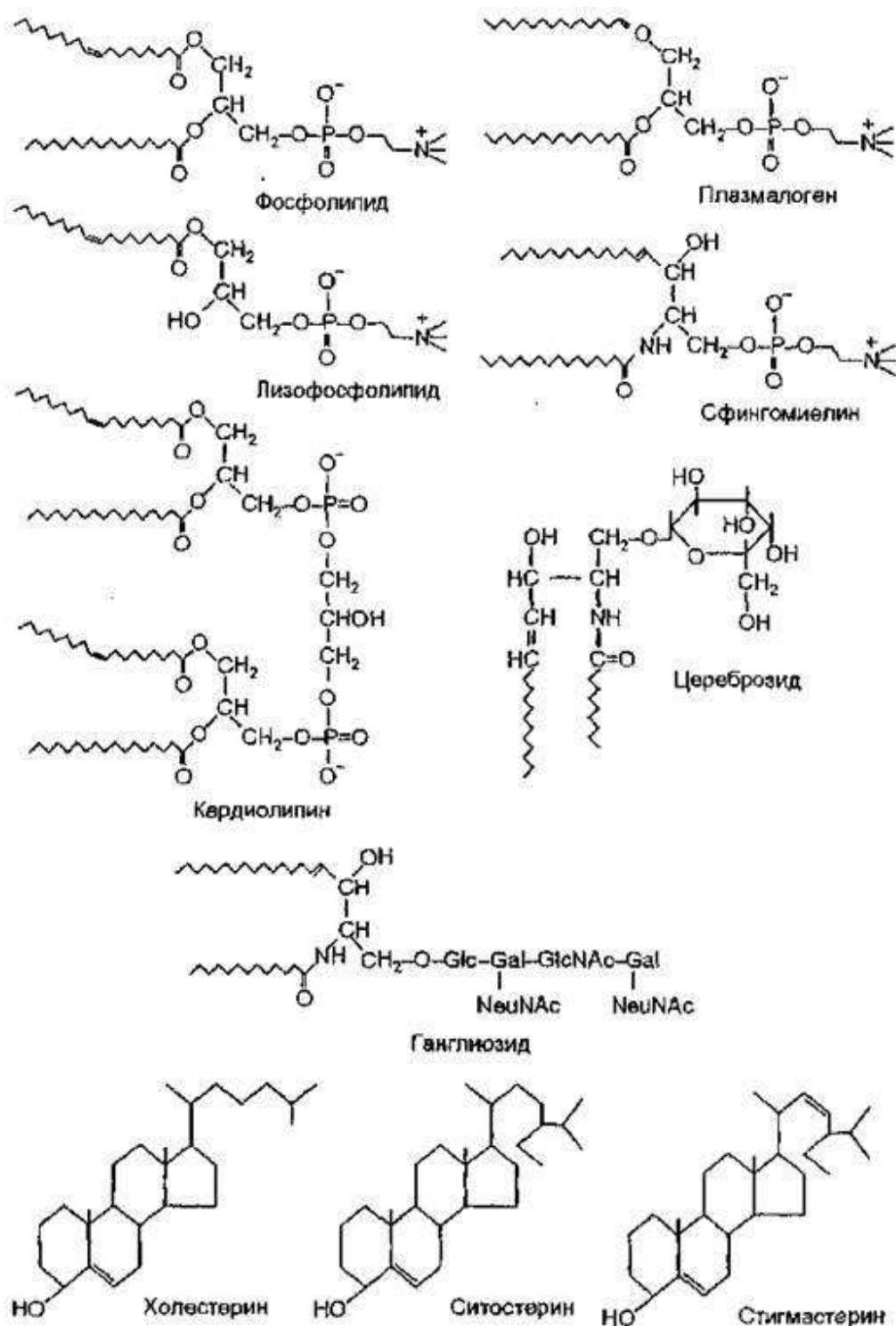


триацилглицерин

R_1, R_2, R_3 - остатки жирных кислот

К сложным липидам относят:

- фосфолипиды: глицерофосфолипиды, сфингофосфолипиды;
- гликолипиды, содержащие атомы фосфора или азота;
- стероиды.



По отношению к растворам щелочей липиды делятся на *омыляемые* и *неомыляемые*. Омыляемые липиды – это соединения, которые под действием щелочей гидролизуются с образованием солей жирных кислот, называемых *мылами*. К омыляемым липидам относятся как простые (диольные эфиры, воски, триацилглицерины), так и сложные

липиды (фосфолипиды и др.). Неомыляемые липиды – это соединения, не подвергающиеся щелочному гидролизу. К ним относят стерины, стероиды, терпены, в том числе многие жирорастворимые витамины, коферменты и церолы, а также их спиртовые и карбонильные производные.

Биологическая роль липидов очень разнообразна. Липиды входят в состав тканей любого живого организма и выполняют ряд жизненно важных функций. Условно липиды можно подразделить на три группы: *запасные (резервные), защитные и структурные липиды*.

Запасные (резервные) липиды обладают высокой калорийностью и являются энергетическим резервом организма. К ним относят в основном ацилглицерины (жиры). При сгорании одного грамма жира выделяется около 38,9 кДж теплоты, это почти в два раза больше, чем при переработке организмом углеводов или белков. Кроме того, жиры в условиях жаркого климата пустынь являются для ряда животных источником воды, образующейся при разложении ацилглицеринов под действием ферментов.

Защитные липиды помогают живым организмам переносить неблагоприятное воздействие окружающей среды, например, сухой климат или низкие температуры. Они создают водоотталкивающие и теплоизоляционные покровы у растений и животных, а также способствуют защите различных внутренних органов от механических повреждений. Защитными функциями обладают воски, а также ацилглицерины.

Структурные липиды образуют сложные комплексы с белками, углеводами и формируют *мембраны клеток*, клеточные структуры. По современным представлениям, в состав биологических мембран входят липиды трех видов: фосфолипиды, гликолипиды, стероиды, которые формируют трехслойную структуру.

Как компоненты биологических мембран липиды проявляют биологическую активность и оказывают влияние на проницаемость клеток, активность ферментов, участвующих в межклеточных контактах, мышечном сокращении и иммуннобиохимических процессах.

Жиры представляют собой отдельную группу липидов, состоящую преимущественно из глицеридов карбоновых кислот – ацилглицеринов. В организме человека жиры играют важную роль:

- являются поставщиками энергии;
- выполняют структурно-пластическую функцию – входят в состав мембран и внутриклеточных образований;
- способствуют нормальному обмену веществ как носители жирорастворимых витаминов А, D, К и Е;
- выполняют защитную функцию – создают термоизоляционные и водоотталкивающие покровы в организме, находясь в соединительных тканях организма, предохраняют его от механических повреждений;
- являются смазочным материалом кожи;
- выполняют функцию регуляторов жизнедеятельности – оказывают влияние на проницаемость клеток, активность многих ферментов, участвуют в создании межклеточных контактов, мышечном сокращении и иммунохимических процессах.

Нормальное содержание жиров в организме человека составляет 10-20 %, при патологии оно возрастает до 50%. Потребность человека в жирах зависит от возраста, характера трудовой деятельности и климатических условий. В среднем потребность в жирах составляет 80–100 г в сутки, что составляет около 30% суточной калорийности.

Животные и растительные жиры в рационе должны находиться в определенном соотношении: 70% животных и 30% растительных. Это связано с биологической ценностью жирных кислот, образующих глицериды. Насыщенные кислоты, содержащиеся преимущественно в животных жирах, используются организмом как энергетический материал.

Моно- и полиненасыщенные (эссенциальные) жирные кислоты входят в состав растительных масел, являются незаменимыми и, помимо энергетической роли, выполняют ряд биологически важных функций. Рекомендуемым соотношением жирных кислот в рационе является следующее: 10% полиненасыщенных, 60% мононенасыщенных и 30 % насыщенных.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 10

СВОЙСТВА ЛИПИДОВ

Цель работы:

- 1) изучить физические и химические свойства липидов;
- 2) освоить методы идентификации липидов, кислот и холестерина;
- 3) научиться экспериментально доказывать наличие в липидах основных структурных компонентов;
- 4) выделить лецитин из желтка куриного яйца и провести его гидролиз;
- 5) обнаружение холестерина в растительном масле и маргарине.

Опыт № 1. Растворимость жиров

Жиры растворяются в органических растворителях и не растворяются в воде. Эмульгирование жиров (равномерное распределение в растворе) используется в технике и быту для удаления жира. В организме человека только эмульгированные жиры подвергаются действию ферментов и распадаются на более простые продукты.

Исследуемый материал: говяжье или свиное сало, коровье масло, маргарин, растительное масло.

Реактивы: эфир серный, хлороформ, спирт.

Приборы: штатив с пробирками, стеклянные трубки, пипетки, водяная баня, электрическая плитка.

Ход работы. В первую пробирку каждой серии наливают 2-3 мл дистиллированной воды, во вторую – серного эфира, в третью – хлороформа, в четвертую – спирта. Все пробирки хорошо взбалтывают и наблюдают за изменениями. Если в какой-либо пробирке растворения не происходит, то ее осторожно подогревают на водяной бане. Результаты опытов записывают в следующую таблицу:

Вид жира	Вода	Эфир	Хлороформ	Спирт
Сливочное масло				
Свиное сало				
Маргарин				
Растительное масло				

Приведите вывод.

Опыт № 2. Эмульгирование жиров

Исследуемый материал: растительное масло, жир нейтральный, жир прогорклый.

Реактивы: 10%-ный раствор соды, желчь, белок, 10%-ный раствор соляной кислоты.

Приборы: штатив с пробирками.

Ход работы. Берут 8 пробирок и в каждую из них наливают по 3 мл дистиллированной воды и несколько капель жира (растительного масла). В первые пять пробирок добавляют жир нейтральный, а в пробирки 6, 7 и 8 жир прогорклый. Затем в пробирки 2 и 7 добавляют по 2-3 капли 10%-ного раствора соды, в пробирку 3 – желчь, в пробирку 4 – раствор белка, в пробирки 5 и 8 – раствор кислоты. В пробирках 1 и 6 находится только жир и вода. Все пробирки закрывают и тщательно взбалтывают. Выдерживают в течение 5-10 минут и наблюдают стойкость эмульсии. Результаты заносят в следующую таблицу.

№ п/п	Содержание пробирок	Стойкость эмульсии
1	Нейтральный жир + вода	
2	Нейтральный жир + сода	
3	Нейтральный жир + желчь	
4	Нейтральный жир + белок	
5	Нейтральный жир + кислота	
6	Прогорклый жир + кислота	
7	Прогорклый жир + сода	
8	Прогорклый жир + кислота	

Приведите вывод.

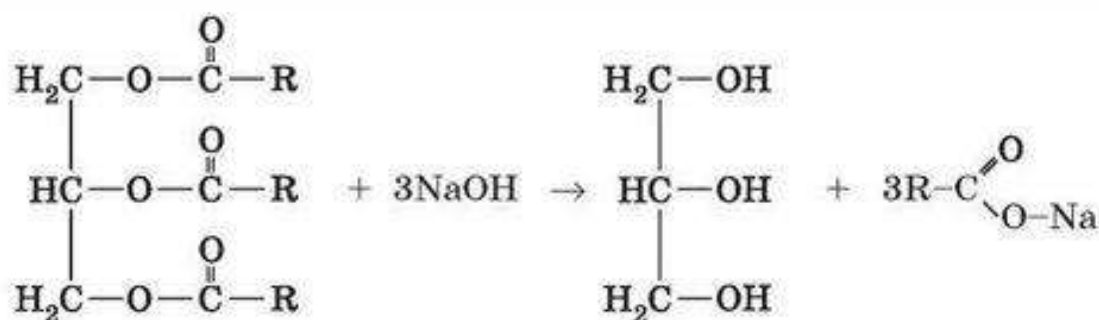
Опыт № 3. Омыление жиров

Исследуемый материал: растительное масло.

Реактивы: 35%-ный раствор гидроксида натрия, 2%-ный раствор сульфата меди, дистиллированная вода.

Приборы: фарфоровая чашка, электрическая плитка, стеклянная палочка.

Ход работы. В небольшую фарфоровую чашку поместите 0,5 мл растительного масла и 4 капли 35%-ного раствора гидроксида натрия. Стеклопалочкой размешайте щелочь с маслом до получения однородной эмульсии. Затем поставьте чашку на электрическую плитку и при незначительном нагревании продолжайте помешивать, пока не получится однородная прозрачная слегка желтоватая жидкость. Затем добавьте 2 мл дистиллированной воды и вновь нагрейте, тщательно перемешивая до полного упаривания воды. Снимите чашку с электрической плитки. В результате протекания реакции соли жирных кислот, обладающие меньшей плотностью, всплывают (после остывания получится



кусочек твердого белого мыла), а на дне пробирки собирается жидкость, содержащая глицерин. Содержимое пробирки охлаждают, затем добавляют несколько капель сульфата меди (II) и наблюдают интенсивное синее окрашивание, свидетельствующее о наличии глицерина. При необходимости добавляют щелочь.

Напишите уравнения реакции и приведите выводы.

Опыт № 4. Проба на акролеин

Глицерин при нагревании с гидросульфатом калия (KHSO₄) или натрия образует простейший ненасыщенный альдегид – пропеналь (акролеин) CH₂=CH–CHO. Акролеин отличается резким, неприятным запахом, вызывает раздражение слизистых оболочек глаз и дыхательных путей. Доказательством того, что исследуемое вещество имеет структуру триацилглицерина, то есть является жиром, а не углеводородом, воском или эфирным маслом, может служить образование при термическом разложении жира или масла акролеина. В основе обнаружения акролеина лежит его взаимодействие с триптофаном. При этом

образуется окрашенный в фиолетовый цвет продукт реакции. Реакция чрезвычайно чувствительна и позволяет определять до 0,001 мг акролеина в 1 мл воды.

Исследуемый материал: растительное масло или жиры.

Реактивы: кристаллический гидросульфат калия (KHSO_4), обезвоженный; 0,2%-ный раствор триптофана в соляной кислоте, вода дистиллированная.

Приборы: пробирки емкостью 15-25 мл с газоотводной трубкой, держатель для пробирок, мерный цилиндр вместимостью 10,0 мл, электрическая плитка, термостат.

Ход работы. В пробирку помещают 1-2 мл жира и 0,5 г обезвоженного гидросульфата калия. Смесь осторожно нагревают до появления белых паров акролеина, обладающих резким запахом. Пробирку закрывают пробкой с газоотводной трубкой и отгоняют несколько капель дистиллята в пробирку с дистиллированной водой. Количество дистиллированной воды в пробирке 3-5 мл. Содержимое пробирки тщательно перемешивают. Затем в отдельную пробирку помещают 3-5 капель полученного раствора, добавляют 0,5 мл 0,2%-ного солянокислого раствора триптофана и прибавляют 10 мл воды. Полученную смесь слегка встряхивают и выдерживают в термостате 20-30 минут при температуре 45-50°C. Появление фиолетовой окраски свидетельствует о наличии акролеина в дистилляте, полученном при термическом разложении исследуемого вещества. Выводы: описывают свои наблюдения при проведении опыта, по появлению или отсутствию фиолетовой окраски делают заключение о наличии жира в образце.

Напишите уравнения реакции и приведите выводы.

Опыт № 5. Определение степени ненасыщенности высших жирных кислот

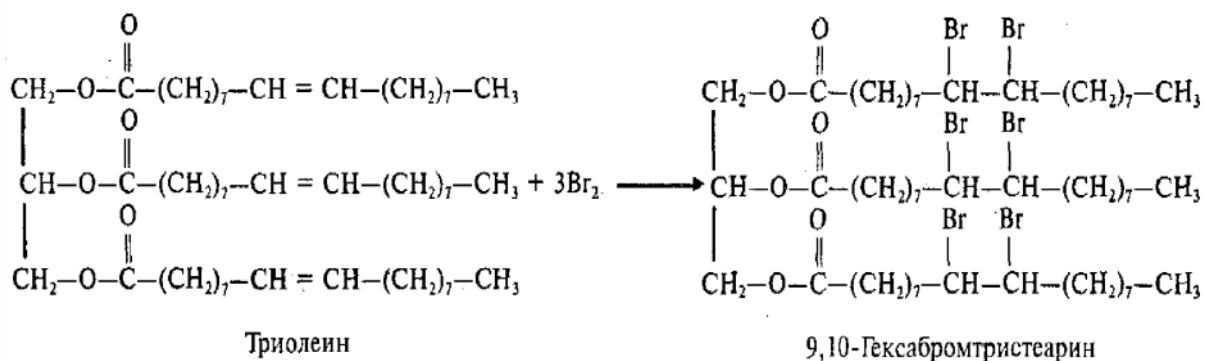
Исследуемый материал: растительное масло.

Реактивы: бромная вода.

Приборы: фарфоровая чашка, электрическая плитка, стеклянная палочка.

Ход работы. В пробирку поместите 8-10 капель бромной воды и 2-3 капли подсолнечного масла (содержит большое количество

непредельных жирных кислот), перемешайте стеклянной палочкой; происходит обесцвечивание бромной воды:



Степень ненасыщенности жиров количественно определяют по количеству присоединенного галогена (йода, брома) по месту двойных связей.

Напишите уравнение реакции и приведите выводы.

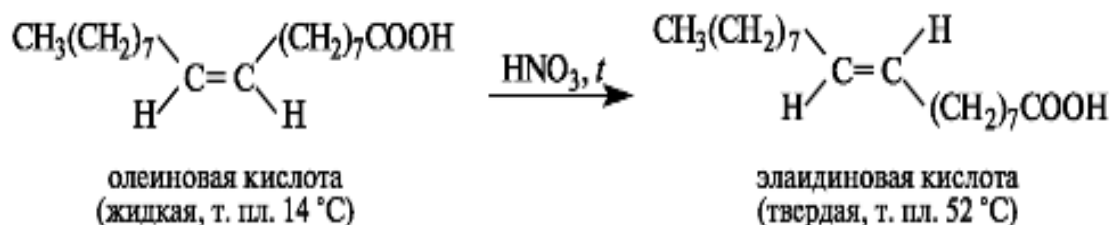
Опыт № 6. Изомеризация олеиновой кислоты

Исследуемый материал: растительное масло.

Реактивы: медные стружки, концентрированная азотная кислота, дистиллированная вода.

Приборы: фарфоровая чашка, электрическая плитка, стеклянная палочка.

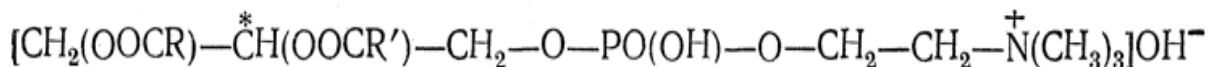
Ход работы. В пробирку помещают 1 мл олеиновой кислоты, немного медных стружек и 1,5 мл концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирки энергично встряхивают и оставляют в штативе под тягой. Наблюдают выделение оксида азота (IV) бурого цвета, образующегося в результате взаимодействия концентрированной азотной кислоты с медью. Оксиды азота являются катализаторами процесса изомеризации олеиновой кислоты в элаидиновую. Вспенившаяся масса олеиновой кислоты (*цис*-изомер) в течение 1 ч затвердевает вследствие образования твердой элаидиновой кислоты (*транс*-изомер):



Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

Опыт № 7. Выделение лецитинов из желтка куриного яйца

Предполагаемая формула строения лецитинов имеет вид:



Такое строение подтверждается распадом лецитинов при действии баритовой воды на жировые кислоты, глицеринфосфорную кислоту и холин (или коламин).

Исследуемый материал: желток куриного яйца.

Реактивы: этиловый спирт, ацетон, хлорид кадмия.

Приборы: стакан на 50 мл, штатив с пробирками, стеклянная палочка.

Ход работы. В стаканчик вносят около 5-6 желтков куриного яйца и, помешивая стеклянной палочкой, добавляют 10 мл горячего спирта. После остывания содержимое стаканчика фильтруют в сухую пробирку. Фильтрат должен быть прозрачным. Если в нем появляется муть, фильтрование повторяют до получения прозрачного фильтрата.

Со спиртовым раствором лецитинов проделывают ряд реакций, а часть оставляют для следующего опыта.

1) *Осаждение ацетоном.* В сухую пробирку наливают 2-3 мл ацетона и по каплям прибавляют спиртовый раствор лецитинов. Выпадает ли осадок? Почему?

2) *Получение эмульсии лецитинов.* Для получения эмульсии к 2-3 мл спиртового раствора лецитинов добавляют (по каплям) дистиллированную воду. Устойчива ли эмульсия лецитинов в воде?

3) *Осаждение хлоридом кадмия.* В сухой пробирке к 1 мл спиртового раствора лецитинов добавляют по каплям насыщенный раствор хлорида кадмия. Выпадает ли осадок? Какого цвета?

Приведите вывод.

Опыт № 8. Гидролиз лецитинов и исследование их состава

Исследуемый материал: спиртовой раствор лецитинов (из предыдущего опыта) или фармацевтический препарат «лецитин-серебро» в драже (перед проведением реакций драже очищают от оболочки).

Реактивы: ацетон, 10%-ный раствор гидроксид натрия, 10%-ный раствор соляной кислоты, гидросульфат натрия, кристаллический, или борная кислота, кристаллическая; нитрат калия, кристаллический; карбонат натрия, кристаллический, 5%-ный раствор сульфата меди, концентрированная азотная кислота, молибденовый реактив, лакмусовые бумажки, 0,1%-ный раствор фенолфталеина.

Приборы: штатив с пробирками, спиртовка, воронки, фильтры.

Ход работы. К спиртовому раствору лецитинов прибавляют ацетон до выпадения осадка, с которым производят дальнейшие реакции. Для выполнения работы можно также использовать фармацевтический препарат «лецитин-серебро» в драже (перед проведением реакций драже очищают от оболочки).

В пробирку наливают 5 мл спиртового раствора лецитина, 3 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия и нагревают до кипения. Происходит гидролиз лецитина до холина, высших жирных кислот, фосфорной кислоты и холина. Холин в щелочной среде распадается с образованием триметиламина (запах селедки), который можно обнаружить по посинению влажной лакмусовой бумажки, поднесенной к пробирке.

Далее проводят реакции на жирные кислоты, глицерин и фосфорную кислоту.

Обнаружение высших жирных кислот. Полученный щелочной гидролизат разбавляют 2 мл воды и к нему по каплям добавляют 10%-ный раствор соляной кислоты до выделения свободных жирных кислот, которые всплывают в виде жидкого слоя. Выделяющиеся жирные кислоты отфильтровывают.

Прозрачный фильтрат нейтрализуют 10%-ным раствором гидроксида натрия при наличии фенолфталеина до слабой розовой окраски и упаривают на водяной бане досуха.

В сухом остатке устанавливают наличие глицерина и фосфорной кислоты.

Обнаружение глицерина. Половину сухого остатка переносят в другую пробирку, добавляют 0,5 г гидросульфата калия и смесь нагревают на пламени горелки, держа пробирку горизонтально. При этом ощущается характерный резкий запах акролеина.

Напишите уравнение реакции.

Обнаружение фосфорной кислоты. Вторую половину осадка сплавляют в тигле с небольшим количеством нитрата калия и карбоната натрия (1:2) до полного обесцвечивания смеси. Затем тигель охлаждают и содержимое его растворяют в 2 мл концентрированной азотной кислоты. Раствор из тигля сливают в пробирку, добавляют двойной объем молибденового реактива и нагревают. Образование желтого осадка фосфомолибдата аммония указывает на присутствие в растворе фосфорной кислоты.

Напишите уравнение реакции. Приведите вывод.

Опыт № 9. Обнаружение холестерина в яичном желтке (проба Сальковского)

Исследуемый материал: яичный желток.

Реактивы: диэтиловый эфир, 10%-ный раствор серной кислоты.

Приборы: штатив с пробирками.

Ход работы. Вначале необходимо приготовить эфирную вытяжку холестерина, для чего в пробирку помещают 6 мл яичного желтка, наливают 50 мл диэтилового эфира и перемешивают. К 1 мл такой вытяжки добавить 2 мл 10%-ного раствора серной кислоты. Встряхните и проследите за изменением окраски смеси. Слой кислоты флуоресцирует зеленым цветом, а вытяжка приобретает окраску от желтой до интенсивно-красной. Приведите вывод.

Опыт № 10. Обнаружение холестерина в растительном масле (реакция Либермана-Сальковского)

Исследуемый материал: растительное масло.

Приборы. Штатив с пробирками.

Реактивы: хлороформ, концентрированная серная кислота ($\rho = 1,836$ г/мл).

Ход работы. К 2-3 мл 1%-ного хлороформного раствора растительного масла в пробирке осторожно, насливая по стенке, добавляют 1-2 мл концентрированной серной кислоты. Пробирку легко встряхивают. Вначале верхний слой, а затем и вся жидкость в пробирке принимает красную, оранжевую или красно-фиолетовую окраску. Приведите вывод.

Опыт № 11. Обнаружение крахмала в маргарине

Крахмал состоит из 2 полисахаридов – амилозы и амилопектина, образованных остатками *D*-глюкозы. Амилоза состоит из линейных молекул, а амилопектин – из молекул разветвленной структуры. Этим объясняется зернистое строение крахмала.

Исследуемый материал: маргарин.

Приборы: штатив с пробирками, пипетки, спиртовка или водяная баня.

Реактивы: реактив Люголя.

Ход работы. В пробирку помещают 0,5 г маргарина и нагревают на спиртовке или на водяной бане до расплавления. Водный слой, образующийся на дне пробирки, под слоем жира, отбирают пипеткой и помещают в другую пробирку. Разбавляют двойным количеством воды и нагревают до кипения. После остывания добавляют 2 капли реактива Люголя. В какой цвет окрашивается жидкость? Приведите вывод.

Опыт № 12. Определение констант жиров

1. Определение кислотного числа жира

Кислотное число характеризует кислотность жира и измеряется количеством мг гидроксида калия (KOH), необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира. При хранении масла наблюдается гидролиз ацилглицеринов, который приводит к накоплению свободных жирных кислот, т.е. к возрастанию кислотности. Повышенная кислотность жира указывает на снижение его качества.

Исследуемый материал: масло свежее и прогорклое.

Приборы: колбы конические объемом 100 мл (2 шт.), бюретка, пипетка.

Реактивы: 0,1 н спиртовой раствор гидроксида калия, 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина, эфир, этиловый спирт

Ход работы. В первую колбу помещают 1 г свежего масла, во вторую – 1 г прогорклого масла. В каждую колбу наливают по 10 мл смеси эфира и спирта (1:1). После растворения жира вносят 1-2 капли фенолфталеина и оттитровывают 0,1 н спиртовым раствором KOH до слабо-розового окрашивания. Кислотное число (X) вычисляют по следующей формуле:

$$X = V \cdot 5,6 / a$$

где V – объем 0,1 н раствора КОН, израсходованного на титрование навески жира, мл;

a – навеска жира, г;

5,6 – количество мг КОН, содержащееся в 1 мл 0,1 н раствора.

2. Определение числа омыления и эфирного числа

Числом омыления называется количество миллиграммов гидроксида калия (КОН), необходимое для нейтрализации всех жирных кислот, содержащихся в 1 г жира, как свободных, так и входящих в состав триацилглицеринов.

Эфирным числом называется количество миллиграммов гидроксида калия (КОН), необходимое для нейтрализации жирных кислот, которые отщепляются при омылении триацилглицеринов, содержащихся в 1 г жира.

2.1. Определение числа омыления

Исследуемый материал: масло.

Приборы: весы аналитические, колбы конические, обратный холодильник, бюретка, пипетка, водяная баня.

Реактивы: спиртовой раствор гидроксида калия, 0,5 н раствор соляной кислоты, 1%-ный спиртовой раствор фенолфталеина.

Ход работы. Отвешивают в колбу на аналитических весах около 1 г масла (опыт), вливают 20 мл спиртового раствора гидроксида калия, соединяют с обратным холодильником и ставят на кипящую водяную баню на 40-50 мин. Затем колбу отделяют от холодильника, охлаждают до комнатной температуры, добавляют 2 капли раствора фенолфталеина, 10 мл воды, перемешивают и титруют из бюретки 0,5 н раствором соляной кислоты до исчезновения окраски индикатора. То же самое проделывают с контрольной колбой, в которой масло заменено 1 мл воды. По разности титрования контрольной и опытной колб рассчитывают число омыления (X) по следующей формуле:

$$X = (V_1 - V_2) \cdot 28 / H$$

где V_1 – объем 0,5 н раствора соляной кислоты, израсходованной на контрольное титрование, мл;

V_2 – объем 0,5 н раствора соляной кислоты, израсходованной на опытное титрование, мл;

H – навеска масла, г;

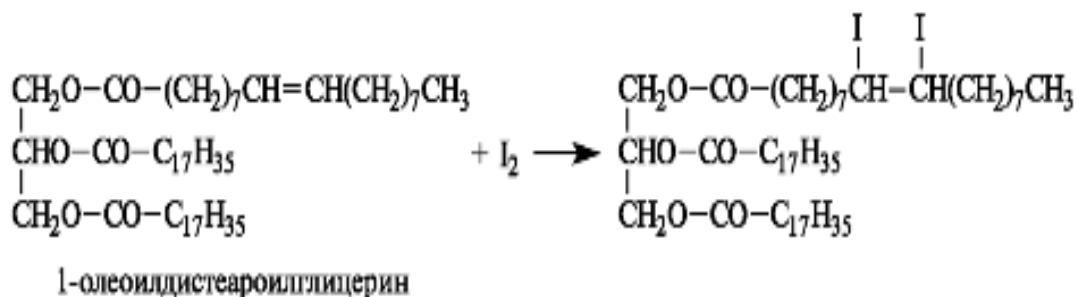
28 – количество миллиграммов гидроксида калия, содержащееся в 1 мл 0,5 н раствора.

2.2. Определение эфирного числа

Эфирное число жира рассчитывают путём вычитания из числа омыления величины кислотного числа.

3. Определение йодного числа

Йодное число показывает, сколько граммов йода может быть связано 100 г жира и характеризует степень непредельности жиров (т.е. наличие двойных связей):



Йодное число дает возможность судить о склонности жира к различным изменениям (окислению, присоединению водорода и т.д.), происходящим при хранении и переработке пищевых жиров. Оно позволяет судить о чистоте и натуральности исследуемого жира. Кроме того, йодное число характеризует степень свежести жиров. При окислении жиров в процессе хранения йодное число снижается.

3.1. Титриметрические методы определения йодного числа

Исследуемый материал: растительное масло, животный жир.

Приборы: весы аналитические, колбы конические объемом 500 мл (2 шт.), обратный холодильник, бюретка, пипетка, водяная баня.

Реактивы: этиловый спирт, хлороформ, 0,2 н спиртовой раствор йода, 0,1 н раствором тиосульфата натрия, 1%-ный раствор крахмала, вода дистиллированная.

Ход анализа. В сухую колбу для титрования вместимостью 500 мл с пришлифованной пробкой взвешивают на аналитических весах 0,10-0,15 г растительного масла или 0,20-0,25 г животного жира. Для растворения навески жира добавляют 10 мл смеси этилового спирта и хлороформа (10:1). Если проба жира плохо растворяется, следует закрыть колбу воздушным холодильником и нагреть на водяной бане с температурой 50-60°C в течение 15-20 минут.

По истечении указанного срока колбу охлаждают до комнатной температуры и добавляют пипеткой к анализируемой пробе 25 мл раствора Маргошеса (0,2 н спиртовой раствор йода). Оставляют полученный раствор в темном месте. Спустя ровно 5 минут вливают 200 мл дистиллированной воды, закрывают колбу пробкой и хорошо перемешивают. Полученную смесь через 5 мин. оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата натрия до перехода коричневой окраски в желтую. Затем добавляют индикатор – 1%-ный раствор крахмала – и продолжают титрование до исчезновения фиолетовой окраски (опыт).

Контрольный опыт проделать с теми же реактивами. К 10 мл смеси этилового спирта и хлороформа (10:1) добавляют 25 мл 0,2 н раствора Маргошеса и оставляют полученный раствор в темном месте. Спустя ровно 5 мин. вливают 200 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Полученную эмульсию оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата натрия в присутствии крахмала.

Йодное число (*I*) вычисляют по следующей формуле:

$$I = (V_1 - V_2) * 0.0127 * 100 / N$$

где V_1 – объем 0,1 н раствора тиосульфата натрия, израсходованное на контрольное титрование, мл;

V_2 – объем 0,1 н раствора тиосульфата натрия, израсходованное на опытное титрование, мл;

N – навеска масла, г;

0,0127 – титр тиосульфата по йоду.

3.2. Определение йодного числа рефрактометрическим методом (по Ермакову)

Йодное число по Ермакову определяется по показателю преломления масла, измеренному на рефрактометре.

Исследуемый материал: масло растительное.

Приборы: рефрактометр.

Реактивы: спирт и вата для протирки призмы рефрактометра.

Ход работы. Измеряют на рефрактометре показатель преломления растительного масла. Для расчёта йодного числа (*I*) используют формулу, предложенную автором метода:

$$I = (n_D^{20} - 1,4595) * 100 / 0,0118$$

где n_D^{20} – показатель преломления данного масла.

Контрольные вопросы

1. Объяснить физиологические свойства жиров.
2. Химический состав липидов.
3. Какое явление называется эмульгированием жиров?
4. Что положено в основу классификации липидов?
5. Что представляют собой липоиды?
6. Простые и смешанные триглицериды. Приведите примеры.
7. В чем состоит отличие понятий «липид» и «жир»?
8. Воски. Химический состав. Приведите примеры. Как химическим путем отличить жир и воск?
9. К какому классу липидов относится лецитин?
10. Что называется кислотным числом и йодным числом жира?
11. Какова структура и биологическая роль холестерина?
12. Каковы физические свойства жиров? От каких факторов зависит агрегатное состояние жиров?
13. Перечислите биологические функции жиров.
14. К какому типу (присоединение, замещение или др.) относится реакция подсолнечного масла с бромной водой?
15. Приведите уравнения взаимодействия диолеолинолеина с бромной водой и с перманганатом калия.
16. Напишите уравнение реакции гидролиза дипальмитоолеина, стеаро-пальмитоолеина, олеодистеарина, трипальмитина.
17. Напишите уравнение реакции синтеза стеароолеопальмитина, пальмитодиолеина.

6. ВИТАМИНЫ

Краткая теоретическая часть

Витамины – низкомолекулярные органические соединения разнообразного строения, необходимые для поддержания нормальной жизнедеятельности организма, но не синтезирующиеся в нем, и поэтому их присутствие в пище необходимо.

В отличие от белков, липидов и углеводов они не служат источником энергии или строительным материалом для клеток и требуются в чрезвычайно малых количествах, исчисляемых микро- и миллиграммами в сутки.

Классификация витаминов основана на их растворимости в воде и неполярных органических растворителях (жирорастворители – бензин, петролейный эфир, сложные эфиры, жиры). К жирорастворимым относятся витамины А, D, Е, К, а к водорастворимым – витамины группы В (витамины В₁, В₂, В₃, В₅ (РР), В₆, В₁₂, *n*-аминобензойная и фолиевая кислоты, биотин), а также витамины С и Р.

При отсутствии витаминов в пище развиваются тяжелые заболевания – *авитаминозы*, а при недостаточном содержании витаминов – *гиповитаминозы* (рахит, цинга, бери-бери, пеллагра, анемия и др.). В связи с этим в физиологии и медицине, помимо химических названий витаминов, используются названия болезни, развивающейся при их недостатке, с приставкой «*анти-*» (например, витамин D – антирахитический, витамин В₁ – антиневритный и т.д.).

Жирорастворимые витамины, помимо гипо- и авитаминоза, могут быть причиной *гипервитаминоза*, т.е. отравления избытком витамина. Для водорастворимых витаминов гипервитаминозы нехарактерны, так как их избыток обычно быстро выводится из организма.

Функция витаминов в организме связана с обеспечением нормального протекания обменных процессов, поскольку многие из них входят в состав коферментов (простетических групп) ферментов. В составе коферментов находятся водорастворимые витамины. Роль жирорастворимых витаминов в процессе обмена веществ изучена в меньшей степени.

Многие витамины имеются в продуктах животного происхождения и поступают в организм в виде провитаминов, являющихся исходными продуктами для образования витаминов.

Некоторые витамины способны синтезироваться микрофлорой кишечника человека или в организме, например, витамин B₅ (PP) – из аминокислоты триптофана. Введение отдельных лекарственных веществ может отрицательно сказаться на синтезе витаминов микрофлорой кишечника.

Суточная потребность в витаминах возрастает при различных заболеваниях, беременности, лактации и при нарушении всасывания жирорастворимых витаминов в случае недостаточного поступления желчи в кишечник при заболевании печени.

Структурные аналоги витаминов, близкие к ним по строению, называют *антивитаминами*. Эти вещества встречаются в природе или могут быть синтезированы.

Антивитамины способны соединяться с белковой частью фермента вместо витаминов и вызывать изменения активности ферментов и обменных процессов.

Для обнаружения витаминов в различных веществах или в биологических жидкостях и определения их количества существуют качественные реакции, основанные на цветных реакциях, характерных для той или иной другой группировки, входящей в витамин.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 11

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ

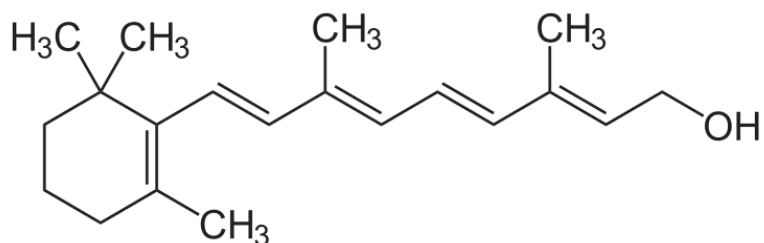
Цель работы:

- 1) ознакомить студентов с химической природой витаминов А, Д, С и группой витаминов В;
- 2) провести качественные реакции на витамины А, Д и С;
- 3) ознакомить студентов с методами количественного определения витаминов, произвести количественное определение витамина С.

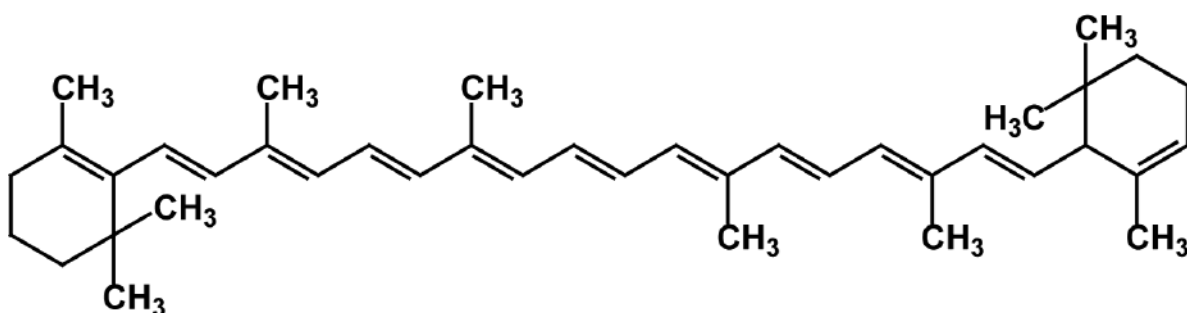
ЖИРОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Опыт № 1. Качественные реакции на витамин А

Витамин А (ретинол) содержит кольцо β -ионона и боковую цепь, состоящую из двух остатков изопрена и спиртовой группы:



Провитамином А является желтый пигмент растений – каротин:



В организме каротин превращается в витамин А под влиянием фермента каротиказы. Признаками авитаминоза А являются «куриная слепота», сухость роговицы глаза (ксерофтальмия), задержка роста.

1. Проба с хлоридом железа (III)

Исследуемый материал: 10%-ный раствор растительного масла в хлороформе, 10%-ный раствор рыбьего жира в хлороформе.

Приборы: Штатив с пробирками. Пипетки.

Реактивы: Хлорид железа, 1%-ный раствор.

Ход работы. В одну пробирку наливают раствор рыбьего жира в хлороформе, в другую раствор растительного масла в хлороформе и добавляют по несколько капель раствора хлорида железа (III). Как изменяется окраска раствора? Приведите вывод.

2. Проба с серной кислотой

Исследуемый материал: 10%-ный раствор растительного масла в хлороформе, 10%-ный раствор рыбьего жира в хлороформе.

Приборы. Штатив с пробирками, пипетки.

Реактивы: серная кислота концентрированная.

Ход работы. В одну пробирку наливают несколько мл раствора рыбьего жира в хлороформе, в другую – раствор растительного масла в хлороформе и по 1-2 мл концентрированной серной кислоты.

Как изменяется окраска раствора? Приведите вывод.

3. Реакция с сульфатом железа

Исследуемый материал: рыбий жир.

Реактивы: насыщенная сульфатом железа ледяная уксусная кислота, концентрированная серная кислота.

Приборы: пробирки, пипетки.

Ход определения: К 1-2 каплям рыбьего жира в пробирке добавляют 5-10 капель насыщенной сульфатом железа ледяной уксусной кислоты и 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Приведите вывод.

4. Реакция с треххлористой сурьмой

Витамин А взаимодействует с раствором треххлористой сурьмы в хлороформе. В результате реакции образуется окрашенный в синий цвет продукт. Реакция используется при колориметрическом методе количественного определения витамина А.

Исследуемый материал: 20%-ный раствор рыбьего жира или 0,05%-ный раствор витамина А в хлороформе.

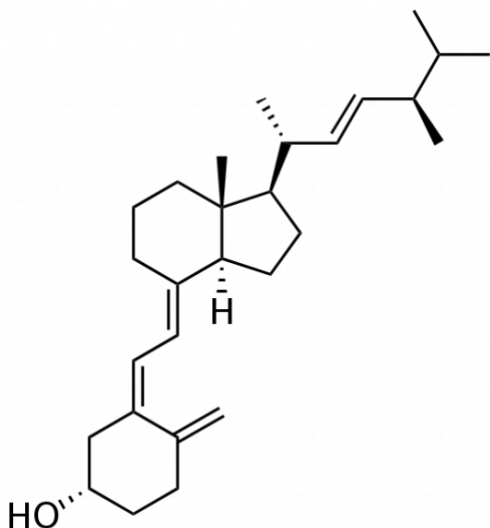
Реактивы: насыщенный раствор треххлористой сурьмы в хлороформе.

Приборы: Пробирки, пипетки.

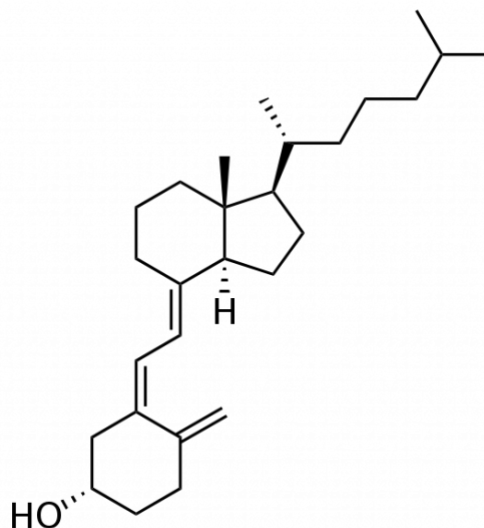
Ход определения. В сухую пробирку вносят 2-3 капли 20%-ного раствора рыбьего жира или 0,05%-ного раствора витамина А в хлороформе, добавляют 5 капель насыщенного раствора треххлористой сурьмы в хлороформе. Появляется темно-синее окрашивание, которое постепенно переходит в розово-фиолетовое. Приведите вывод.

Опыт № 2. Качественная реакция на витамин D

Витамины группы D (кальциферолы) являются производными циклопентанпергидрофенантрена. Наиболее распространены холекальциферол – витамин D₃ и эргокальциферол – витамин D₂. Витамин D₃ образуется в животном организме из 7-дегидрохолестерина, содержащегося в подкожной жировой клетчатке, под влиянием ультрафиолетовых лучей.



Эргокальциферол (D₂)



Холекальциферол (D₃)

Витамины группы D влияют на обмен кальция и фосфора. Основным проявлением гиповитаминоза D у детей является рахит. Недостаток витамина D у взрослых проявляется в виде остеомалации (размягчения костей), возникающей вследствие вымывания из костей солей кальция.

1. Проба с бромом

Исследуемый материал: рыбий жир или концентрат витамина D.

Реактивы: 10%-ный раствор брома в хлороформе.

Приборы: Штатив с пробирками. Пипетки.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 2-3 капли рыбьего жира или 1 каплю концентрата витамина D и 2-4 капли раствора брома в хлороформе. В присутствии витамина D постепенно появляется зеленовато-голубое окрашивание. Приведите вывод.

2. Реакция с треххлористой сурьмой

Цветная реакция с треххлористой сурьмой используется для количественного определения витамина D.

Исследуемый материал: раствор витамина D.

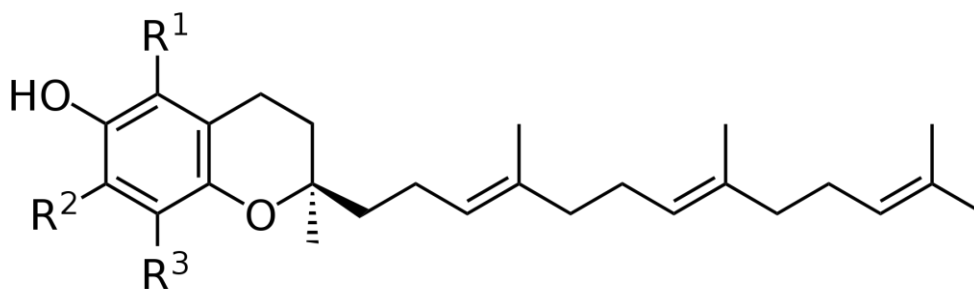
Реактивы: раствор треххлористой сурьмы в хлороформе.

Приборы: пробирки, пипетки.

Ход определения. В пробирку наливают 3 капли раствора витамина D, добавляют 2 мл раствора треххлористой сурьмы в хлороформе. Появляется оранжево-красное окрашивание. Приведите вывод.

Опыт № 3. Качественные реакции на витамин E

Витамин E (токоферол) существует в виде нескольких витаминов: α -, β -, γ - и δ -токоферолов (или токотриенолов):



Заместители R¹, R², R³ – атом водорода (H) или метильная группа (Me):

- α -токотриенол: R¹ = Me, R² = Me, R³ = Me;
- β -токотриенол: R¹ = Me, R² = H, R³ = Me;
- γ -токотриенол: R¹ = H, R² = Me, R³ = Me;
- δ -токотриенол: R¹ = H, R² = H, R³ = Me.

Недостаток витамина E у животных вызывает бесплодие. Витамин E обладает антиоксидантными свойствами.

1. Реакция с хлоридом железа (III)

Спиртовой раствор α -токоферола при этом раствор окрашивается в красный цвет.

Исследуемый материал: 0,1%-ный спиртовой раствор α -токоферола.

Реактивы: раствор хлорида железа (III).

Приборы: Пробирки, пипетки.

Ход определения. В сухую пробирку наливают 4-5 капель 0,1%-ного спиртового раствора α -токоферола, прибавляют 0,5 мл хлорида железа (III) и тщательно перемешивают. Содержимое пробирки приобретает красную окраску в результате окисления токоферола хлоридом железа (III) в токоферил-хинон. Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

2. Реакция с азотной кислотой

Витамин Е, взаимодействуя с концентрированной азотной кислотой, окисляется с образованием токоферил-хинона, окрашенного в красный или желтовато-красный цвет. Метод используется и для количественного определения витамина Е.

Исследуемый материал: масляный раствор витамина Е или 0,1%-ный спиртовой раствор α -токоферола.

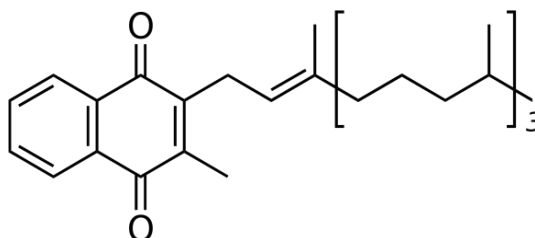
Реактивы: концентрированная азотная кислота.

Приборы: пробирки, пипетки, водяная баня, электрическая плитка.

Ход определения. В сухую пробирку наливают 2-3 капли масляного раствора витамина Е (или 4-5 капель 0,1%-ного спиртового раствора α -токоферола), прибавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты. Пробирку нагревают в кипящей водяной бане в течение 10 минут. Верхний маслянистый слой приобретает красную окраску вследствие окисления α -токоферола с образованием токоферил-хинона. Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

Опыт № 4. Качественные реакции на витамин К

Витамин К является производным нафтохинона. Он существует в виде двух витамеров – филлохинона и менахинона. Витамин К участвует в биосинтезе протромбина, необходимого для процесса свертывания крови. Известны также искусственно синтезированные аналоги витамина К, например, викасол.



Витамин К

1. Реакция со щелочным раствором цистеина

Витамин К в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

Исследуемый материал: спиртовой раствор витамина К (промышленный препарат) или 0,1%-ный спиртовой раствор викасола.

Реактивы: 0,025%-ный раствор цистеина и 10%-ный раствор гидроксида натрия.

Приборы: Пробирки, пипетки.

Ход определения. В пробирку наливают 1 мл спиртового раствора витамина К (промышленного препарата) или 0,1%-ного спиртового раствора викасола, добавляют 2 капли 0,025%-ного раствора цистеина и 2 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия. Появляется желтое окрашивание. Приведите вывод.

2. Реакция с малоновым эфиром

В щелочной среде витамин К гидролизруется с образованием фитола, взаимодействующего с малоновым эфиром ($C_2H_5OOC-CH_2-COOC_2H_5$). Продукт конденсации окрашивается в фиолетово-красный цвет. Цветная реакция используется и для количественного определения витамина К.

Исследуемый материал: спиртовой раствор витамина К (промышленный препарат) или 0,1%-ный спиртовой раствор викасола.

Реактивы: 1%-ный раствор диэтилмалонowego эфира и 1%-ный раствор гидроксида калия.

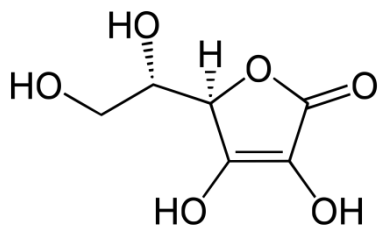
Приборы: Пробирки, пипетки.

Ход определения. В пробирку наливают 2 мл раствора витамина К, добавляют 0,5 мл 1%-ного раствора малонового эфира и 0,1 мл 1%-ного раствора гидроксида калия. Появляется фиолетово-красное окрашивание. Приведите вывод.

ВОДОРАСТВОРИМЫЕ ВИТАМИНЫ

Опыт №5. Качественная реакция на витамин С

Аскорбиновая кислота (витамин С) является лактоном 2,3-дегидро-



Л-гулоновой кислоты. Биологическая роль аскорбиновой кислоты в организме многообразна. Она содержится в высоких концентрациях в надпочечниках и в лейкоцитах животных, а также в тканях растений. Аскорбиновая ки-

слота принимает участие в окислительно-восстановительных процессах, гидроксилировании пролина и лизина в коллагене (белок соединительной ткани), синтезе адреналина и стероидных гормонов, усиливает всасывание железа в кишечнике и т.д. Отсутствие аскорбиновой кислоты в пище приводит к развитию цинги. Гиповитаминоз витамина С характеризуется понижением устойчивости организма к различным вредным факторам окружающей среды, к стрессу и к инфекционным заболеваниям. Аскорбиновая кислота, ее изомеры и соли широко применяются в различных пищевых технологиях.

Качественные реакции на аскорбиновую кислоту основаны на ее способности легко вступать в окислительно-восстановительные реакции и восстанавливать, например, метиленовый синий, гексацианоферрат калия, 2,6-дихлорфенолиндофенол и другие вещества.

1. Реакция с метиленовым синим

Аскорбиновая кислота восстанавливает метиленовый синий до бесцветной лейкоформы.

Исследуемый материал: 0,5%-ный раствор витамина С (молоко, сок капусты или картофеля).

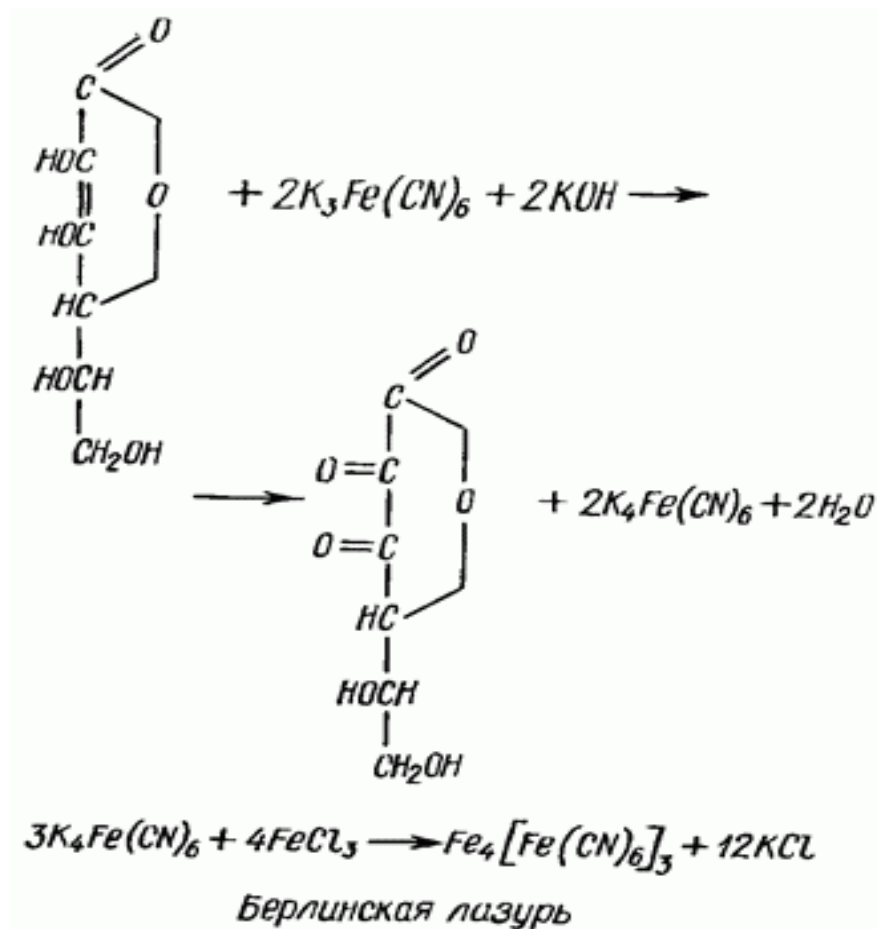
Реактивы: 0,01%-ный раствор метиленового синего.

Приборы: Пробирки с пробками, пипетки, термостат на 37-40°C.

Ход определения. К 1 мл 0,5%-ного раствора витамина С (молока, сока капусты или картофеля) добавляют 1 мл 0,01%-ного раствора метиленового синего, перемешивают и закрывают пробкой для предохранения от соприкосновения с кислородом воздуха. Пробирку помещают в термостат при температуре 37-40°C. Через некоторое время жидкость в пробирке обесцвечивается. Приведите вывод.

2. Реакция с гексацианоферратом (III) калия

Аскорбиновая кислота восстанавливает гексацианоферрат (III) калия в гексацианоферрат (II) калия, который при добавлении хлорида железа (III) образует осадок синего цвета – берлинскую лазурь, или гексацианоферрат (II) железа (III):



Исследуемый материал: раствор витамина С или растворы, содержащего витамин С (вытяжка из силоса, сок капусты и т.д.).

Реактивы: 1%-ный раствор гексацианоферрата (III) калия, 10%-ный раствор соляной кислоты и 1%-ный раствор хлорида железа (III).

Приборы: Пробирки, пипетки.

Ход определения. Берут две пробирки. В одну наливают 2-3 мл раствора витамина С, в другую – дистиллированную воду. В обе пробирки добавляют две капли 1%-ного раствора гексацианоферрата (III) калия и перемешивают содержимое пробирки. Затем в пробирку добавляют 6-8 капель 10%-ного раствора соляной кислоты и 1-2 капли 1%-ного раствора хлорида железа (III). В присутствии витамина С

появляется синее или зеленое окрашивание смеси, а затем выпадает темно-синий или зеленовато-синий осадок берлинской лазури. Во второй пробирке окраска жидкости бурая.

Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

Опыт № 6. Количественное определение аскорбиновой кислоты в продуктах растительного происхождения

Исследуемый материал: растительное сырье (картофель, капуста и т.п.).

Реактивы: 5%-ный раствор соляной кислоты, 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,5%-ный раствор солей меди, железа и алюминия.

Приборы: Колбы конические объемом 50 мл (4 шт.), пипетки емкостью 2, 5 и 10 мл, градуированная пипетка объемом 1 мл, воронка, бумажный фильтр, фарфоровая ступка с пестиком, кварцевый песок.

Ход определения в растительном сырье. Взвешивают 10 г продукта (картофеля, капусты и т.д.), измельчают его и тщательно растирают в ступке с небольшим количеством кварцевого песка, добавляя маленькими порциями 5%-ный раствор соляной кислоты до получения жидкой кашицы. Смесь количественно переносят в мерную колбу объемом 100 мл. Ступку и пестик обмывают раствором кислоты, которую сливают в ту же мерную колбу. Затем содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой, хорошо перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр. Полученный фильтрат должен быть прозрачным. Из полученного фильтрата в коническую колбу отбирают пипеткой 10 мл и титруют из микробюретки или пипетки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, прибавляя его осторожно по каплям до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Содержание аскорбиновой кислоты в продукте в мг % (мг на 100 г продукта) вычисляют по формуле

$$C = (a * 0,088 * V_1 * 100) / (b * V_2) = a * 8,8$$

где a — количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование, мл;

b — навеска продукта (10 г);

0,088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, мг (титр раствора 2,6-дихлорфенол-индофенола по аскорбиновой кислоте);

V_1 – объем приготовленного экстракта (100 мл);

V_2 – объем фильтрата, взятого для титрования (10 мл).

Под воздействием различных факторов содержание аскорбиновой кислоты в продуктах снижается вследствие ее легкой окисляемости. Разрушению аскорбиновой кислоты способствуют нагревание, щелочная среда, контакт с кислородом воздуха, соли железа и меди, а соли алюминия не ускоряют разрушение витамина.

Ход определения: В три конические колбы объемом 100 мл отбирают по 10 мл полученного выше экстракта. В первой колбе экстракт кипятят, во второй колбе к нему добавляют 1 мл 0,5%-ного раствора соли меди или железа, а в третью – 1 мл раствора соли алюминия. Во всех трех пробах определяют содержание аскорбиновой кислоты по вышеприведенному методу. Полученные результаты сравнивают с содержанием витамина в исходной пробе (без обработки), которое принимают за 100%. Затем подсчитывают (в процентах) степень разрушения аскорбиновой кислоты при тепловой обработке и в присутствии солей металлов. Делают вывод о влиянии нагревания и солей исследуемых металлов на сохранность аскорбиновой кислоты в продуктах.

Опыт № 7. Определение количества аскорбиновой кислоты в молоке

Исследуемый материал: молоко.

Реактивы: 17%-ная уксусная кислота, 5%-ный раствор уксуснокислого свинца в 5%-ной уксусной кислоте, 80%-ный раствор уксусной кислоты, 0,001 н. раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,5%-ный раствор солей меди, железа и алюминия.

Приборы: Колба коническая объемом 100 мл (4 шт.), пипетки вместимостью 2, 5 и 10 мл, градуированная пипетка емкостью 1 мл, воронка (2 шт.), вата, бумажный фильтр.

Ход определения аскорбиновой кислоты в сыром молоке. К 50 мл сырого молока в конической колбе емкостью 100 мл добавляют 2 мл 17%-ной уксусной кислоты, перемешивают и фильтруют через тонкий

слой ваты. Из полученного фильтрата в коническую колбу отмеривают 10 мл, прибавляют 5 мл раствора уксуснокислого свинца в уксусной кислоте (раствор готовят заранее). Жидкость перемешивают и фильтруют через плотный бумажный фильтр в коническую колбу. К 5 мл совершенно прозрачного фильтрата добавляют 2,5 мл 80%-ной уксусной кислоты, 10 мл воды и титруют из микробюретки или пипетки 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, прибавляя его осторожно по каплям до слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Содержание аскорбиновой кислоты в молоке вычисляют по следующей формуле:

$$X = (a * K * 1,04 * 1,5 * 0,088 * 0,97 * 100) / 5 = a * K * 2,66$$

где a – количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование, мл;

K – поправочный коэффициент к титру раствора краски;

1,04 – коэффициент разведения молока;

1,5 – коэффициент разведения фильтрата;

5 – количество фильтрата, взятого для титрования, мл;

0,088 – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,001 н. раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, мг;

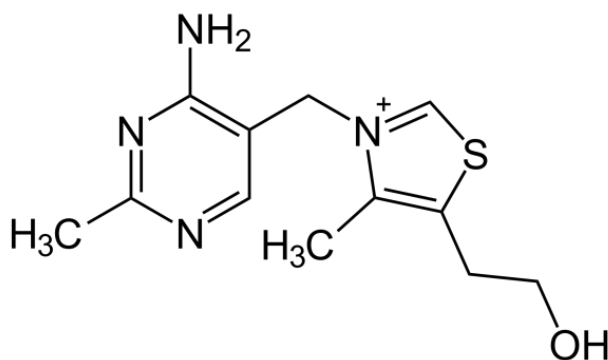
0,97 – коэффициент для пересчета количества молока из кубических сантиметров в граммы.

Ход определения аскорбиновой кислоты в молоке после обработки. Под воздействием различных факторов содержание аскорбиновой кислоты в продуктах вследствие ее легкой окисляемости снижается. Так, содержание витамина С снижается при термической обработке молока (кипячение, пастеризация, стерилизация, сушка). Разрушению аскорбиновой кислоты способствуют соли железа и меди, а соли алюминия не ускоряют разрушение витамина. В две конические колбы объемом 100 мл отбирают по 50 мл исследуемого молока. Молоко в первой колбе кипятят, во второй колбе к нему добавляют 1 мл раствора соли меди, железа или алюминия. В двух пробах определяют содержание аскорбиновой кислоты по вышеприведенному методу. Полученные результаты сравнивают с содержанием витамина в исходной пробе с сырым молоком, которое принимают за 100%. Подсчитывают

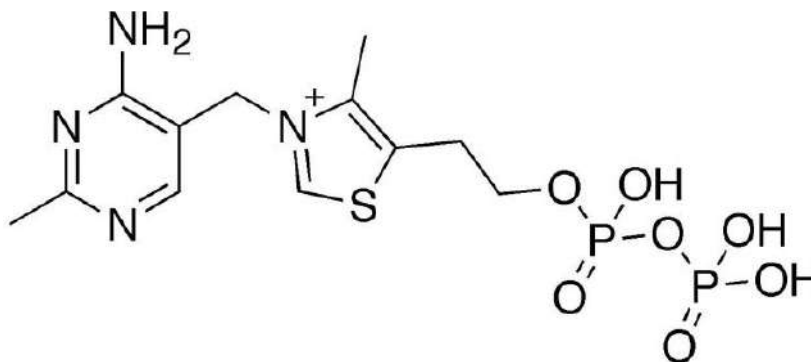
степень разрушения аскорбиновой кислоты при обработке молока (в процентах).

Опыт № 8. Качественная реакции на витамин В₁ (тиамин)

В состав молекулы витамина В₁ (тиамин, антиневритный) входят два гетероцикла – пиримидиновый и тиазоловый, связанные метиленовой группой. Кроме того, в молекуле тиамин содержатся гидроксильная и аминная группы:



Витамин В₁ в форме тиаминпирофосфата (кофермента одного из важнейших ферментов углеводного обмена – карбоксилазы) участвует в окислительном декарбоксилировании α -кетокислот (пировиноградной и α -кетоглутаровой):



Недостаток тиамин в пище вызывает поражение нервной системы – полиневрит. Комплекс последствий недостаточности тиамин известен под названием болезни *бери-бери*. При бери-бери наблюдаются слабость, потеря веса, атрофия мышц, невриты, нарушения интеллекта, расстройства со стороны пищеварительной и сердечно-сосудистой системы, развитие парезов и параличей. Основные количества тиамин человек получает с растительной пищей. Богаты тиамин такие растительные продукты, как пшеничный хлеб из муки

грубого помола, соя, фасоль, горох, шпинат. Меньше содержание тиамин в картофеле, моркови, капусте.

Из животных продуктов содержанием тиамин выделяются печень, почки, мозг, свинина, говядина, также он содержится в дрожжах. В молоке его содержится около 0,5 мг/кг. Витамин В₁ синтезируется некоторыми видами бактерий, составляющих микрофлору толстого кишечника.

В щелочной среде под влиянием сильных окислителей тиамин окисляется, образуя тиохром, обладающий в ультрафиолетовых лучах сине-голубой флуоресценцией. Метод используется для количественного определения тиамин.

1. Тиохромная реакция

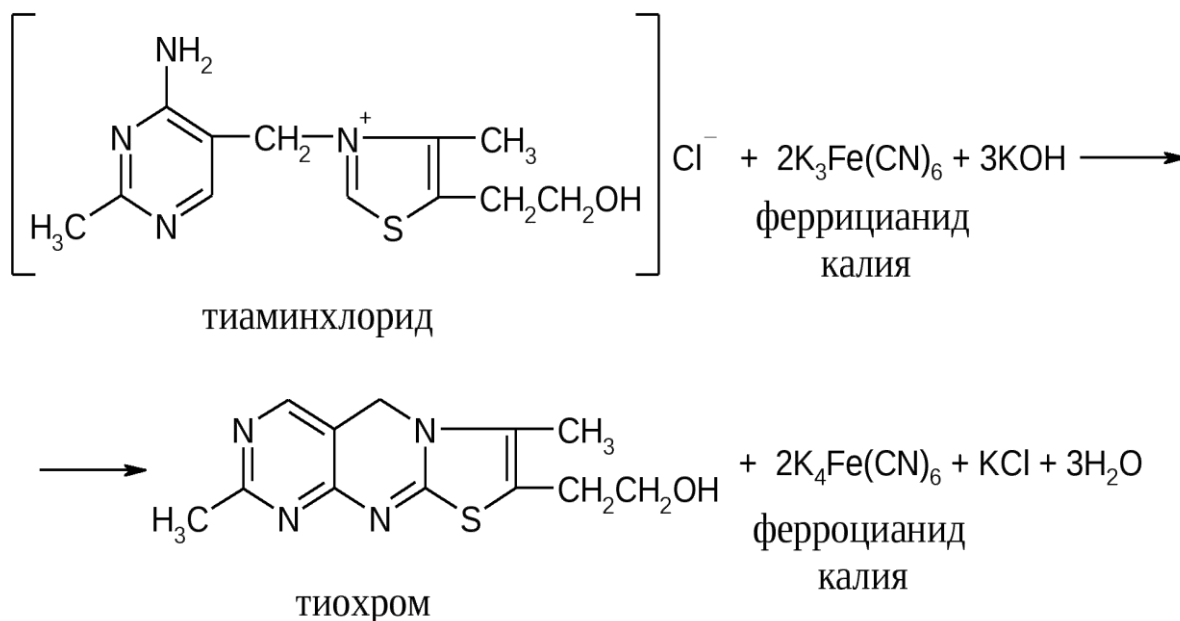
Исследуемый материал: тиаминбромид (или хлорид), порошок или 5%-ный раствор тиамин.

Приборы: штатив с пробирками, пипетки, ультрафиолетовая лампа.

Реактивы: железосинеродистый калий (ферроцианид калия – $K_3[Fe(CN)_6]$ 5%-ный раствор), 10%-ный раствор гидроксида натрия, бутиловый или изоамиловый спирт.

Ход работы. Немного порошка тиаминбромида (или хлорида) (приблизительно 10 мг) растворяют в 5 мл воды, прибавляют 1 мл 5%-ного раствора железосинеродистого калия, 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия, 5 мл бутилового (или изоамилового) спирта. Пробирку (или стаканчик) хорошо встряхивают и оставляют на несколько минут. Верхний, спиртовой слой осторожно сливают в пробирку из нефлуоресцирующего стекла и рассматривают в лучах ртутно-кварцевой лампы (в темном помещении). Хорошо заметна голубая или синяя флуоресценция.

Тиамин в щелочной среде окисляется железосинеродистым калием в тиохром, обладающий голубой флуоресценцией в ультрафиолетовом свете:



Напишите уравнения реакции и приведите вывод.

2. Реакция на тиамин (витамин В₁) с диазореактивом

В основе реакции лежит способность витамина в щелочной среде образовывать с диазореактивом окрашенное азосоединение.

Исследуемый материал: 5%-ный раствора тиамин.

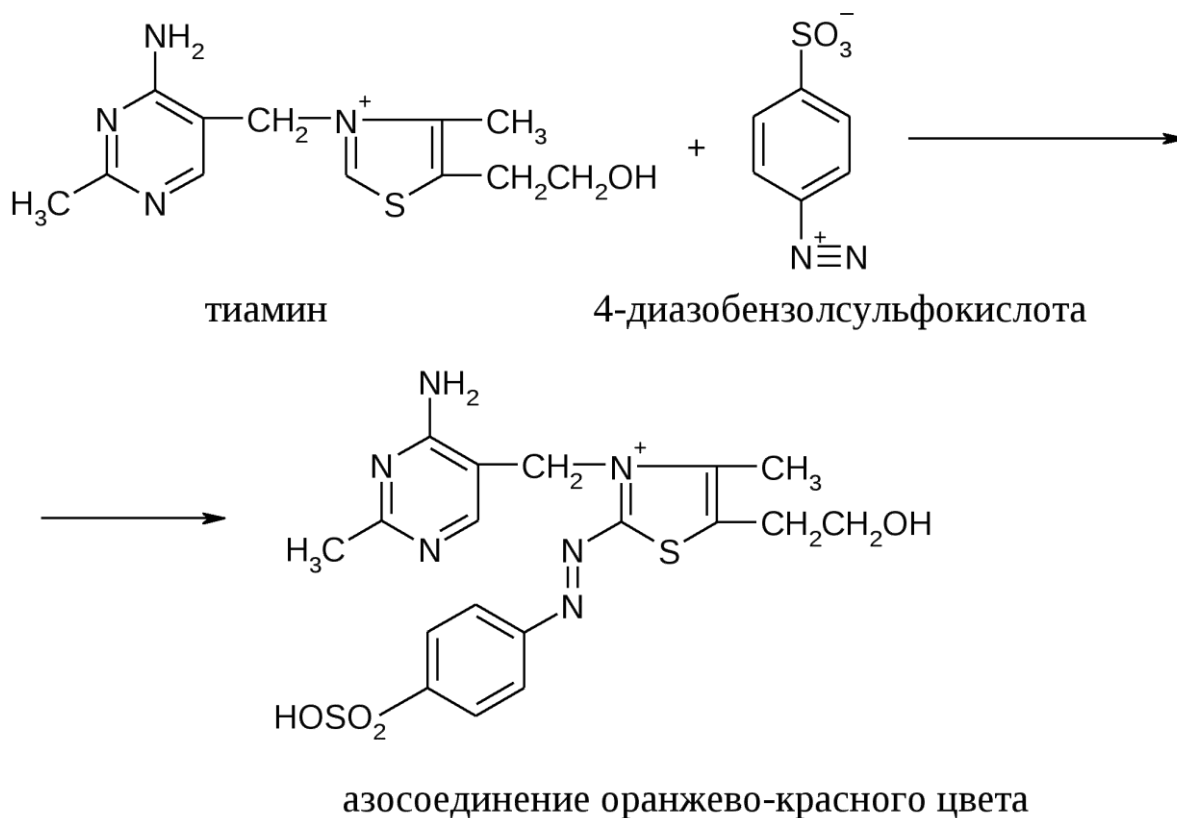
Приборы: штатив с пробирками, пипетки.

Реактивы: 1%-ный раствор сульфаниловой кислоты, 5%-ный раствор нитрита натрия, 10%-ный раствор бикарбоната натрия.

Ход работы.

А) В пробирку приливают по 5-10 капель 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты и 5%-ного раствора нитрита натрия (состав диазореактива). Сюда же вносят на кончике ножа или стеклянной палочки небольшое количество порошка тиамин и по стенке пробирки осторожно добавляют 5-7 капель 10%-ного раствора бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета. Приведите вывод.

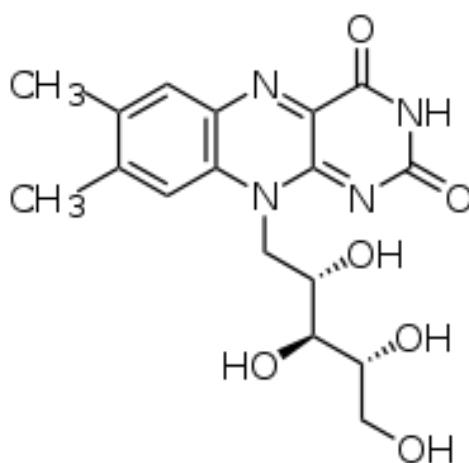
Б) К диазореактиву, содержащему 5 капель 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты и 5 капель 5%-ного раствора нитрита натрия, добавляют 1-2 капли 5%-ного раствора тиамин и затем по стенке, наклонив пробирку, осторожно добавляют 5-7 капель 10%-ного бикарбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого цвета.



Напишите уравнения реакции и приведите вывод.

Опыт №9. Качественная реакция на витамин В₂ (рибофлавин)

Рибофлавин (витамин В₂) состоит из изоаллоксазинового ядра и спирта рибитола.



Рибофлавин входит в состав коферментов оксидоредуктаз флавинадениндинуклеотида (ФАД) и флавинмонопнуклеотида (ФМН), которые участвуют в окислительно-восстановительных реакциях,

используемых организмом в целях выработки энергии и ее запаса в виде АТФ. Флавиновые ферменты принимают участие в окислении жирных, янтарной и других кислот; инактивируют и окисляют высокотоксичные альдегиды, расщепляют в организме чужеродные D-изомеры аминокислот, образующиеся в результате жизнедеятельности бактерий; участвуют в синтезе коферментных форм витамина В₆ и фолатина; поддерживают в восстановленном состоянии глутатион и гемоглобин.

При недостатке рибофлавина в организме наблюдается остановка роста, поражение слизистой оболочки ротовой полости, помутнение хрусталика глаза и другие заболевания.

Качественная реакция основана на способности витамина В₂ легко восстанавливаться, что сопровождается изменением окраски раствора из желтой в розовый с дальнейшим обесцвечиванием.

Исследуемый материал: 0,025%-ный раствора рибофлавина.

Приборы: штатив с пробирками, пипетки.

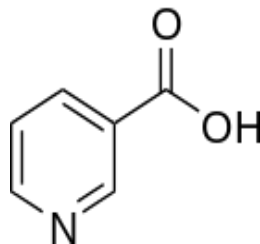
Реактивы: концентрированная соляная кислота и небольшие кусочки металлического цинка.

Ход работы. В пробирку приливают 10 капель 0,025%-ного раствора рибофлавина, 5 капель концентрированной соляной кислоты и кусочки металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с витамином, восстанавливая его. При этом раствор меняет окраску из желтого на красную и розовую, а затем обесцвечивается. Приведите вывод.

Опыт № 10. Качественная реакция на витамин В₅ (никотиновая кислота)

Основными представителями витамина В₅ являются никотиновая кислота и никотинамид, которые являются производным пиридина. В животных продуктах ниацин содержится в виде никотинамида, а в растительных – в виде никотиновой кислоты. Из витамина В₅ образуются два кофермента – никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). Эти коферменты входят в состав ферментов класса оксидоредуктаз и участвуют во многих окислительно-восстановительных реакциях, имеющих энергетическое значение. Отсутствие в пище данного витамина

вызывает заболевание пеллагру, симптомами которого являются дерматит, диарея, деменция.



Витамина В₅ содержится в ржаном хлебе, ананасе, гречке, фасоли, мясе, грибах, печени, почках. Суточная потребность взрослого человека 15-20 мг.

Никотиновая кислота при нагревании с раствором ацетата меди образует синий осадок плохо растворимой медной соли.

Исследуемый материал: 3%-ный раствор никотиновой кислоты в 10%-ной уксусной кислоте.

Приборы: штатив с пробирками, пипетки.

Реактивы. 5%-ный раствор ацетата меди.

Ход работы. В пробирку вносят 0,01 г никотиновой кислоты и 20 капель 10%-ного раствора уксусной кислоты. Нагревают до кипения и добавляют к прозрачному раствору равный объем 5%-ного раствора ацетата меди. Затем содержимое пробирки доводят до кипения и сразу охлаждают ее под струей холодной воды. При этом из раствора выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты. Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

Опыт № 11. Качественная реакция на витамин В₆ (пиридоксин)

Витамин В₆ – собирательное название производных 3-гидрокси-2-метилпиридинов. На самом деле он представляет собой группу трех витамеров: пиридоксина, пиридоксаля и пиридоксамина, которые тесно связаны между собой и действуют совместно. Витамин В₆ в форме кофермента – пиридоксальфосфата входит в состав т.н. пиридоксальных ферментов, катализирующих переаминирование, декарбоксилирование и другие превращения аминокислот в организмах, а также в состав фосфоорилазы гликогена.

Недостаток витамина В₆ вызывает анемию, дерматит и судороги. Витамеры витамина В₆ синтезируются микроорганизмами, зелёными растениями, у жвачных и человека – кишечной микрофлорой.



Качественное определение витамина В₆ основано на том, что при взаимодействии с раствором хлорида железа (III) он образует комплексную соль фенолята железа красного цвета.

Исследуемый материал: 1%-ный раствор витамина В₆.

Приборы: штатив с пробирками, пипетки.

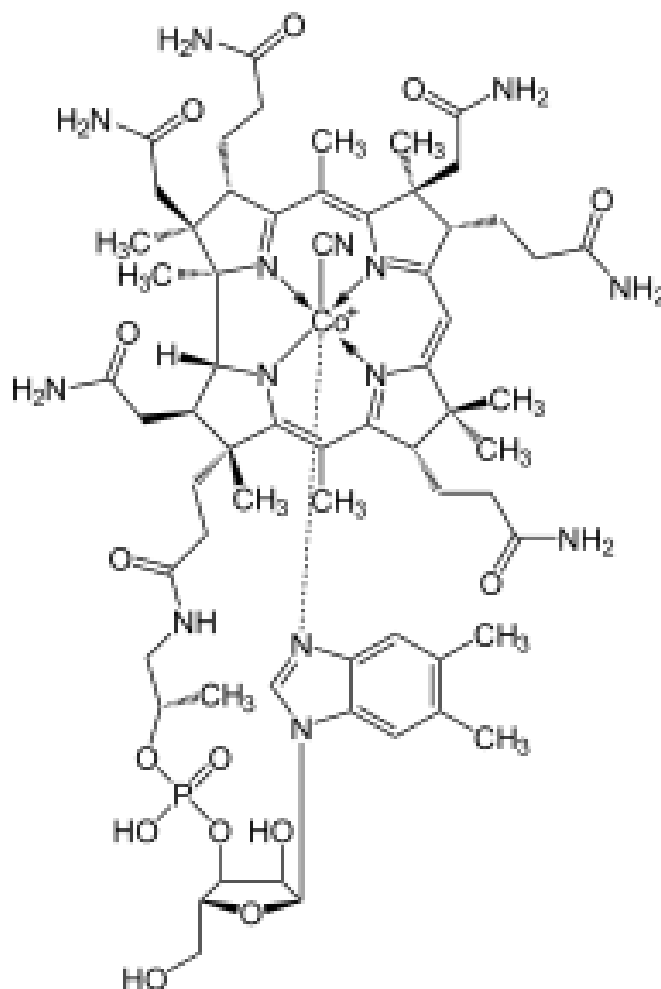
Реактивы. 1%-ный раствор хлорида железа (III).

Ход работы. В пробирке смешивают 5 капель 5%-ного раствора пиридоксина и 1-2 капли 5%-ного раствора хлорного железа и встряхивают. Смесь окрашивается в красный цвет. Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

Опыт № 12. Качественная реакция на витамин В₁₂ (цианкобаламин)

Витаминами В₁₂ называют группу кобальтсодержащих биологически активных веществ, называемых кобаламинами. К ним относят собственно цианкобаламин, гидроксикобаламин и две коферментные формы витамина В₁₂: метилкобаламин и 5-дезоксиденозилкобаламин. В более узком смысле витамином В₁₂ называют цианкобаламин, так как именно в этой форме в организм человека поступает основное количество витамина В₁₂.

Дефицит витамина В₁₂ является причиной некоторых видов анемий. Обычно дефицит витамина В₁₂ лечат внутримышечными инъекциями препарата цианкобаламина. Это единственный витамин, синтезируемый почти исключительно микроорганизмами: бактериями, актиномицетами и сине-зелёными водорослями. Из животных тканей наиболее богаты витамином В₁₂ печень и почки.



Этот витамин вырабатывается микроорганизмами в пищеварительном тракте любого животного, включая человека, как продукт деятельности микрофлоры. В пищевой промышленности многих стран витамин добавляют в такие продукты, как сухие завтраки, шоколадные батончики, энергетические напитки.

Качественное определение витамина B_{12} основано на способности кобальта, входящего в состав витамина, взаимодействовать с тиомочевинной с образованием при нагревании роданистого кобальта зеленого цвета.

Исследуемый материал: витамин B_{12} .

Реактивы: 10%-ный раствор тиомочевины, концентрированная серная кислота.

Приборы: штатив с пробирками, пипетки, фильтровальная бумага, электрическая плитка.

Ход работы. На беззольный фильтр наносят 2-3 капли 10%-ного раствора тиомочевины и высушивают над электроплиткой. Затем

на фильтр добавляют 1-2 капли минерализата витамина. На фильтре (чаще по краям пятна) появляется зеленое окрашивание.

Для приготовления минерализата в пробирку вносят содержимое одной ампулы витамина B_{12} и 3-5 капель концентрированной серной кислоты, закрывают ее пробкой с обратным холодильником, закрепляют на штативе в несколько наклоненном положении и производят сжигание в вытяжном шкафу до обесцвечивания раствора. По окончании минерализации добавляют 1 мл дистиллированной воды небольшими порциями при постоянном перемешивании и вновь подсушивают.

Контрольные вопросы

1. Какие вещества называются витаминами?
2. Приведите классификацию витаминов.
3. Номенклатура витаминов.
4. Что такое авитаминозы, гипо- и гипervитаминозы и каковы причины их возникновения?
5. Что называется антивитаминами? На чем основан механизм их действия?
6. Методы определения витаминов.
7. Какова химическая природа, свойства и биологическая роль витамина А.
8. Какова химическая природа, свойства и биологическая роль витамина Д.
9. Какова химическая природа, свойства и биологическая роль витамина Е.
10. Какова химическая природа, свойства и биологическая роль витамина B_1 .
11. Какова химическая природа, свойства и биологическая роль витамина B_2 .
12. Какова химическая природа, свойства и биологическая роль витамина B_6 .
13. Какова химическая природа, свойства и биологическая роль витамина B_{12} .
14. Какова химическая природа, свойства и биологическая роль витамина С.
15. Качественная реакция на витамины А, Е, B_2 , С.

7. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Краткие теоретические сведения

Нуклеиновые кислоты в той или иной степени были известны исследователям достаточно давно. Например, в 1847 г. немецкий химик Ю. Либих, иностранный член-корреспондент Петербургской академии наук, впервые выделил из мясного экстракта инозиновую кислоту (монофосфорный эфир нуклеозида инозина).

В 1869 г. швейцарский врач Ф. Мишер, исследуя химический состав ядер лейкоцитов, выделил из них вещество, обладавшее кислыми свойствами, которое он назвал нуклеином. Это событие расценивают как открытие нуклеиновых кислот, хотя сам термин «нуклеиновая кислота» был введен лишь 30 лет спустя, в 1899 г.

Немногим ранее, в 1891 г., немецкий биохимик Альбрехт Кёссель осуществил и описал гидролиз нуклеиновой кислоты и показал, что она состоит из остатков сахара, фосфорной кислоты и четырех гетероциклических оснований, являющихся производными пурина и пиримидина. Он же впервые доказал существование двух типов нуклеиновых кислот.

С начала XX в. началось интенсивное изучение продуктов расщепления нуклеиновых кислот. Большой вклад в химию пуринов и пиримидинов внес химик-органик Э. Фишер, а позднее в работах Ф. Левена и Д. Гулланда было дано описание строения углеводных компонентов и определена природа нуклеозидных звеньев в составе нуклеиновых кислот.

Используемые и в настоящее время термины нуклеозид и нуклеотид были предложены Ф. Левеном еще в 1908-1909 гг. Окончательно химическое строение нуклеозидов и нуклеотидов, а также роль фосфодиэфирной связи в полимеризации мономерных звеньев нуклеиновых кислот были выяснены в 1952 г. английскими исследователями под руководством А. Тодда.

После открытия того факта, что нуклеиновые кислоты являются полимерами, состоящими из нуклеотидов четырех типов, с конца 30-х гг. XX столетия утвердилось мнение, что полимер нуклеиновой кислоты представляет собой многократно повторяющиеся тетрануклеотиды,

состоящие из всех четырех азотистых оснований. Данная теория, сформулированная Ф. Левеном, была опровергнута в 1950 г. Эрвином Чаргаффом с сотрудниками из Колумбийского университета. Чаргафф установил значительные различия в нуклеотидном составе ДНК из разных источников и сформулировал основные положения, характеризующие состав нуклеиновых кислот, которые получили название правил Чаргаффа.

Вершиной исследований строения нуклеиновых кислот явилась модель двойной спирали ДНК, предложенная в 1953 г. американским биохимиком и генетиком Дж. Уотсоном и английским физиком Ф. Криком. Эта дата официально считается моментом рождения новой отрасли биологической науки – молекулярной биологии.

На основании модели ДНК была выдвинута гипотеза полуконсервативного способа репликации данной молекулы, которая была подтверждена в 1957 г. после открытия Артуром Корнбергом фермента ДНК-полимеразы.

Начало работам, приведшим к выяснению биологической роли РНК, было положено в 30-е гг. Т. Касперсоном и Ж. Браше, которые изучали содержание и распределение в клетке нуклеиновых кислот, и в первую очередь РНК.

Значительно позже (в 50-х гг.) было показано, что синтез белка осуществляется рибосомами, но представления о существовании РНК-посредника (иРНК), переносящего информацию от ДНК к рибосомам, были сформулированы французскими генетиками Ф. Жакобом и Ж. Моно только в 1961 г. Главный фермент транскрипции – ДНК-зависимая-РНК-полимераза – был открыт в 1960 г. С. Вейссом, Ж. Гурвицем и О. Стивенсом.

Таким образом, подводя итог этой краткой исторической справке и принимая во внимание современные представления о структуре и функции нуклеиновых кислот, можно сказать, что нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) являются важнейшими информационными макромолекулами клетки, которые с химической точки зрения представляют собой полимеры, построенные из многих тысяч и даже миллионов нуклеотидов, соединенных между собой 3'-5'-фосфодиэфирными связями.

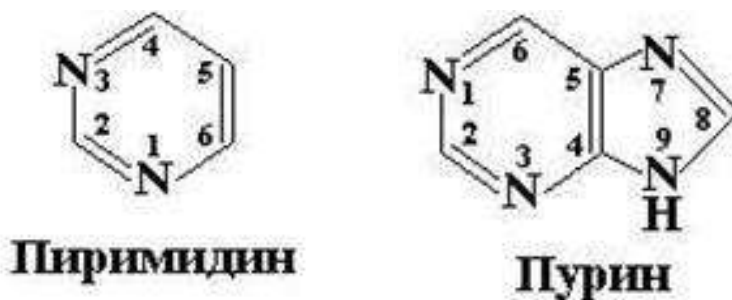
В зависимости от вида нуклеиновой кислоты принято различать *дезоксирибонуклеотиды* (содержат 2'-дезоксид-Д-рибозу и входят в состав ДНК) и *рибонуклеотиды* (содержат Д-рибозу и входят в состав РНК). Кроме того, в зависимости от химической природы азотистых оснований (пуриновые или пиримидиновые), входящих в состав нуклеотидов, их подразделяют на пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды соответственно.

Следует иметь в виду, что биологическая роль нуклеотидов не ограничивается их участием в качестве мономеров в процессах биосинтеза ДНК и РНК. В частности, пуриновые рибонуклеотиды выполняют функции универсальных источников энергии (например, АТФ и GTP), регуляторных сигналов (сAMP, сGMP), они входят в состав важнейших коферментов (FAD, NAD⁺, NADP⁺) и служат переносчиками метильных групп (S-аденозилметионин); пиримидиновые нуклеотиды функционируют в качестве макроэргических интермедиатов в углеводном обмене (UDP-глюкоза, UDP-галактоза) и в синтезе липидов (CDP-ацилглицерол).

7.1. КОМПОНЕНТЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Структура пиримидиновых и пуриновых оснований.

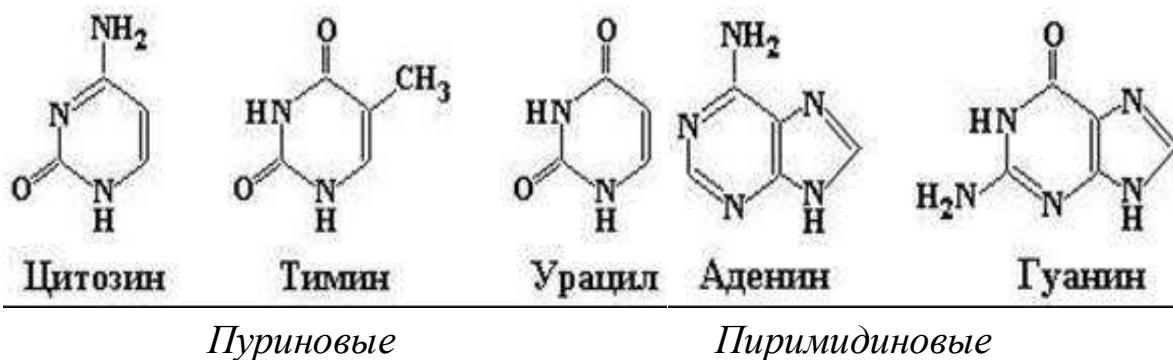
Пиримидиновые и пуриновые азотистые основания, входящие в состав нуклеотидов, представляют собой замещенные производные шестичленного гетероцикла – **пиримидина**, с одной стороны, и **пурина** – сложной гетероциклической системы, состоящей из двух конденсированных гетероциклов: пиримидина и имидазола, – с другой стороны.



Положения атомов в ароматических кольцах пронумерованы в соответствии с принятой номенклатурой. Следует обратить внимание на то, что нумерация в пиримидиновом и пуриновом кольцах идет в противоположных направлениях, при этом атом углерода С5 в обеих молекулах находится в одном и том же положении.

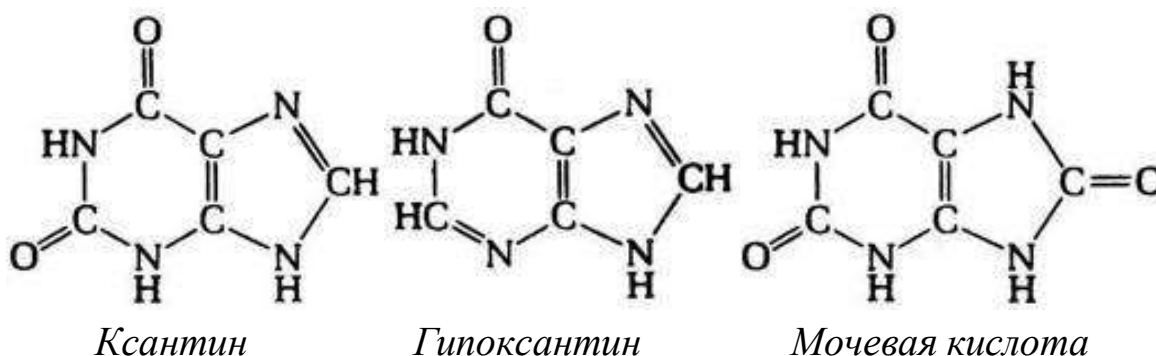
Главными пиримидиновыми основаниями и у прокариота, и у эукариота являются **цитозин** (Cyt), **тимин** (Thy) и **урацил** (Ura).

Пуриновые основания представлены **аденином** (Ade) и **гуанином** (Gua). ДНК содержит два пиримидиновых основания (цитозин и тимин) и два пуриновых основания (аденин и гуанин). В состав РНК также входят два пиримидина – цитозин и урацил и два пурина – аденин и гуанин.



Кроме аденина и гуанина известны также два других пуриновых основания – **ксантин** (Хан) и **гипоксантин** (Нур), которые выступают в роли интермедиатов в процессах метаболизма пуринов, – в частности, ксантин и гипоксантин являются продуктами окислительного дезаминирования гуанина и аденина соответственно.

Гипоксантин выполняет важную функцию в качестве одного из оснований, входящих в состав антикодона в транспортных РНК. У человека в роли конечного продукта катаболизма пуринов выступает окисленное пуриновое основание – **мочевая кислота** (UA).



Благодаря феномену кето-енольной таутомерии азотистые основания в нуклеотидах могут существовать либо в лактимной, либо в лактамной формах. В физиологических условиях преобладает лактамная форма гуанина тимина и урацила, но лактимные формы аденина и цитозина.

Для осуществления специфического спаривания основания должны находиться в соответствующей таутомерной форме. Миграция водородного атома позволяет каждому основанию существовать в различных таутомерных формах. Основания в составе двойной спирали ДНК, образующие канонические пары, должны иметь аминогруппы ($-\text{NH}_2$) и кетогруппы ($>\text{C}=\text{O}$), в отличие от таутомеров, имеющих иминогруппы ($=\text{NH}$) и енольные группы ($-\text{OH}$) и способных к неканоническому спариванию, как, например, пуриновое основание Ade, который может образовать пару с таутомерной формой Cyt (рис. 3).

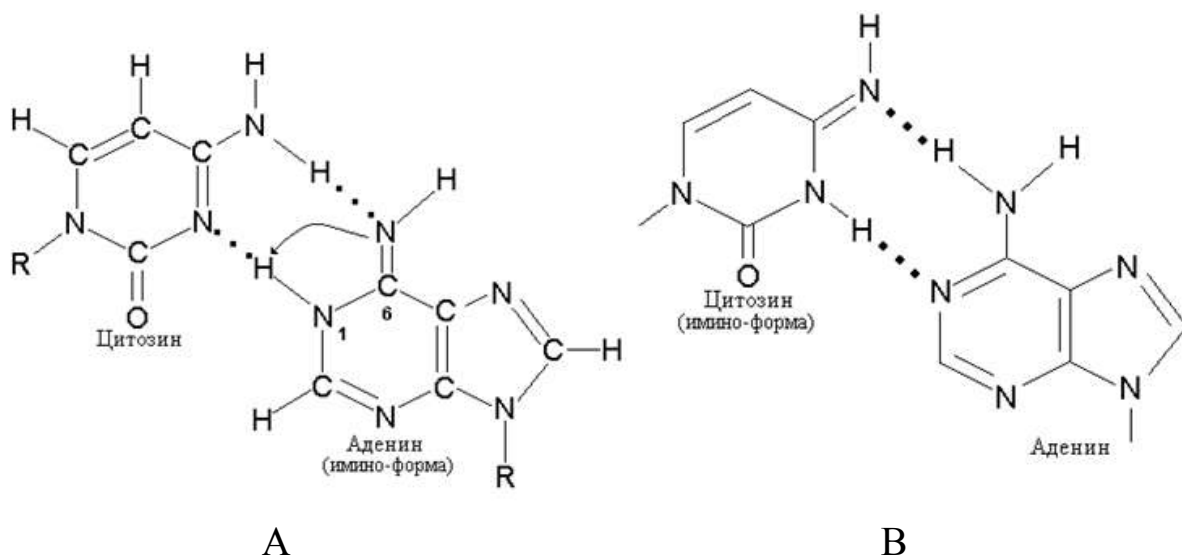


Рисунок 3. Образование неканонических пар с участием иминоформы цитозина и аденина (А) и иминоформы аденина с нормальным цитозином (В)

Как известно, точность копирования в процессе репликации ДНК настолько велика, что в среднем на каждые $1 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов приходится всего одна ошибка. Такую высокую точность репликации обеспечивает корректирующая (3'→5')-экзонуклеазная активность ДНК-полимеразы. Тем не менее, в ряде случаев ДНК-полимераза может ошибаться. Как раз одной из причин таких ошибок является способность всех азотистых оснований образовывать термодинамически невыгодные таутомерные формы за счет миграции атома водорода.

При этом, как указывалось выше, амино- и оксогруппы превращаются в имино- и енольные группы соответственно. Такие редкие таутомерные формы, как правило, образуют неправильные, неканонические пары с другими основаниями. Примеры такого спаривания показаны на рисунке 3.

Так, иминоформа Cyt образует пару не с Gua, а с Ade. В результате в процессе последующей репликации может произойти замена пары А-Т на G-С. Точно так же Ade способен образовывать редкую таутомерную иминоформу, которая приобретает способность комплементарно спариваться с неканоническим для него Cyt.

В норме образование пар между двумя пуринами, а между двумя пиримидинами или некомплементарными основаниями А-С или G-Т стерически затруднено, поскольку при этом не могут образовываться

подходящие водородные связи и, следовательно, нарушается геометрия спирали. Модифицированные пурины и пиримидины, с небольшой частотой встречающиеся в ДНК, образуют такие же водородные связи, что и их немодифицированные аналоги. В этом случае правила спаривания не нарушаются.

Физико-химические свойства пуриновых и пиримидиновых оснований. При значениях pH, близких к нейтральным, наименьшей растворимостью в водной среде обладает гуанин. Следующим в этом ряду стоит ксантин. Мочевая кислота в форме уратов сравнительно неплохо растворяется при нейтральном pH, но очень плохо растворима в жидкостях с более низкими значениями pH, например, в моче. Гуанин в моче человека в норме отсутствует, а ксантин и мочевая кислота являются ее обычными компонентами. Последние два пурина часто входят в состав камней мочевого тракта.

Нуклеозиды и нуклеотиды.

Свободные основания значительно менее распространены в природе, чем соответствующие нуклеозиды и нуклеотиды. Молекулы нуклеозидов построены из пуринового или пиримидинового основания, к которому β -N-гликозидной связью присоединен углевод (D-рибоза или 2'-дезоксид-рибоза) по N₉ или N₁-положению соответственно.

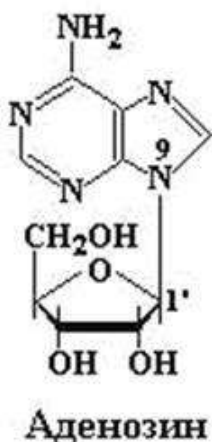
Таким образом, адениновый рибонуклеозид (аденозин, Ado) состоит из аденина и D-рибозы, присоединенной по N₉ атому пуринового цикла; гуанозин (Guo) – из гуанина и D-рибозы также в положении N₉ пуринового цикла; цитидин (Cyd) состоит из цитозина и рибозы, присоединенной по N₁ атому пиримидинового цикла, а уридин (Urd) построен из урацила и рибозы в положении N₁ пиримидина (рис. 4).

Природные нуклеозиды являются β -аномерами, в которых азотистые основания присоединяются к углеводам β -N-гликозидными связями, причем в образовании этой связи принимают участие N₉ атом пурина или N₁ атом пиримидина и в любом случае C₁ атом D-рибозы или 2'-дезоксид-рибозы.

В состав 2'-дезоксидрибонуклеозидов входят пуриновые или пиримидиновые основания и 2'-дезоксидрибоза, присоединенная по тем же атомам N₉ и N₁ в пуринах и пиримидинах соответственно. В целом присоединение рибозы или 2'-дезоксидрибозы к кольцевой структуре

основания происходит за счет относительно кислотолабильной N-гликозидной связи.

Пуриновый нуклеозид



Пиримидиновый нуклеозид

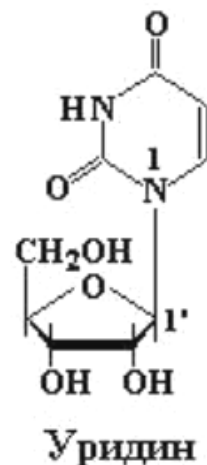


Рисунок 4. Структурные формулы пуринового (аденозина) и пиримидинового (уридина) нуклеозидов

Нуклеотиды – это производные нуклеозидов, фосфорилированные по одной или более гидроксильным группам углеводного остатка (D-рибозы или 2'-дезоксирибозы). Так, аденозинмонофосфат (АМР или адениловая кислота) построен из аденина, рибозы и остатка фосфорной кислоты. 2'-Дезоксиаденозинмонофосфат (dАМР или дезоксиадениловая кислота) представляет собой молекулу, состоящую из аденина, 2'-дезоксирибозы и остатка фосфорной кислоты. Обычно к урацилу присоединена рибоза, а к тимину – 2'-дезоксирибоза. Таким образом, тимидиловая кислота (ТМР) состоит из тимина, 2'-дезоксирибозы и фосфата, а в состав уридиловой кислоты (УМР) входят урацил, рибоза и фосфат.

Молекулы ДНК представляют собой полимеры тимидиловой, 2'-дезокситидиловой, 2'-дезоксиадениловой и 2'-дезоксигуаниловой кислот. В то же время РНК образуется в результате сополимеризации уридиловой, цитидиловой, адениловой и гуаниловой кислот.

Номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов.

Положение фосфатной группы в молекуле нуклеотида указывается цифрой. Например, аденозин с фосфатной группой, присоединенной сложноэфирной связью к третьему атому углерода рибозы,

обозначается как 3'-монофосфат. Штрих после цифры ставят для того, чтобы отличать номер углерода в пуриновом или пиримидиновом основании от положения атома углерода в углеводном остатке. При нумерации атомов углерода в азотистых основаниях штрих не ставится. Нуклеотид, состоящий из 2'-дезоксиаденозина (dAdo) с фосфатным остатком по С₅ атому, в молекуле сахара обозначается как 2'-дезоксиаденозин-5'-монофосфат (табл. 10).

Таблица 10

Номенклатура нуклеозидов и нуклеотидов рибо-ряда

Азотистое основание	Нуклеозид	Нуклеотиды
Аденин (Ade)	Аденозин (Ado)	Аденозинмонофосфат (AMP) Аденозиндифосфат (ADP) Аденозинтрифосфат (ATP)
Гуанин (Gue)	Гуанозин (Guo)	Гуанозинмонофосфат (GMP) Гуанозиндифосфат (GDP) Гуанозинтрифосфат (GTP)
Цитозин (Cyt)	Цитидин (Cyd)	Цитидинмонофосфат (CMP) Цитидиндифосфат (CDP) Цитидинтрифосфат (CTP)
Урацил (Ura)	Уридин (Urd)	Уридинмонофосфат (UMP) Уридиндифосфат (UDP) Уридинтрифосфат (UTP)

Нуклеозиды, содержащие аденин, гуанин, цитозин, тимин и урацил, принято обозначать буквами А, G, С, Т, U или общепринятыми аббревиатурами Ado (dAdo), Guo (dGuo), Cyd (dCyd), Thd, Urd соответственно.

В таблице 10 приведены примеры только рибонуклеотидов и рибонуклеозидов. Наличие буквы d перед соответствующим сокращением означает, что углеводным компонентом такого нуклеозида является 2'-дезоксирибоза. Например, гуанозин, содержащий 2'-дезоксирибозу, может быть обозначен dG (dGuo, дезоксигуанозин), а соответствующий ему монофосфат с фосфатной группой, присоединенный к третьему атому углерода дезоксирибозы, – 2'-дезоксигуанозин-5'-монофосфат (dGuo-3'-MP). Часто в тех случаях, когда фосфат присоединен к С₅ атому рибозы или 2'-дезоксирибозы, символ 5' опускается. Так,

гуанозин 5'-монофосфат принято обозначать GMP, а 5'-монофосфат дезоксигуанозина сокращают как dGMP. Если к углеводному остатку нуклеозида присоединены 2 или 3 остатка фосфорной кислоты, используются аббревиатуры DP (дифосфат) и TP (трифосфат). Таким образом, аденозин с тремя фосфатными группами в 5'-положении углевода будет обозначаться как АТР. Примеры моно-, ди-, и трифосфатов Ado и Urd приведены на рис. 5.

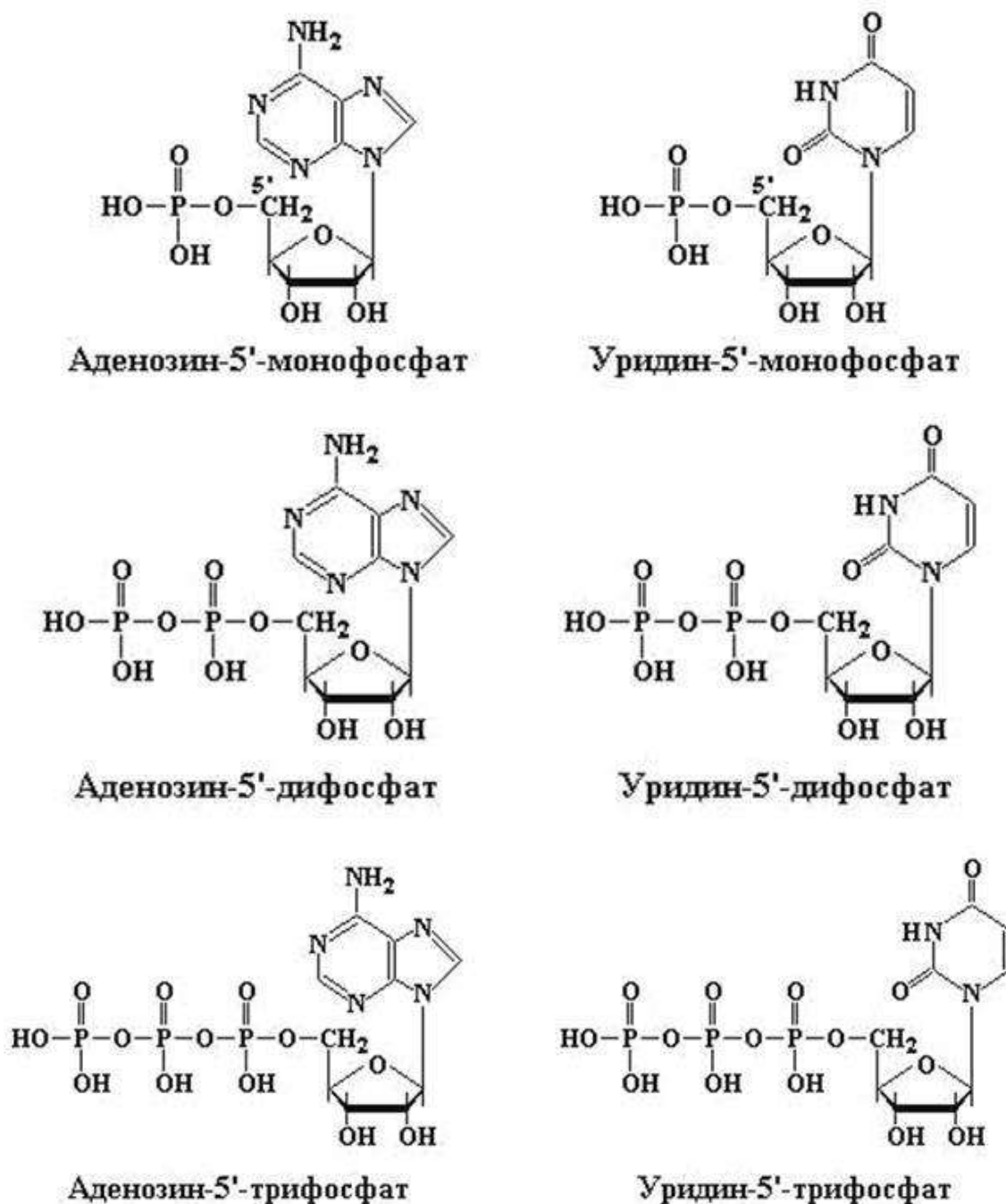


Рис. 5. Структурные формулы моно-, ди-, и трифосфатов аденозина и уридина

7.2. СТРУКТУРА И ИНФОРМАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Структура дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК).

К числу важнейших научных событий второй половины XX в. следует отнести открытие того факта, что генетическая информация кодируется полимерной молекулой ДНК, образованной лишь четырьмя типами мономерных единиц. Именно ДНК служит химической основой наследственности. Молекула ДНК содержит в своей структуре множество генов. Гены функционируют не автономно: их репликация и транскрипция строго контролируются по принципу обратной связи, в которой ключевую роль играют продукты экспрессии. Знание структуры и функции нуклеиновых кислот необходимо для понимания сути генетических процессов, происходящих в клетке.

При рассмотрении структуры ДНК принято различать четыре уровня организации этой макромолекулы: первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры. Под первичной структурой ДНК (как и любой другой нуклеиновой кислоты) понимают последовательность расположения нуклеотидов в полинуклеотидных цепях.

Вторичная структура, согласно модели Уотсона и Крика, предложенной в 1953 г., – это двойная спираль ДНК, состоящая из двух правозакрученных вокруг общей оси полинуклеотидных цепей. Уотсон и Крик предположили, что две полинуклеотидные цепи в молекуле ДНК не связаны ковалентно, а соединяются водородными связями, возникающими между азотистыми основаниями, направленными внутрь двойной спирали. Реакции взаимодействия G с C и A с T получили название спаривания оснований, а основания, способные образовывать пары, получили название комплементарных.

Согласно модели двойной спирали, две полинуклеотидные цепи в молекуле ДНК – антипараллельны, т.е. идут в противоположных направлениях. Поэтому, рассматривая спираль вдоль оси, можно видеть, что одна цепь идет в направлении $5' \rightarrow 3'$, а другая – в направлении $3' \rightarrow 5'$ (рис. 6). Вдоль спирали основания уложены стопками друг на друга, и стабилизация спиральной структуры дополнительно обеспечивается межплоскостными взаимодействиями между ароматическими кольцами соседних оснований.

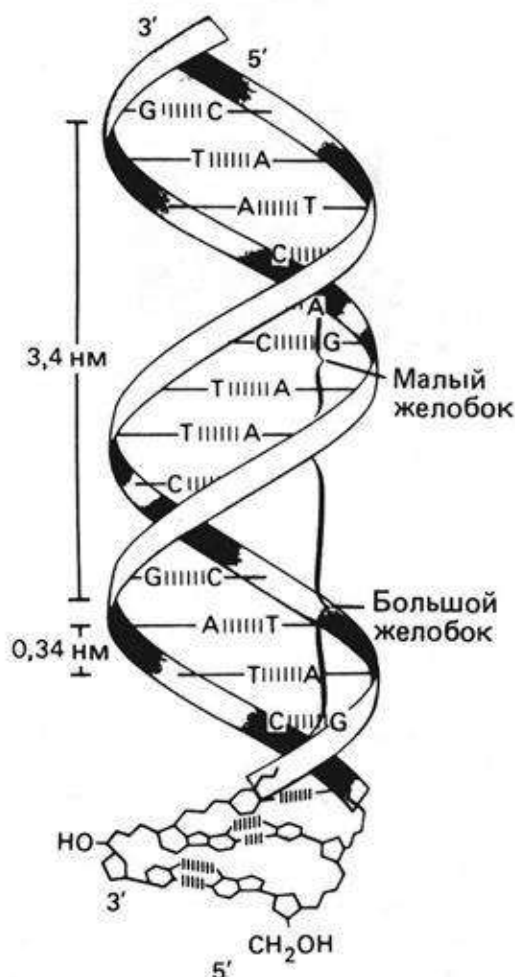


Рисунок 6. Модель двойной спирали ДНК

Эти специфические контакты получили название стэкинг-взаимодействий, которые являются результатом реализации вандерваальсовых сил, возникающих за счет перекрывания р-облаков над и под двойными связями ненасыщенных колец пуринов и пиримидинов, с одной стороны, и гидрофобных взаимодействий – с другой.

Две соседние пары оснований в молекуле ДНК, расположенные вдоль оси спирали, образуют угол в 36° . Таким образом, 10 пар оснований составляют один полный оборот спирали в 360° . Две цепи, образующие двойную спираль, уложены таким способом, что наблюдаемая структура характеризуется наличием малой бороздки, шириной 12\AA (1,2 нм), и большой бороздки, шириной 22\AA (2,2 нм). Двойная спираль правосторонняя: если смотреть вдоль оси спирали – повороты следуют по часовой стрелке. Данное описание соответствует модели ДНК, известной как В-форма.

ДНК может формировать несколько типов двойных спиралей. В настоящее время описано, по крайней мере, шесть форм (от А до Е и Z-форма). Большая часть структурных вариантов ДНК может существовать только в строго контролируемых условиях.

Эти варианты различаются: 1) числом пар оснований, приходящихся на один виток двойной спирали; 2) расстоянием между плоскостями пар оснований и углом, который они образуют с осью спирали; 3) диаметром спирали; 4) направленностью (правая, левая) двойной спирали.

При физиологических условиях (низкая концентрация соли, высокая степень гидратации) доминирующим структурным типом ДНК является В-форма (правоспирализованная). Шаг спирали такой молекулы равен 34 Å (3,4 нм). На один виток ДНК приходится 10 пар оснований, удерживаемых водородными связями и стэкинг-взаимодействиями.

А-форма отличается от В-формы тем, что плоскости оснований составляют с перпендикуляром к оси спирали угол, равный 20°. Поэтому расстояние между парами оснований по вертикали уменьшается до 2,9 Å (0,29 нм), а число пар на виток увеличивается до 11-12. А-форма интересна еще и тем, что ее конформация близка к структуре гибридов ДНК-РНК и структуре двухспиральных РНК.

Z-форма представляет собой наиболее резкий контраст с классическими формами ДНК. Особенностью В- и А-форм ДНК является то, что сахарофосфатные остовы обеих цепей этих ДНК образуют правую спираль. При определенных условиях отдельные участки ДНК принимают форму левой спирали. В этом случае расстояние между соседними парами оснований увеличивается до 7,7 Å (0,77 нм), а число пар на один виток возрастает до 12. Свое название Z-форма получила из-за зигзагообразной (zigzag) линии, которую образует сахарофосфатный остов вдоль спирали.

Двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, за крайне редким исключением, обладают уникальными топологическими характеристиками. Кольцевые молекулы имеют в структуре соответствующие изгибы и петли, которые получили название супервитков и которые хорошо различимы при использовании электронной микроскопии (рис. 7). На последней микрофотографии (С) цифрами указано число супервитков в каждой молекуле.

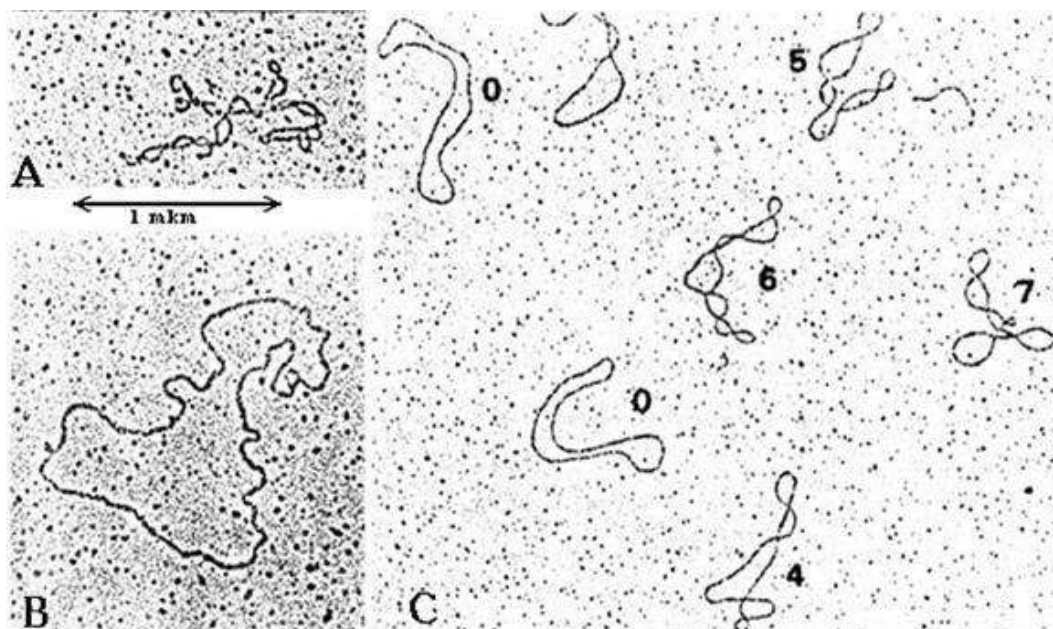


Рисунок 7. Электронные микрофотографии суперспирализованных молекул ДНК: А – суперспирализованная митохондриальная ДНК; В – релаксированная форма митохондриальной ДНК; С – двухцепочечная кольцевая ДНК фага М13 с разной степенью сверхспиральности

Если двойную спираль повернуть на один или несколько полных оборотов в направлении ее раскручивания, то в результате получим напряженную структуру. Такая напряженная структура, которая характеризуется недостатком оборотов, получила название отрицательно суперспирализованной ДНК. Возникшие отрицательные супервитки закручивают ДНК против часовой стрелки, т.е. в направлении, противоположном ходу обычной правосторонней двойной спирали. Такую спираль называют недокрученной. Напряжение, возникающее вследствие дефицита витков, может быть компенсировано либо разрушением водородных связей между комплементарными парами оснований и раскрытием двойной спирали на небольшом участке макромолекулы, либо путем сворачивания в направлении, противоположном тому, в котором она была повернута. Так, напряжение вращения, которое было внесено в молекулу, может быть смягчено за счет образования третичной структуры с хорошо различимыми супервитками (см. рис. 7).

Под четвертичной структурой ДНК понимают образование нуклеопротеидных комплексов (нуклеосом – комплексов гистонов с ДНК у эукариота или комплексов гистоноподобных белков с ДНК

у прокариота), которые принимают участие в компактизации ДНК с образованием хромосом (у эукариота) или нуклеоидов (у прокариота).

Структура рибонуклеиновых кислот (РНК).

РНК представляет собой сополимер пуриновых и пиримидиновых рибонуклеотидов, соединенных друг с другом, как и в ДНК, 3',5'-фосфодиэфирными мостиками. По ряду признаков ДНК и РНК отличаются друг от друга. У РНК углеводным остатком, к которому присоединены пуриновые или пиримидиновые основания и фосфатные группы, является рибоза, а не 2'-дезоксирибоза (как у ДНК).

Пиримидиновые компоненты РНК отличаются от таковых у ДНК. РНК не содержит тимина, а его место в молекуле РНК занимает урацил. РНК – одноцепочечная молекула, которая способна сворачиваться с образованием «шпилек» – особых структур, имеющих двухспиральные характеристики. При описании строения рибонуклеиновых кислот, как правило, упоминают три вида молекул РНК: информационные (иРНК), рибосомальные (рРНК) и транспортные РНК (тРНК). Информационные РНК выполняют функцию молекул-посредников и служат переносчиками информации от гена к белок-синтезирующей системе клетки. Они выполняют роль матриц для синтезируемого полипептида, т.е. определяют аминокислотную последовательность белка.

Рибосомные РНК выполняют роль структурных компонентов рибосом, которые обеспечивают специфический контакт иРНК и тРНК, в результате которого происходит трансляция нуклеотидной последовательности, считанной с определенного гена, в аминокислотную последовательность соответствующего белка. Транспортные РНК – это адапторные молекулы, участвующие в трансляции информации иРНК в последовательность аминокислот в белках.

Кроме упомянутых трех видов РНК, в настоящее время открыты и интенсивно изучаются так называемые малые ядерные РНК (мяРНК), обозначаемые U1, U2, U4, U5 и U6, которые принимают участие в формировании сплайсисом – организованных структур, обеспечивающих сплайсинг иРНК эукариот. Более того, в 2000 г. был открыт неизвестный ранее вид двухцепочечных молекул РНК, которые получили название малых интерферирующих РНК (миРНК), принимающих участие в защите эукариотических клеток от вирусных инфекций.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 12

Цель работы: изучение и овладение методами извлечения, качественной идентификации и количественного определения нуклеиновых кислот в биологических препаратах.

Опыт № 1. Выделение ДНК

Исследуемый материал: источники ДНК (овощи или фрукты: лук, чеснок, банан и томаты).

Реактивы: буферный раствор (в 120 мл дистиллированной воды растворяют 1,5 г хлорида натрия, 5 г пищевой соды и 5 мл жидкого моющего средства), изопропиловый спирт.

Приборы: коническая колба, пробирки, стеклянная палочка, фильтровальная бумага, пипетка.

Ход работы. Сначала необходимо приготовить буферный раствор (буфер). В коническую колбу наливают в 120 мл дистиллированной воды и растворяют 1,5 г хлорида натрия, 5 г пищевой соды и 5 мл детергента (моющее средство для посуды). Детергент выполняет две функции: разрушает клеточные стенки и способствует расщеплению крупных белков, которые иначе могут выделяться вместе с ДНК. Для того чтобы замедлить деградацию выделенной ДНК, буфер перед началом опыта охлаждают в бане, наполненной смесью колотого льда с солью.

В качестве источника ДНК подойдут овощи или фрукты. Хорошие результаты получаются с луком, чесноком, бананами и томатами. Возьмите очищенный чеснок, разрежьте на мелкие кусочки, или можно использовать давилку для чеснока. При такой обработке клетки отделяются друг от друга, что способствует более эффективному действию детергента. Поместите 5 мл полученного пюре в чистую коническую колбу, добавьте 10 мл охлажденного буфера и энергично перемешивайте полученную смесь в течение не менее 2-3 минут. В это время происходит разрушение клеточных стенок детергентом и выход содержимого клеток в раствор. Далее нужно отделить раствор, содержащий ДНК и другие молекулы, от нерастворимых остатков растительного материала. Для этого лучше всего использовать центрифугу. Смесь прокрутите на центрифуге на низкой скорости в течение

5 минут, а затем, стараясь не взбалтывать осадок, слейте в пробирку не менее 5 мл надосадочной жидкости. Отфильтровать раствор через складчатый фильтр. Полученный раствор содержит фрагменты ДНК и множество других молекул – РНК, белков, углеводов и т.п.

Экстракция ДНК. Для экстракции ДНК используют небольшое количество изопропилового спирта, предварительно сильно охлажденного в морозильнике. При помощи пипетки аккуратно нанесите 10 мл охлажденного спирта на поверхность раствора ДНК. Для этого прикоснитесь пипеткой к стенке пробирки и, слегка наклонив ее, позвольте спирту медленно стечь по стенке. Если вы все сделали правильно, спирт, плотность которого меньше плотности буфера, останется на поверхности раствора.

Поместите тонкую стеклянную или деревянную палочку в раствор таким образом, чтобы ее кончик оказался непосредственно под границей между буфером и спиртом, и очень осторожно в течение 1 мин поворачивайте попеременно в разные стороны. При этом наиболее длинные фрагменты ДНК накрутятся на палочку. Затем вытащите палочку – спирт заставит ДНК прилипнуть к концу палочки, и вы увидите на нем прозрачный вязкий осадок.

Даже после самой тщательной экстракции часть ДНК останется в водном растворе, образуя в нем невидимую паутину. При добавлении некоторых красителей, например, метиленового синего, они связываются с заряженными фрагментами ДНК. Для окраски нитей, образованных оставшейся в растворе ДНК, достаточно добавить микроскопическое количество красителя – его молекулы свяжутся с ДНК, оставляя раствор неокрашенным. Приведите вывод.

Опыт № 2. Кислотный гидролиз нуклеопротеинов дрожжей и определение состава нуклеиновых кислот

Нуклеиновые кислоты являются небелковой частью нуклеопротеинов. Нуклеопротеины – это сложные белки, белковой частью которых являются в основном протамины или гистоны, которые обладают щелочными свойствами, за счет большого количества входящих в них диаминокарбоновых кислот (аргинин, лизин и гистидин). Нуклеопротеины могут быть легко выделены из тканей, содержащих большое

количество ядер, например, из зубной, панкреатической железы, селезенки, печени, почек и др. Особенно богаты нуклеопротеинами дрожжи, бактерии, простейшие, грибы, одноклеточные водоросли. Вирусы почти полностью построены из нуклеопротеинов.

Определить состав нуклеиновых кислот удастся с помощью кислотного гидролиза нуклеопротеинов клеток, например, дрожжей, в присутствии серной кислоты. При кислотном гидролизе нуклеопротеины вначале распадаются на белок и нуклеиновые кислоты, а затем при продолжительном гидролизе наступает их полный распад на полипептиды, пуриновые и пиримидиновые основания, рибозу, дезоксирибозу и фосфорную кислоту, которые могут быть обнаружены специфическими реакциями.

Исследуемый материал: дрожжи (сухие).

Реактивы: эфир, 0,4%-ный и 10%-ный растворы гидроксида натрия, 1%-ный раствор уксусной кислоты 10%-ный раствор серной кислоты, 1%-ный раствор сульфата меди, водный раствор аммиака (концентрированный), 1%-ный раствор нитрата серебра, спиртовой раствор α -нафтола, раствор серной кислоты (концентрированный), молибденовый реактив, песок.

Приборы: фильтровальная бумага, ступка, пестик, пробирки, центрифуга, стакан, стеклянная палочка, водяная баня, электрическая плитка, воздушный холодильник.

Ход работы. Одним из источников для выделения нуклеопротеидов являются дрожжи. Для этой цели 10 г дрожжей растирают в ступке со щепоткой песка, 0,5 мл эфира, добавляют 20 мл 0,4%-ного раствора гидроксида натрия и продолжают растирание в течение 15 мин. После этого разливают содержимое ступки в центрифужные пробирки, уравнивают их и центрифугируют в течение 5-10 минут при 2500 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в стакан и при постоянном помешивании добавляют 1%-ный раствор уксусной кислоты в количестве 15-20 мл для осаждения нуклеопротеида. Выпавший осадок отделяют путем центрифугирования и выделенный нуклеопротеид гидролизуют.

А. Гидролиз нуклеопротеина. Полученный осадок переносят в коническую колбу, добавляют к нему 10 мл 10%-ного раствора серной

кислоты и закрывают пробкой со вставленной в нее воздушным холодильником (или стеклянной трубкой длиной 20-30 мм). Колбу помещают в водяную баню и нагревают смесь в кипящей водяной бане в течение 1 час. После этого охлаждают колбу до комнатной температуры и фильтруют. В фильтрате определяют продукты гидролиза нуклеопротеида.

Б. Биуретовая реакция на пептиды. К 5-6 каплям гидролизата добавляют 10 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1%-ного раствора сульфата меди. При наличии белка жидкость приобретает характерную сине-фиолетовую окраску.

В. Проба на пуриновые основания. Нейтрализуют 0,5 мл гидролизата 1-2 каплями концентрированного раствора аммиака и добавляют 5 капель 1%-ного раствора нитрата серебра. Через несколько минут образуется рыхлый осадок соединений пуриновых оснований с серебром, окрашенный в бурый цвет.

Г. Качественная реакция на углеводный компонент (реакция Подбедова-Молиша). К 0,5 мл гидролизата добавляют 1-2 капли спиртового раствора α -нафтола, перемешивают и осторожно наслаивают 0,5 мл концентрированной серной кислоты. На границе раздела жидкостей появляется фиолетовое кольцо, свидетельствующее о наличии углеводного компонента в нуклеопротеидах.

Д. Молибденовая проба на фосфорную кислоту. К 0,5 мл молибденового реактива добавляют 5 капель гидролизата и кипятят смесь на пламени горелки. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонный цвет. После охлаждения в струе воды наблюдают появление желтого кристаллического осадка – фосфомолибдата аммония.

В тетради для лабораторных работ запишите принцип метода, ход работы и зарисуйте схему полного распада нуклеопротеида с указанием, входящих в них компонентов. Приведите выводы.

Опыт № 3. Количественное определение нуклеиновых кислот в биологических препаратах

Орциновый метод определения РНК. Рибоза, входящая в состав РНК, при взаимодействии с сильными неорганическими кислотами

(в частности с HCl) образует фурфурол, который конденсируется с орцином в присутствии следов хлорида железа (III). В результате образуется соединение синего цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации РНК в растворе.

Дифениламинный метод определения ДНК. Дезоксирибоза, входящая в состав ДНК, при нагревании с кислотой в мягких условиях образует фурфуриловый спирт, который конденсируется с дифениламином $(C_6H_5)_2NH$, образуя соединение синего цвета. Интенсивность окраски полученного раствора пропорциональна концентрации ДНК в растворе.

Исследуемый материал: дрожжи сухие.

Приборы и оборудование: спектрофотометр КФК-2, кюветы полистирольные, центрифуга К-24, весы центрифужные, пробирки центрифужные, водяная баня, плитка электрическая, колба круглодонная с обратным холодильником, ступка с пестиком, воронка стеклянная, пипетки на 1 и 5 мл, микропипетки автоматические, стакан, колба круглодонная, цилиндры мерные на 50-250 мл, стеклянные палочки, фильтр бумажный.

Реактивы для выделения и гидролиза нуклеопротеидов: эфир, 0,4%-ный раствор гидроксида натрия, 5%-ный раствор уксусной кислоты, 5%-ный раствор серной кислоты, вода дистиллированная, песок.

Реагенты для орцинового метода:

раствор А – орцин, 1% раствор;

раствор Б – концентрированная соляная кислота;

раствор В – хлорид железа (III) ($FeCl_3 \times 6H_2O$), 10%-ный раствор.

Дифениламинный реагент: дифениламин, 1,5%-ный раствор в уксусной кислота, концентрированная серная кислота, уксусный альдегид, концентрированная хлорная кислота ($HClO_4$), РНК, стандартный раствор (100 мг/мл), ДНК, стандартный раствор (50 мг/мл)

Ход работы.

1. Выделение нуклеопротеидов из дрожжей

1. Увлажняют в ступке 5 г дрожжей добавлением 1 мл эфира и 1 мл воды.

2. Добавляют немного песка и растирают с 0,4% раствором NaOH, приливая его небольшими порциями по 5-10 мл (всего расходуют 50 мл раствора щелочи). Растирание продолжают в течение 15-20 мин.

3. Содержимое ступки центрифугируют 10 мин. при 2500 об/мин.
4. Супернатант переливают в стакан и к нему по каплям добавляют 5%-ный раствор уксусной кислоты до полного осаждения нуклеопротеида (обычно расходуют 10-15 мл раствора).
5. Осадок отделяют центрифугированием (8000g в течение 5 мин.).
6. Проводят гидролиз нуклеопротеидов кипячением с разбавленной серной кислотой. Для этого:
7. Осадок нуклеопротеидов переносят в круглодонную колбу, смывая его 5%-ной серной кислотой. Остаток кислоты вливают в колбу с осадком (всего расходуют не более 25 мл раствора).
8. Колбу закрывают пробкой с обратным холодильником, ставят на асбестовую сетку, нагревают на малом огне до кипения и кипятят 1 ч.
9. После этого колбу охлаждают и гидролизат фильтруют через бумажный фильтр.

2. Количественное определение нуклеиновых кислот

А. Орциновый метод количественного определения РНК

1. Непосредственно перед использованием смешивают 5 мл раствора А, 20 мл раствора Б и 0,5 мл раствора В (см. реактивы).
2. К 0,5 мл фильтрата и стандартного раствора добавляют по 3 мл полученного реактива.
3. Пробы нагревают на кипящей водяной бане в течение 25 минут, затем охлаждают.
4. Измеряют оптическую плотность растворов при $\lambda = 660$ нм на спектрофотометре КФК-2 относительно чистого реагента.
5. Рассчитывают концентрацию РНК в исследуемой пробе, используя следующую формулу:

$$C(\text{мг/мл}) = A_1 \cdot 100 / A_2$$

где A_1 – поглощение исследуемой пробы;

A_2 – поглощение стандартной пробы;

100 (мг/мл) – концентрация стандартного раствора РНК.

6. Объясняют получаемые результаты и делают выводы.

Б. Дифениламиновый метод определения ДНК

1. Аналитические пробы готовят в соответствии со следующей таблицей:

Реагенты	Опытная проба	Стандартная проба	Холостая проба
Фильтрат, мл	1,55	—	—
Стандартный раствор, мл	—	1,55	—
Дистиллированная вода, мл	—	—	1,55
HClO ₄ (конц.), мл	0,05	0,05	0,05
Дифениламинный реагент, мл	3,20	3,20	3,20

2. Пробы инкубируют в течение 30 минут при 40°C.

3. Измеряют оптическую плотность опытной и стандартной проб при $\lambda = 660$ нм на спектрофотометре КФК-2 относительно холостой пробы.

4. Рассчитывают концентрацию ДНК в опытной пробе, используя формулу:

$$C(\text{мг/мл}) = A_1 \cdot 50 / A_2$$

где A_1 – поглощение опытной пробы;

A_2 – поглощение стандартной пробы;

50 (мг/мл) – концентрация стандартного раствора ДНК.

5. Объясняют получаемые результаты и делают выводы.

Контрольные вопросы

1. Что означает термин «нуклеиновые кислоты»?
2. Какие кислоты относят к нуклеиновым?
3. Нуклеиновые кислоты, химический состав, строение.
4. Первичная структура ДНК и РНК, связи, формирующие первичную структуру.
5. Вторичная и третичная структура ДНК.
6. РНК, химический состав, уровни структурной организации.
7. Типы РНК и их функции.
8. Что такое нуклеопротеид?
9. Кто и когда предложил модель молекулы ДНК и какова общая конфигурация молекулы ДНК?
10. Что такое нуклеотид и из каких химических компонентов он состоит?

11. Как связаны между собой нуклеотиды?
12. В чем заключается процесс синтеза ДНК?
13. Как называют участок молекулы ДНК, несущий информацию о синтезе одного белка?
14. Чем отличается строение молекул РНК и ДНК?
15. Чем отличаются нуклеотиды РНК и ДНК?
16. Как регулируется процесс синтеза ДНК и РНК?

8. ГОРМОНЫ

Краткие теоретические сведения

Гормоны – это биологические активные вещества, выделяемые железами внутренней секреции в кровь и оказывающие регуляторное влияние на метаболизм в организме. Наука о железах внутренней секреции называется эндокринологией. Центральная роль в нейрогуморальной регуляции обмена веществ отводится центральной нервной системе (ЦНС), непосредственно влияющей на деятельность эндокринных желез. Железы внутренней секреции непосредственно контролируют деятельность органов и тканей и оказывают влияние на ЦНС.

Термин «гормон» (от греч. *Hormao* – возбуждаю, побуждаю) был введен в 1905 г. У. Бейлисом и Э. Старлингом. К настоящему времени открыто более ста различных веществ, наделенных гормональной активностью, синтезирующиеся в железах внутренней секреции и регулирующие процессы обмена веществ.

Для всех гормонов *общим* является следующее:

- действие на расстоянии от места выделения;
- специфичность эффекта;
- высокая биологическая активность;
- высокая скорость образования и распада;
- роль посредника между ЦНС и тканями;
- действие по принципу прямой и обратной связи.

В организме гормоны выполняют ряд *функций*:

- поддерживают гомеостаз (изоосмию, изотермию, изогидрию);
- обеспечивают адаптацию организма к изменяющимся условиям внешней среды;
- поддерживают циклические изменения (смена дня и ночи, половые особенности, возраст и др.);
- поддерживают циклические, морфологические и функциональные изменения в онтогенезе.

Гормоны *классифицируются по ряду признаков*: по месту выработки, по характеру и механизму действия, по химической природе.

По *месту синтеза* выделяют гормоны гипоталамуса, гипофиза, щитовидной, паращитовидной, поджелудочной, половых желез, надпочечников.

По *химической структуре* гормоны подразделяются на гормоны *пептидно-белковой* природы, *производные аминокислот* и *стероидные*.

В зависимости от расположения белков-рецепторов и химической природы гормонов различают *два механизма* передачи гормонального сигнала в клетки-мишени.

I Механизм характерен для гормонов-белков, пептидов и производных аминокислот. Белки-рецепторы расположены на наружной поверхности цитоплазматической мембраны. Взаимодействие гормона с белком-рецептором приводит к активации аденилатциклазы и образованию цАМФ или цГМФ, который в клетке запускает каскадный механизм активации ряда ферментов, изменяющих интенсивность обмена углеводов, белков, липидов.

II Механизм характерен для гормонов стероидной природы. Гормоны проникают через цитоплазматическую мембрану в цитоплазму и взаимодействуют с белками-рецепторами, находящимися в цитозоле. Образованный комплекс «гормон-белок-рецептор» проникает в ядро клетки и на уровне оперона является индуктором или репрессором трансляции белков-ферментов.

По *характеру действия* гормоны делятся на пусковые и гормоны-исполнители. К пусковым относятся гормоны гипоталамуса. Они стимулируют деятельность соответствующих желез внутренней секреции. Гормоны – исполнители, оказывающие действие на основные реакции обмена веществ организма, обеспечивающие его рост, развитие, адаптацию, размножение и др.

Гормоны в организме находятся в связанном и свободном состояниях. Между действием различных гормонов существует взаимосвязь. В клинике часто встречаются гормональные нарушения – гипо- и гиперфункции желез внутренней секреции.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 13

КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ГОРМОНЫ

Цель работы: изучение и овладение методами качественной идентификации и количественного определения гормонов.

Опыт № 1. Качественные реакции на инсулин

Инсулин – гормон, продуцируемый β -клетками островков Лангерганса поджелудочной железы. Молекула инсулина образована двумя полипептидными цепями, содержащими 51 аминокислотный остаток: А-цепь состоит из 21 аминокислотного остатка, В-цепь образована 30 аминокислотными остатками. Полипептидные цепи соединяются двумя дисульфидными мостиками через остатки цистеина, третья дисульфидная связь расположена в А-цепи.

Инсулин регулирует уровень глюкозы в крови, он находит широкое применение при лечении сахарного диабета у людей. Инсулин дает почти все характерные цветные реакции на белок.

1. Реакция инсулина с разбавленным раствором гидроксида натрия

Исследуемый материал: раствор инсулина.

Реактивы: 0,1%-ный раствор гидроксида натрия; 0,5%-ный раствор уксусной кислоты.

Приборы: пробирки, пипетки.

Ход работы. В пробирку вносят 10 капель раствора инсулина и по каплям прибавляют 0,1%-ного раствора гидроксида натрия до выпадения хлопьевидного осадка. При добавлении 0,5%-ного раствора уксусной кислоты до pH 2-3 наблюдается растворение осадка. Перемешивают, встряхивают. Наблюдается появление фиолетового окрашивания. Приведите вывод.

2. Обнаружение инсулина биуретовой реакцией

Исследуемый материал: раствор инсулина.

Реактивы: 10%-ный раствор гидроксида натрия; 1%-ный раствор сернокислой меди.

Приборы: пробирки, пипетки.

Ход работы: в пробирку вносят 5 капель раствора инсулина, прибавляют 5 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1%-ного раствора сернокислой меди. Перемешивают, встряхивают. Наблюдается появление фиолетового окрашивания. Приведите вывод.

3. Обнаружение инсулина нингидринной реакцией

Исследуемый материал: раствор инсулина.

Реактивы: 1% раствор нингидрина в ацетоне.

Приборы: пробирки, пипетки, водяная баня, электрическая плитка.

Ход работы: в пробирку вносят 5 капель раствора инсулина, прибавляют 2-3 капли 1%-ного раствора нингидрина в ацетон, перемешивают и нагревают на водяной бане при 70°C несколько минут. Наблюдается появление сине-фиолетового окрашивания. Приведите вывод.

4. Обнаружение инсулина реакцией с сульфосалициловой кислотой

Исследуемый материал: раствор инсулина.

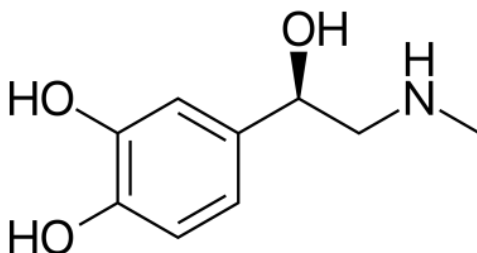
Реактивы: 20%-ный раствор сульфосалициловой кислоты.

Приборы: пробирки, пипетки.

Ход работы: в пробирку вносят 1 мл раствора инсулина, добавляют 5 капель 20%-ного раствора сульфосалициловой кислоты. Наблюдают выпадение осадка белого цвета. Приведите вывод.

Опыт № 2. Качественные реакции на адреналин

По химической природе адреналин является производным пирокатехина. Адреналин повышает обмен веществ и оказывает выраженное влияние на углеводный обмен, его введение в организм вызывает гипергликемию и гликозурию вследствие усиленного распада гликогена. При окислении адреналина образуется адренохром.



1. Качественная реакция на адреналин с хлоридом железа (III)

Метод основан на способности пирокатехиновой группировки адреналина образовывать с хлоридом железа (III) окрашенное комплексное соединение.

Исследуемый материал: раствор адреналина (1:1000).

Реактивы: 3%-ный раствор хлорида железа (III); 10%-ный раствор гидроксида натрия.

Приборы: пробирки, пипетки.

Ход работы: в пробирку вносят 1 мл адреналина (1:1000), прибавляют 1 каплю 3%-ного раствора хлорида железа (III) и перемешивают. Появляется изумрудно-зеленое окрашивание, затем добавляют 1 каплю 10%-ного раствора гидроксида натрия – появляется вишнево-красное окрашивание.

Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

2. Реакция адреналина с йодатом калия

Исследуемый материал: раствор адреналина (1:1000).

Реактивы: 1%-ный раствор йодата калия; 10%-ного раствор уксусной кислоты.

Приборы: пробирки, пипетки, водяная баня, электрическая плитка.

Ход работы: в пробирку вносят 0,5 мл адреналина (1:1000), прибавляют 1 мл 1%-ного раствора йодата калия, перемешивают и нагревают до температуры 60°C. Появляется интенсивное красно-фиолетовое окрашивание смеси.

Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

3. Реакция адреналина с диазореактивом

В основе метода лежит способность адреналина образовывать с диазобензолсульфокислотой соединение красного цвета.

Исследуемый материал: раствор адреналина (1:1000).

Реактивы: 1%-ный раствор сульфаниловой кислоты, 5%-ный раствор нитрита натрия, 10%-ный раствор карбоната натрия.

Приборы: пробирки, пипетки.

Ход определения. Для получения диазобензолсульфокислоты в пробирку помещают 3 капли 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты, 3 капли 5%-ного раствора нитрита натрия и перемешивают

встряхиванием. Затем в пробирку добавляют 5 капель раствора адреналина (1:1000) и 3 капли 10%-ного раствора карбоната натрия. Перемешивают и наблюдают за окрашиванием жидкости в красный цвет.

Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

4. Доказательство наличия в адреналине ядра пирокатехина

Исследуемый материал: раствор адреналина (1:1000).

Реактивы: 3%-ный раствор хлорида железа (III); 0,05%-ный раствор пирокатехина.

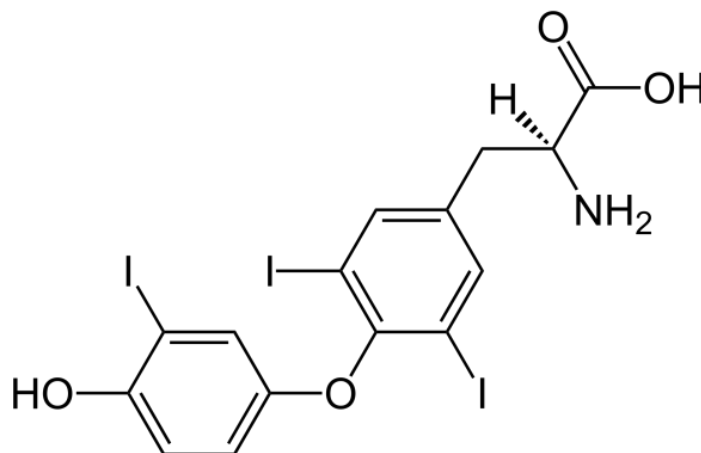
Приборы: Пробирки, пипетки.

Ход работы: в одну пробирку вносят 1 мл адреналина (1:1000), а в другую – 1 мл 0,05%-ного раствора пирокатехина. Затем в обе пробирки прибавляют 1-2 капли 3%-ного раствора хлорида железа (III) и перемешивают. В обеих пробирках появляется изумрудно-зеленое окрашивание смеси.

Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

Опыт № 3. Качественные реакции на гормоны щитовидной железы

Основным гормоном щитовидной железы является тироксин (тетраиодтиронин, 2-амино-3-[4-(4-гидрокси-3,5-дииодфенокси)-3,5-дииодфенил]пропи-оновая кислота, T₄):



Гормональными свойствами обладают также трийодтиронин и дийодтиронин. Метод обнаружения йодтиронинов основан на отщеплении при кислотном гидролизе от тиреоидных гормонов (йодтиронины) йодистоводородной кислоты, при взаимодействии которой с йодатом

калия выделяется свободный йод, который в хлороформе имеет фиолетовую окраску.

Исследуемый материал: тиреоидин кристаллический.

Реактивы: концентрированная азотная кислота, 1%-ный раствор йодата калия (KIO_3), хлороформ.

Приборы: пробирки, пипетки, водяная баня, электрическая плитка.

Ход определения. В пробирку помещают несколько кристаллов любого тиреоидина, добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты и нагревают 3-5 мин в кипящей водяной бане. Затем приливают 20 капель 1%-ного раствора йодата калия (KIO_3). Содержимое перемешивают и охлаждают. После этого в пробирку добавляют 1 мл хлороформа, встряхивают и отмечают характерную окраску хлороформа. Напишите уравнение реакции и приведите вывод.

Опыт № 4. Качественные реакции на стероидные гормоны

Стероидные гормоны – это группа физиологически активных веществ (гонадостероиды, кортикостероиды и др.), регулирующих процессы жизнедеятельности у животных и человека. У позвоночных стероидные гормоны синтезируются из холестерина в коре надпочечников, клетках Лейдига семенников, в фолликулах и желтом теле яичников, а также в плаценте. Стероидные гормоны содержатся в составе липидных капель адипоцитов и в цитоплазме в свободном виде. В связи с высокой липофильностью стероидных гормонов относительно легко диффундируют через плазматические мембраны в кровь, а затем проникают в клетки-мишени.

Классификация стероидных гормонов:

1) Гормоны коркового слоя надпочечников (кортикостероиды):

- глюкокортикоиды (кортизон, кортизол, деоксикортизол);
- минералокортикоиды (дезоксикортикостерон, кортикостерон, альдостерон).

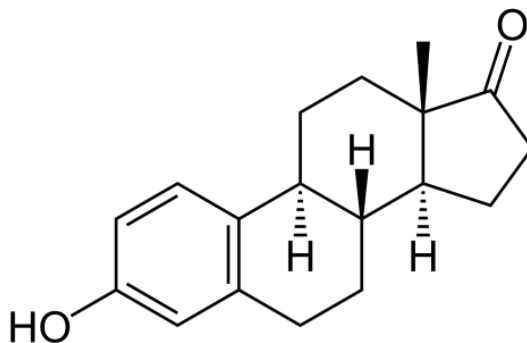
2) Гормоны половых желёз (гонадостероиды):

- прогестогены (прегненолон, прогестерон, аллопрегненолон);
- андрогены (андростендиол, тестостерон, дигидротестостерон);
- эстрогены (эстрон, эстрадиол, эстриол).

Многие синтетические гормоны стероидной природы используются в спорте, а также в качестве контрацептивов или в гормонозаместительной терапии.

1. Реакция на фенольную группу эстрогена

При взаимодействии эстрогена и серной кислоты образуется соединение соломенно-желтого цвета, которое при нагревании становится оранжевым.



Исследуемый материал: 0,1%-ный масляный раствор фолликулина.

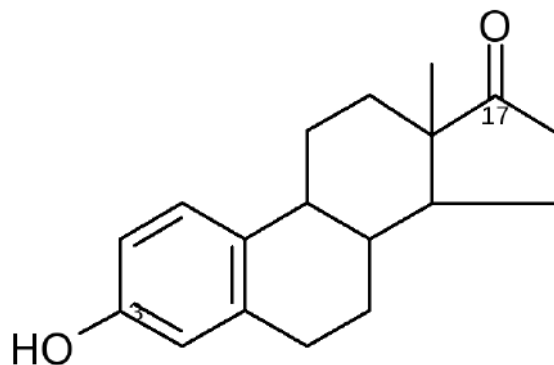
Реактивы: этанол, концентрированная серная кислота.

Приборы: пробирки, пипетки, водяная баня, электрическая плитка.

Ход определения: Для приготовления спиртового раствора фолликулина (эстрогена) содержимое 5 ампул 0,1%-ного масляного раствора фолликулина для инъекций выливают в делительную воронку, содержащую 50 мл этанола. Воронку встряхивают и после расслоения фаз нижний масляный слой отбрасывают, а для исследования используют верхний – спиртовой раствор. В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора фолликулина и помещают ее на 5 мин в кипящую водяную баню (для испарения спирта). Добавляют в пробирку 1 мл концентрированной серной кислоты и вновь ставят ее на 5-10 мин в кипящую водяную баню. Наблюдают за изменением окрашивания содержимого пробирки. Приведите вывод.

2. Реакция на 17-кетогруппу эстрогена и на 17-кетостероиды, содержащиеся в моче

17-Кетостероиды являются конечным продуктом обмена гормонов коры надпочечников: 17-α-окси-11-дезоксикортикостерона, кортизона, гидрокортизона и частично половых гормонов. У здоровой женщины за сутки с мочой выделяется 6-15 мг кетостероидов, у мужчин – 15-25 мг.



В основе метода определения 17-кетостероидов лежит их способность образовывать с м-динитробензолом в щелочной среде продукты конденсации вишнево-красного цвета. Интенсивность окраски пропорциональна количеству находящихся в моче 17-кетостероидов.

Исследуемый материал: спиртовой раствор фолликулина.

Реактивы: 30%-ный раствор гидроксида натрия, 2%-ный раствор м-динитробензола в этаноле.

Приборы: пробирки, пипетки.

Ход определения. В одну пробирку вносят 5 капель спиртового раствора фолликулина, а в другую – 5 капель мочи и добавляют в них по 5 капель 30%-ного раствора гидроксида натрия и 2%-ного раствора м-динитробензола в этаноле. Перемешивают содержимое встряхиванием и наблюдают за развитием характерного окрашивания.

Приведите вывод.

Контрольные вопросы

1. Что такое гормоны?
2. В какой железе синтезируется гормон тироксин? Его биохимические функции.
3. В какой железе вырабатывается инсулин, его химическая природа и механизм действия.
4. Назовите гормоны, вырабатываемые передней долей гипофиза.
5. В какой железе вырабатывается инсулин? Его химическая природа и биохимические функции.
6. Гормон паращитовидных желез, его химическая природа, биохимические функции
7. Место синтеза, химическая природа и биохимические функции половых гормонов.

8. Химическая природа, место синтеза и биохимические функции адреналина.

9. Что такое простагландины, их химическая природа? Где они вырабатываются?

10. Химическая природа гормонов. Приведите примеры.

11. Классификация гормонов по химическому строению. Приведите примеры.

12. Гормон паращитовидных желез, его биохимические функции.

13. Гормоны поджелудочной железы, механизм их действия.

14. Химическая природа, место синтеза и биохимические функции адреналина и норадреналина.

15. Кортикостероиды, их химическая природа, биохимические функции.

9. МЕТАБОЛИЗМ. ПРОМЕЖУТОЧНЫЙ ОБМЕН

Краткие теоретические сведения

Обмен веществ – это постоянно протекающий, самосовершающийся, саморегулирующий процесс обновления живых организмов. С прекращением обмена веществ прекращается жизнь. Обмен веществ включает в себя разнообразные физиологические, физические и химические процессы.

К *физиологическим процессам* относится поступление в организм питательных веществ (белков, липидов, углеводов, витаминов, минеральных веществ, воды и др.) из окружающей среды и выделение продуктов жизнедеятельности организма.

К *физическим процессам* относятся сорбция, всасывание, различные формы движения.

К *химическим процессам* относятся распад питательных веществ и синтез необходимых организму соединений. В химических процессах обмена веществ выделяют внешний и промежуточный виды обмена. Внешний обмен – это внеклеточное превращение веществ на путях их поступления и выделения. Промежуточный обмен (метаболизм) – это превращение веществ внутри клеток.

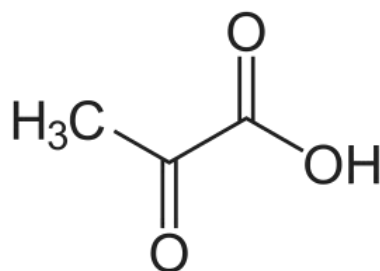
Метаболизм – это совокупность всех химических реакций в клетке. Вещества, образующиеся в ходе химических реакций, принято называть метаболитами. В метаболизме принято выделять два противоположных процесса: катаболизм и анаболизм. *Катаболизм* – это процессы распада веществ, сопровождающиеся выделением энергии. *Анаболизм* – это процессы синтеза сложных молекул из более простых, сопровождающиеся потреблением энергии.

Катаболизм сопровождается освобождением энергии, которая может аккумулироваться в виде АТФ. При анаболизме происходит потребление энергии, которая освобождается при распаде АТФ до АДФ и фосфорной кислоты или АМФ и пироглутаминовой кислоты.

Следовательно, АТФ является сопрягающим энергетическим звеном катаболизма и анаболизма. Наряду с АТФ связующим звеном могут служить специфические метаболические пути или циклы. Связующий путь (цикл) объединяющий пути распада и синтеза веществ

называется амфиболическим. Они как правило связаны с окислением веществ до углекислого газа и воды.

Пировиноградная кислота (ПВК) является одним из веществ, через которые осуществляется взаимосвязь углеводного и липидного, а также углеводного и белкового обменов. В жировом обмене ПВК образуется при окислении глицерина. В белковом обмене ПВК образуется при процессе деаминации и переаминирования аланина. Поэтому содержание ПВК в биологических жидкостях практически всех живых организмов довольно высокое.



Пировиноградная кислота – нормальная составная часть плазмы крови (0,8-1,5 мг%). При недостатке витамина В1 и вызванном вследствие этого нарушении процесса декарбоксилирования кетокислот значительно увеличивается содержание пировиноградной кислоты в крови, мозге и других тканях.

Содержание этой кислоты в крови возрастает при сахарном диабете, сердечной недостаточности.

Пировиноградная кислота выделяется с мочой 113,7-283,9 мкмоль/сут (10-25 мг/сут; до 200 мг в сутки). Исследуя содержание ее в суточном количестве мочи, можно судить о течении процессов углеводного обмена.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 14

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПИРОВИНОГРАДНОЙ И МОЧЕВОЙ КИСЛОТ

Цель работы: изучение и освоение методов количественного определения продуктов метаболизма в биологических жидкостях.

Опыт № 1. Определение содержания пировиноградной кислоты в биологических жидкостях

Пировиноградная кислота в кислой среде с солями сернистой кислоты (бисульфитом калия или натрия) образует бисульфитное соединение (*приведите уравнение реакции*). Затем избыток соли сернистой кислоты связывают йодом (*приведите уравнение реакции*).

Бисульфитное соединение пировиноградной кислоты разрушается в щелочной среде с освобождением бисульфита, количество которого эквивалентно содержанию пировиноградной кислоты. Количество освободившегося бисульфита определяют титрованием йодом.

Исследуемый материал: моча.

Реактивы: 0,01 н раствор щавелевой кислоты, 1%-ный раствор бисульфита калия или натрия, 1%-ный раствор крахмала, 0,01 н раствор йода, 0,1 н раствор тиосульфата натрия, моча, дистиллированная вода.

Оборудование: конические колбы объемом 50 мл, пипетки, воронки, бюретка.

Ход работы. В колбочку вносят пипеткой 1 мл мочи, добавляют 9 мл воды и 1 мл 0,1 н раствора щавелевой кислоты. Приливают 10 капель 1%-ного раствора бисульфита калия или натрия, смесь взбалтывают и колбу ставят в темное место на 15 минут. По истечении указанного времени вносят 1 мл 1%-ного раствора крахмала и избыток бисульфита связывают 0,01 н раствором йода (KI), добавляя его каплями до появления синего окрашивания. Для удаления избытка йода приливают по каплям 0,1 н раствор тиосульфата натрия до обесцвечивания содержимого колбы, после чего для связывания избытка тиосульфата по каплям прибавляют 0,01 н раствор йода до появления синего окрашивания от последней капли раствора. Затем приливают 10 капель насыщенного раствора бикарбоната натрия (синяя окраска исчезает)

и жидкость в колбе титруют из микробюретки 0,01 н раствором йода до восстановления синего окрашивания, сохраняющегося 20-30 сек.

Содержание пировиноградной кислоты (С) в моче (мг/сут) рассчитывают по формуле:

$$C = E * A * 0,01 * B / V$$

где: E – грамм-эквивалент пировиноградной кислоты;

A – объем 0,01 н раствора KI, израсходованное на титрование, мл;

0,01 – нормальность раствора йода;

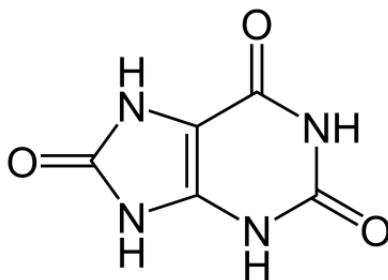
B – суточное количество мочи, мл;

V – объем пробы мочи, взятое для исследования, мл.

Приведите вывод.

Опыт № 2. Определение содержания мочевой кислоты в биологических жидкостях

Мочевая кислота у человека является конечным продуктом обмена пуриновых оснований, входящих в состав сложных белков – нуклеопротеинов. В норме у человека с мочой выделяется мочевой кислоты 1,5-4,5 ммоль/сут. (250-750 мг/сут.). Выделение мочевой кислоты зависит от содержания пуринов в пище и интенсивности обмена нуклеопротеинов. Гипоурикурия (гипоурикозурия) – уменьшение выделения мочевой кислоты с мочой, отмечается при подагре, нефрите, почечной недостаточности; гиперурикурия (гиперурикозурия) – увеличение выделения мочевой кислоты с мочой – при лейкемии, усиленном распаде нуклеопротеинов. У детей выделяется больше мочевой кислоты, чем у взрослых.



Метод определения основан на способности мочевой кислоты восстанавливать фосфорно-вольфрамовый реактив Фолина (водный р-р $H_7[P(W_2O_7)]$ и (иногда) $H_7[P(Mo_2O_7)_6]$) в фосфорно-вольфрамовую синь (окислы вольфрама), интенсивность окраски которой пропорциональна

содержанию мочевой кислоты. Количество фосфорно-вольфрамовой сини определяется путем титрования красной кровяной солью $K_3[Fe(CN)_6]$, которая окисляет фосфорно-вольфрамовую синь и синее окрашивание исчезает.

Исследуемый материал: моча.

Реактивы: 20%-ный раствор карбоната натрия, реактив Фолина, 0,01 н раствор красной кровяной соли ($K_3[Fe(CN)_6]$).

Оборудование: конические колбы объемом 50 мл, пипетки, воронки, бюретка.

Ход работы. К 1,5 мл мочи прибавляют 1 мл 20%-ного раствора карбоната натрия и 1 мл реактива Фолина, перемешивают (жидкость окрашивается в синий цвет) и титруют 0,01 н раствором красной кровяной соли $K_3[Fe(CN)_6]$ до исчезновения синего окрашивания и приобретения смесью зеленого цвета.

Содержание мочевой кислоты (в мг) в суточной моче вычисляют по формуле:

$$C = 0,8a * b / V$$

где: C – содержание мочевой кислоты, мг/сут;

0,8 – 0,8 мг мочевой кислоты соответствует 1 мл $K_3[Fe(CN)_6]$;

a – объем 0,01 н раствора $K_3[Fe(CN)_6]$, пошедшее на титрование, мл;

b – суточный диурез (суточное количество мочи), мл;

V – объем пробы мочи, взятое для исследования, мл.

Коэффициент пересчета в единицы СИ (ммоль/сут) равен 0,0059.

Приведите вывод.

Контрольные вопросы

1. Метаболизм. Назначение метаболизма.
2. Катаболизм и анаболизм.
3. Общая схема катаболизма основных пищевых веществ, стадии катаболизма, конечные продукты.
4. Взаимосвязь катаболизма и анаболизма через производство энергии.
5. Роль АТФ в жизнедеятельности клеток.
6. Основные пищевые вещества: углеводы, жиры, белки.
7. Незаменимые компоненты основных пищевых веществ.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 15

ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Цель работы: изучение и освоение методов количественного определения продуктов обмена углеводов в живых организмах.

Опыт № 1. Определение глюкозы крови по цветной реакции с орто-толуидином

Интегральным показателем состояния углеводного обмена является уровень содержания глюкозы в крови. Определение глюкозы в крови, сиаловых кислот, а также промежуточных продуктов углеводного обмена, активности ряда ферментов, участвующих в углеводном обмене, важно для диагностики сахарного диабета и других эндокринных заболеваний, энзимопатий, функции печени, надпочечников и др. К изучению содержания других сахаров и гликогена прибегают реже.

Принцип метода. Белки крови осаждаются трихлоруксусной кислотой и отделяются центрифугированием. Центрифугат обрабатывается *орто*-толуидиновым реактивом.

Глюкоза при нагревании с *орто*-толуидином в кислой среде дает зеленое окрашивание, интенсивность которого прямо пропорциональна концентрации глюкозы в крови и определяется колориметрически на ФЭКе.

Исследуемый материал: кровь, взятая из пальца.

Реактивы:

1. *Орто*-толуидин – жидкость желтого цвета обязательно подлежит перегонке в колбе-реторте при температуре 200°C (на песочной бане). Свежеперегнанный *орто*-толуидин должен быть бесцветным или слабожелтого цвета. Реактив стоек при хранении в посуде темного стекла без доступа воздуха.

2. Ледяная уксусная кислота.

3. Трихлоруксусная кислота, 3%-ный раствор.

4. Тиомочевина, порошок.

5. *Орто*-толуидиновый реактив: В 94 мл ледяной уксусной кислоты растворяют 0,15 г тиомочевины и добавляют 6 мл *орто*-толуидина. Реактив стоек при хранении в холодильнике.

6. Стандартный раствор глюкозы 100 мг/л или 5,55 ммоль/л готовят следующим образом: в мерной колбе на 100 мл в 0,2%-ном растворе бензойной кислоты растворяют 100 мг высушенной до постоянного веса при 100°C глюкозы. Раствор бензойной кислоты готовят следующим образом: 0,2 г кристаллической бензойной кислоты растворяют в небольшом количестве воды, нагревая на водяной бане до полного растворения. После охлаждения до комнатной температуры переносят в мерную колбу на 100 мл и доливают до метки дистиллированной водой. Бензойная кислота увеличивает стабильность стандартного раствора глюкозы.

Можно пользоваться водным раствором глюкозы, однако время хранения такого стандарта значительно меньше. Экстинкция стандарта не должна давать резких колебаний. Хранить в холодильнике.

Оборудование: ФЭК, кюветы толщиной 10 мм, штатив с пробирками, пробирки центрифужные, центрифуга лабораторная, весы центрифужные, баня водяная кипящая, пипетки объемом 0,1 мл, 1 мл и 5 мл.

Ход определения. В центрифужную пробирку (опыт) налить 0,9 мл 3%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и выдуть на стенку пробирки 0,1 мл крови, взятой из пальца, в стандартную пробу – 0,9 мл 3%-ного раствора ТХУ и 0,1 мл стандартного раствора глюкозы. Содержимое пробирок взболтать и центрифугировать 5-7 минут при 1500 об/мин.

Взять три пробирки. В первую (опыт) прилить 0,5 мл центрифугата, во вторую (стандарт) – 0,5 мл центрифугата из стандартной пробы, в третью (контроль) – 0,5 мл 3%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и во все пробирки добавить по 4,5 мл *орто*-толуидинового реактива. Пробирки поместить на 8 минут (точно!) в кипящую водяную баню. Вода должна непрерывно кипеть.

Пробирки после кипячения сразу охладить под водопроводной водой до комнатной температуры. Опытную и стандартную пробы колориметрировать против контроля или дистиллированной воды на ФЭКе в кювете толщиной слоя 10 мм при красном (600-650 нм) или желтом (595 нм) светофильтре.

Стандартная проба. Стандартную пробу проводят, как опытные, но только вместо крови используют стандартный раствор глюкозы

с концентрацией 5,55 мМ (1,0 г/л), а в случае высокого содержания сахара в крови 16,65 мМ (3,0 г/л) или 27,75 мМ (5,0 г/л).

Расчет произвести по формуле:

$$C_{\text{оп}} = (C_{\text{ст}} \times E_{\text{оп}}) / E_{\text{ст}} \text{ (ммоль или г/л глюкозы)},$$

где $C_{\text{оп}}$ – концентрация глюкозы в опытной пробе;

$C_{\text{ст}}$ – концентрация глюкозы в стандарте, в ммоль/л или г/л;

$E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность пробы;

$E_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта.

Приведите вывод.

Опыт № 2. Выделение гликогена из мышечной ткани

Принцип метода. При экстракции используется способность гликогена к растворению в кислой среде. Применение трихлоруксусной кислоты или хлорной кислот в качестве экстрагирующего реагента одновременно дает возможность освобождения раствора от примесей белков, нуклеиновых кислот и других полимерных соединений. Гликоген, подобно белкам, обладает резко выраженными гидрофильными свойствами, поэтому его можно осадить из раствора при высаливании солями щелочных и щелочноземельных металлов, солями тяжелых металлов, спиртом.

Исследуемый материал: свежая мышечная ткань.

Реактивы:

1. Трихлоруксусная кислота, 5%-ный раствор.
2. Реактив Люголя.
3. Уксуснокислый свинец, 10%-ный раствор.

Оборудование: штативы с пробирками, центрифужные пробирки, пипетки объемом 1 и 2 мл; пипетки капельные (глазные), центрифуга лабораторная, фарфоровые ступки, ножницы.

Ход работы. 5 г свежей мышечной ткани поместить в фарфоровую ступку, замороженную в лед. Ткань измельчить, залить 2 мл 4%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и вновь тщательно растереть пестиком. Полученную кашицу перенести в центрифужную пробирку, отцентрифугировать при 3000 об/мин. в течение 8-10 минут и по 1 мл надосадочной жидкости перенести в две пробирки.

В первой из них провести йодную пробу на гликоген, добавив 2-3 капли реактива Люголя. Отметить проявление характерной красно-бурой окраски раствора, интенсивность которой зависит от концентрации гликогена. Во вторую пробирку прилить 1 мл 10%-ного раствора ацетата свинца и отметить выпадение осадка.

Приведите вывод.

Опыт № 3. Обнаружение продуктов спиртового брожения

Брожение – это окисление органических веществ, в том числе и углеводов, различными микроорганизмами в анаэробных условиях с целью получения энергии. Брожение происходит в окружающей среде, в пищевых продуктах. В отраслях пищевой промышленности чаще всего используется молочнокислое и спиртовое брожение. В данных видах брожения окислению подвергается глюкоза, и их химизм до образования пировиноградной кислоты совпадает с гликолизом.

Молочнокислое брожение – это процесс получения энергии молочнокислыми бактериями. По характеру различают два вида молочнокислого брожения: гомоферментативное и гетероферментативное, которые осуществляются соответствующими группами молочнокислых бактерий. Гомоферментативные (однотипнобродящие бактерии), в процессе брожения образуют в основном молочную кислоту и очень мало побочных продуктов. Они окисляют углеводы молока по пути гликолиза в анаэробных условиях, где пируват служит акцептором водорода от НАДН+Н⁺ и восстанавливается в конечный продукт брожения – лактат. Суммарное уравнение этого типа брожения можно записать так:



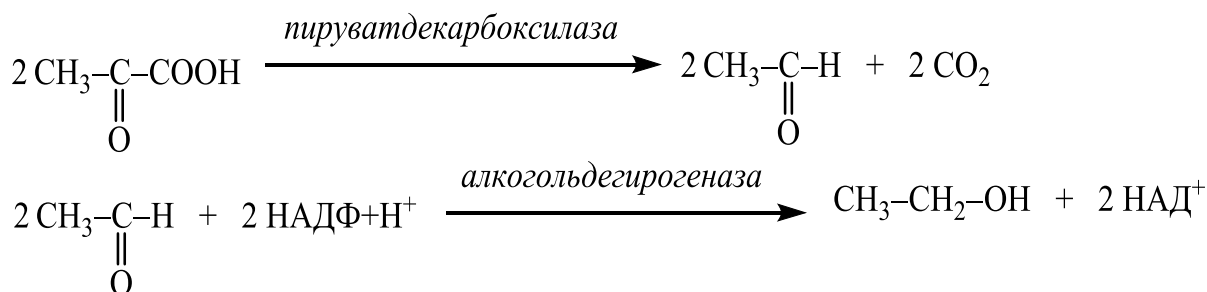
Лактат, накапливаясь, вызывает скисание молока до pH 4,8-4,6. Этот процесс лежит в основе квашения капусты, огурцов, помидоров и других продуктов растительного происхождения, силосования кормов для животных. Образующийся лактат предотвращает развитие гнилостных бактерий, плесневых грибов, т.е. служит консервантом.

Гетероферментативные бактерии (разнотипнобродящие) – наряду с молочной кислотой образуют значительное количество других веществ: этанола, CO₂, уксусной кислоты. Окисление углеводов молока

гетероферментативными молочнокислыми бактериями осуществляется своеобразной ферментативной системой, в которой нет фермента альдолазы, но есть ферменты пентозофосфатного цикла и других типов брожения. После фосфорилирования гексоза окисляется дегидрогеназой и декарбоксилируется, превращаясь в пентозофосфат. Последний расщепляется на глицеральдегид-3-фосфат и ацетилфосфат.

Глицеральдегид-3-фосфат, как и у гомоферментативных молочнокислых бактерий, окисляется до пирувата, который затем восстанавливается в лактат, а НАДН+Н⁺ окисляется в НАД⁺. Ацетилфосфат дефосфорилируется и превращается в ацетат (уксусную кислоту), частично восстанавливается (через уксусный альдегид) в этанол. Таким образом, конечными акцепторами водорода в этом типе брожения служат пируват и уксусный альдегид. Культуры гетероферментативных молочнокислых бактерий используют в производстве кефира, кумыса, курунги, мацони и других продуктов.

Спиртовое брожение осуществляется клетками дрожжевых грибов для получения энергии в анаэробных условиях. Большинство дрожжей сбраживает моносахариды, а именно глюкозу по пути гликолиза до образования пирувата. В анаэробных условиях, фермент дрожжей пируватдекарбоксилаза, превращает пируват в уксусный альдегид. Последний восстанавливается ферментом алкогольдегидрогеназой в этанол с окислением НАДН+Н⁺:

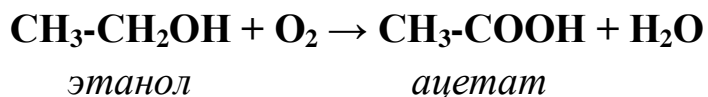


Суммарное уравнение спиртового брожения:



Пропионовокислые бактерии сбраживают углеводы до пропионовой, уксусной кислот и углекислого газа. Одна молекула пирувата окисляется до уксусной кислоты и СО₂ и две молекулы пирувата превращаются в пропионовую кислоту.

Уксуснокислые бактерии окисляют этанол и другие спирты до уксусной кислоты:



Есть микроорганизмы, осуществляющие маслянокислое, лимоннокислое и другие виды брожения. Многие типы брожения используются в пищевых технологиях и не менее важную роль они выполняют в природе.

Анаэробную стадию окисления глюкозы наиболее удобно изучать на спиртовом брожении.

Принцип метода. Глюкоза под влиянием ферментов, содержащихся в дрожжах, превращается в спирт и углекислый газ. Углекислый газ, выделившийся при сбраживании глюкозы, можно открыть в специальных приборах для брожения (бродильный аппарат Эйнгорна, см. рис.), где собирается выделившийся CO_2 . Затем проделывают количественные реакции на CO_2 и спирт.

Исследуемый материал: дрожжи.

Реактивы:

1. Глюкоза, 5%-ный раствор.
2. Гидроксид натрия (NaOH), 10%-ный раствор.
3. Раствор Люголя.

Оборудование: бродильный аппарат (трубка) Эйнгорна (см. рис. 8), штатив с пробирками, пипетки объемом 5 мл и 10 мл, пипетки глазные, спиртовки, держатели для пробирок, фарфоровая ступка, термостат при 37°C ; воронки, фильтры обезжиренные.

Ход работы.

А. Заполнение бродильного аппарата:

Растереть в ступке 1 г свежих пекарских дрожжей или 0,5 г сухих дрожжей, приливая небольшими порциями 5%-ный раствор глюкозы в количестве 20 мл. Затем смесь перенести в бродильный аппарат (аппарат Эйнгорна), так, чтобы закрытое колено было заполнено полностью, а расширенная его часть только до половины. С заполненной трубкой прибор поместить в термостат при температуре 37°C на 30-50 мин.

Когда произойдет накопление газа в верхней части закрытого колена прибора, проделать качественные реакции на CO_2 и спирт.

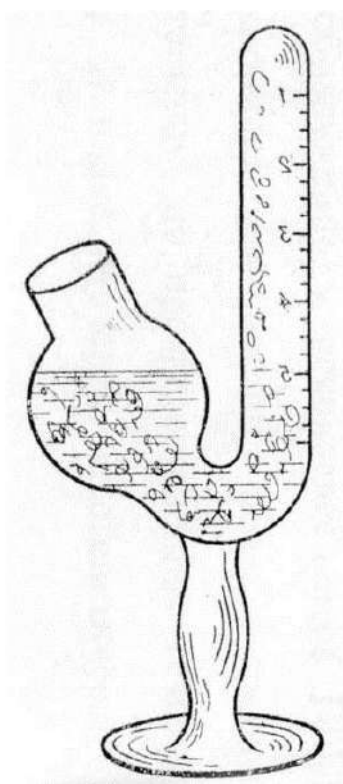


Рисунок 8. Бродильный аппарат (трубка) Эйнгорна

Б. Обнаружение углекислого газа.

В бродильный аппарат налить 10%-ный раствор гидроксида натрия до краев сосуда и, закрыв отверстие большим пальцем, перемешать содержимое прибора. CO_2 поглощается щелочью, создавая вакуум, и кожа пальца присасывается к отверстию прибора.

В. Обнаружение этилового спирта с помощью йодоформенной пробы:



Отфильтровать в пробирку 3-5 мл жидкости из бродильного аппарата, добавить несколько капель 10%-ного раствора йода до получения желтого окрашивания и слегка нагреть. Через некоторое время ощущается характерный запах йодоформа.

Напишите уравнения реакций и приведите вывод.

Контрольные вопросы

1. Охарактеризируйте этапы и ферменты распада поли- и олигосахаридов до моносахаридов. В чем разница гидролиза и фосфоролиза?
2. Опишите основные этапы дихотомического распада глюкозы в аэробных и анаэробных условиях.
3. Амилазы желудочно-кишечного тракта человека, их роль в переваривании углеводов.
4. В чем заключаются отличия метаболизма углеводов в аэробных и анаэробных условиях?
5. Какова роль целлюлозы в пищеварении?
6. Напишите реакции биосинтеза гликогена из глюкозы.
7. Напишите реакции метаболизма углеводов, в ходе которых образуется CO_2 .
8. Общая характеристика переваривания углеводов в желудочно-кишечном тракте человека. Всасывание продуктов переваривания.
9. Опишите различия в использовании гликогена в печени и в мышечной ткани.
10. Глюконеогенез: определение; напишите реакцию, катализируемую ключевым ферментом глюконеогенеза, и укажите витамин, необходимый для ее протекания.
11. Для каких процессов может быть использован глюкозо-6-фосфат?
12. Напишите итоговое уравнение гликолиза.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биологическая химия : учебник : для студентов учреждений высш. проф. образования / Ю. Б. Филиппович и др. ; под ред. Н. И. Ковалевской. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : Академия, 2013. – 315 с. : ил.
2. Ершов, Ю. А. Биохимия : учеб. и практикум для вузов / Ю. А. Ершов, Н. И. Зайцева ; под ред. С. И. Щукина. – 2-е изд., испр. и доп. – Москва : Юрайт, 2017. – 361 с. : ил.
3. Димитриев А. Д. Биохимия : учебное пособие / А. Д. Димитриев, Е. Д. Амбросьева [Электронный ресурс]. – Москва : Дашков и К, 2013. – 168 с. – Режим доступа : <http://www.iprbookshop.ru/>.
4. Козлов, В. А. Витамины. История. Химия. Биохимия. Фармакология. Клиника : учебное пособие. – Изд. 3-е, с изм. и доп. / В. А. Козлов. – Чебоксары : ЧГПУ им. И. Я. Яковлева, 2012. – 148 с.
5. Козлов, В. А. Протеиногенные аминокислоты / В. А. Козлов. – Чебоксары : ЧГПУ им. И. Я. Яковлева, 2012. – 148 с.
6. Комов В. П. Биохимия : учеб. для вузов по направлению 655500 Биотехнология / В. П. Комов, В. Н. Шведова. – 3-е изд., стер. – Москва : Дрофа, 2008. – 639 с. : ил.
7. Коничев, А. С. Молекулярная биология / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. – М. : Академия, 2005. – 400 с.
8. Филиппович, Ю. Б. Основы биохимии : учеб. для вузов по направлению и спец. «Химия» и «Биология» / Ю. Б. Филиппович. – 4-е изд., перераб. и доп. – Москва : Агар и др., 1999. – 507 с. : ил.
9. Филиппович, Ю. Б. Практикум по общей биохимии / Ю. Б. Филиппович, Т. А. Егорова. – М. : Просвещение, 1982. – 311 с.
10. Филиппович, Ю. Б. Упражнения и задачи по биохимии / Ю. Б. Филиппович, Г. А. Севастьянова, Л. И. Щеголева. – М. : Просвещение, 1976. – 151 с.

Учебное издание

БИОХИМИЯ С ОСНОВАМИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Лабораторный практикум

Составители

**Митрасов Юрий Никитич
Куприянова Марина Юрьевна**

Подписано в печать 26.03.2021. Формат 60×84/16.

Бумага писчая. Печать оперативная.

Усл. печ. л. 12,3. Тираж 30 экз. Заказ № 1728.

Согласно Федеральному закону от 29 декабря 2010 года № 436-ФЗ
«О защите детей от информации,
причиняющей вред их здоровью и развитию»
данная продукция не подлежит маркировке

Чувашский государственный педагогический
университет им. И. Я. Яковлева
428000, Чебоксары, ул. К. Маркса, 38

Отпечатано в редакционно-издательском центре
Чувашского государственного педагогического
университета им. И. Я. Яковлева
428000, Чебоксары, ул. К. Маркса, 38