



1797

РОССИЙСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. А. И. ГЕРЦЕНА

ХИМИЯ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

HERZEN

Е. С. Остроглазов, Т. А. Новикова,
И. Е. Ефремова

Лабораторный практикум по биохимии

Российский государственный педагогический
университет им. А. И. Герцена



Е. С. Остроглядов,
Т. А. Новикова, И. Е. Ефремова

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО БИОХИМИИ

Учебное пособие

Санкт-Петербург
Издательство РГПУ им. А. И. Герцена
2018

УДК 577.1
ББК 24.73
О 78

Печатается по решению кафедры органической химии РГПУ им. А. И. Герцена

Рецензенты: д-р хим. наук, проф. **М. М. Зобачева** (РГПУ им. А. И. Герцена),
канд. хим. наук, доц. **Т. П. Ефимова** (РГПУ им. А. И. Герцена)

Остроглядов Е. С., Новикова Т. А., Ефремова И. Е.

О 78 Лабораторный практикум по биохимии: учебное пособие. — СПб.: Изд-во РГПУ им. А. И. Герцена, 2018. — 79 с.

ISBN 978–5–8064–2623–0

Учебное пособие предназначено для студентов факультетов химии и биологии. В нём представлены экспериментальные работы по темам «Белковые аминокислоты», «Пептиды и белки», «Углеводы», «Липиды», «Нуклеиновые кислоты», «Витамины» и «Ферменты». Подробные описания методик проведения этих работ, а также их относительная простота даёт возможность использования их на факультативных занятиях в школе.

Для эффективного освоения учебного материала в пособие включены вопросы и задания для актуализации знаний по соответствующим темам, самоконтроля и самостоятельной работы студентов.

УДК 577.1
ББК 24.73

ISBN 978–5–8064–2623–0

© Е. С. Остроглядов, Т. А. Новикова,
И. Е. Ефремова, 2018
© О. В. Гирдова, оформление обложки, 2018
© Издательство РГПУ им. А. И. Герцена, 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Правила работы в химической лаборатории, техника безопасности и оказание первой помощи при несчастных случаях	4
2. Белковые аминокислоты: методы идентификации и разделения	7
2.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Белковые аминокислоты»	7
2.2. <i>Экспериментальная работа:</i> качественные реакции на белковые аминокислоты	8
2.3. <i>Экспериментальная работа:</i> горизонтальный электрофорез белковых аминокислот на бумаге	13
2.4. <i>Экспериментальная работа:</i> распределительная хроматография белковых аминокислот на бумаге	19
3. Пептиды и белки: качественное обнаружение и методы осаждения	28
3.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Пептиды и белки»	28
3.2. <i>Экспериментальная работа:</i> качественное обнаружение пептидов и белков.....	30
4. Углеводы: качественное обнаружение	38
4.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Углеводы»	38
4.2. <i>Экспериментальная работа:</i> качественное обнаружение углеводов.....	39
5. Липиды: выделение и изучение их свойств	43
5.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Липиды»	43
5.2. <i>Экспериментальная работа:</i> выделение липидов и изучение их свойств	44
6. Нуклеопротеины: выделение и определение состава.....	51
6.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Нуклеиновые кислоты»	51
6.2. <i>Экспериментальная работа:</i> выделение нуклеопротеинов из дрожжей и определение их состава	52
7. Витамины: качественное определение.....	57
7.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Витамины»	57
7.2. <i>Экспериментальная работа:</i> качественные реакции на витамины	58
8. Ферменты: качественное определение и изучение их свойств.....	66
8.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Ферменты»	66
8.2. <i>Экспериментальная работа:</i> качественные реакции на ферменты	68
<i>Рекомендуемая литература</i>	79

1. ПРАВИЛА РАБОТЫ В ХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ, ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОКАЗАНИЕ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ ПРИ НЕСЧАСТНЫХ СЛУЧАЯХ

Выполнение практических занятий по биологической химии требует предварительной самостоятельной подготовки студентов. Каждый студент обязан внимательно ознакомиться с содержанием практического занятия, используя настоящее руководство, лекционные записи, учебные пособия и учебники. В тетради необходимо кратко законспектировать описание опыта, объяснить наблюдаемые явления и обязательно привести уравнения всех реакций.

На занятии студенты совместно с преподавателем разбирают содержание опытов, а затем переходят к выполнению работы, проделывая каждый эксперимент индивидуально, или по двое (по указанию преподавателя). Результаты каждого опыта студенты обязаны показать преподавателю, дать необходимые объяснения и лишь затем вылить содержимое пробирок в склянку для сливов, либо в раковину, и приступить к выполнению следующего опыта.

Выполняя опыты, каждый студент должен строго соблюдать следующие основные **правила работы в химической лаборатории**:

1) в лаборатории необходимо соблюдать чистоту, тишину, порядок и правила техники безопасности, которые подобно изложены в инструкции № 315 по технике безопасности кафедры органической химии;

2) каждый работающий должен знать, где в лаборатории находится аптечка и противопожарные средства;

3) категорически запрещается в лаборатории курить, принимать пищу, пить воду;

4) опыты нужно проводить только в чистой посуде и, завершив работу, необходимо вымыть её;

5) используя реактивы, надо поддерживать на полках и на местах общего пользования полный порядок, не перемещать склянки на другое место, закрывать их пробками;

6) в лаборатории ничего нельзя пробовать на вкус. При определении запаха нельзя глубоко вдыхать пары;

7) в процессе работы необходимо соблюдать аккуратность, следить, чтобы вещества не попадали на кожу лица и рук;

8) нагревая пробирку, не направлять её отверстие на себя и на других окружающих;

9) запрещается бросать в раковину остатки карбида кальция, натрия, сливать вязкие жидкости и кислоты. Их сливают в специальную посуду;

10) работу с ядовитыми веществами (бромом) производить в вытяжном шкафу;

11) нельзя перемешивать содержимое пробирки, закрывая её пальцем и встряхивая. Перемешивание веществ в пробирках достигается легким ударением пальцами по нижней части пробирки;

12) склянки с горючим и легко воспламеняющимися веществами нельзя ставить вблизи нагревательных приборов;

13) в случае вспышки горючих веществ в пробирке — не бросать ее, а закрыть чем-либо отверстие пробирки. Если горящая жидкость разлилась по поверхности стола, пола, то необходимо тотчас же очаг огня засыпать песком, накрыть асбестовым одеялом или воспользоваться огнетушителем;

14) при работе с натрием необходимо выполнять следующие правила:

- маленький кусочек натрия вынуть из банки пинцетом, высушить от керосина фильтровальной бумагой, очистить скальпелем от корки и сейчас же вести в реакционную смесь, бумагу осторожно залить водой;

- нельзя остатки натрия выбрасывать в раковину (возможен взрыв) или в ведро (возможен пожар). Остатки натрия помещают в специальную склянку;

15) работа с концентрированными кислотами требует максимального внимания и осторожности, особенно при нагревании, так как ожоги кислотами очень болезненны, долго заживают, кислоты разрушают одежду, обувь. Особенно нужно беречь глаза.

Поэтому при работе с кислотами надо выполнять следующие правила:

- концентрированные кислоты прибавлять небольшими порциями;
- перемешивать смеси с кислотами нужно особенно осторожно, чтобы не разлетались брызги;

При ожоге кислотами обожженное место следует немедленно промыть большим количеством воды, а затем обработать нейтральным раствором бикарбоната натрия, сделать повязку с мазью от ожогов. В случае поражения глаз после оказания первой помощи немедленно обратиться к врачу;

16) при работе со щелочами не допускать попадания их на руки, лицо и одежду. Особенно беречь глаза! Щелочной ожог сразу же промыть струей воды, затем насыщенным раствором борной кислоты и сразу обратиться к врачу;

17) по окончании работы каждый студент должен убрать своё рабочее место, вымыть посуду, привести в порядок реактивы. Качество уборки рабочих мест проверяет дежурный и сдаёт лабораторию лаборанту или преподавателю.

2. БЕЛКОВЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ: МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ И РАЗДЕЛЕНИЯ

2.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Белковые аминокислоты»

1. Охарактеризуйте белковые аминокислоты (строение, оптическая активность, реакционная способность, амфотерность).
2. Как классифицируют белковые аминокислоты?
3. Приведите примеры аминокислот с алифатическими, ароматическими и гетероциклическими радикалами.
4. Приведите примеры аминокислот с неполярными радикалами.
5. Радикалы каких аминокислот при pH 7 имеют положительный заряд?
6. Какие аминокислоты называют незаменимыми? Приведите примеры.
7. На примере валина покажите, как влияет pH среды на ионизацию α -аминокислот.
8. Приведите уравнения кислотно-основных равновесий для метионина, аргинина и глутаминовой кислоты при различных pH.
9. Дайте определение изоэлектрической точке и рассчитайте её для фенилаланина, лизина и аспарагиновой кислоты.
10. Каким образом определяют величины pKa функциональных групп аминокислот?
11. С какими реагентами аминокислоты выступают в качестве нуклеофилов? Приведите уравнения реакций с конкретными аминокислотами.
12. Назовите классы производных аминокислот по карбоксильной группе. Какими способами они могут быть получены? Приведите уравнения реакций с конкретными аминокислотами.
13. Чем обусловлена реакционная способность белковых аминокислот?
14. Приведите примеры реакций, которые используют для идентификации N-и C-концевых аминокислот при анализе структуры пептидов.
15. Приведите примеры реакций, которые используют для защиты и активации функциональных групп аминокислот в пептидном синтезе.
16. Каково поведение α -аминокислот при нагревании? Охарактеризуйте строение и реакционную способность продуктов реакции.

2.2. Экспериментальная работа: качественные реакции на белковые аминокислоты

Ранее многочисленные качественные цветные реакции на аминокислоты составляли основу анализа α -аминокислот и белков. В настоящее время, когда исследования аминокислот и белков проводятся физико-химическими методами, многие качественные реакции всё же сохраняют своё значение и применяются для обнаружения, идентификации и количественного анализа аминокислот.

Различают два типа качественных реакций:

– *универсальные реакции* — реакции, позволяющие обнаруживать все α -аминокислоты, так как они протекают за счет общих групп аминокислот (амино- и/или карбоксильной);

– *специфические реакции* — реакции, которые дают возможность определить отдельные α -аминокислоты, что обусловлено участием в этих реакциях радикала аминокислот.

Реактивы и оборудование

1. Растворы аминокислот: глицин, пролин, тирозин, триптофан, аргинин, гистидин, цистеин, нитрит натрия (5%-ный раствор), ледяная уксусная кислота, 1%-ный раствор нингидрина, 3%-ный раствор сульфата меди, 10%- и 20%-ные растворы гидроксида натрия, реактив Миллона, концентрированная серная кислота, *n*-диметиламинобензальдегид, спиртовой раствор α -нафтола, раствор гипобромита натрия, 40%-ный раствор мочевины, 1%-ный раствор сульфаниловой кислоты, 5%-ный раствор соляной кислоты, 0,5%-ный раствор нитрита натрия, концентрированная азотная кислота, раствор ацетата свинца.

2. Пробирки, держатели, плитки, водяные бани.

Порядок выполнения работы

При подготовке к лабораторной работе следует изучить теоретический материал по теме «Белковые аминокислоты» и выполнить задания для актуализации знаний, предложенные в методическом пособии. Перед выполнением экспериментальной работы необходимо подробно ознакомиться с предлагаемыми методиками проведения реакций и правилами техники безопасности.

Экспериментальная работа состоит из двух этапов:

– проведение качественных реакций на α -аминокислоты;
– выполнение контрольной задачи, связанной с определением аминокислот в предложенных растворах.

Ход работы и результаты оформить в виде таблицы.

Лабораторная работа № 1.
Качественные реакции на белковые аминокислоты

<i>№ опыта</i>	<i>Название реакции и её краткое описание</i>	<i>Уравнение реакции и условия её проведения</i>	<i>Наблюдения и объяснение</i>

2.2.1. Универсальные реакции

1. Реакция Ван-Слайка на первичную аминогруппу

Аминокислоты, содержащие первичную аминогруппу, реагируют с азотистой кислотой с образованием неустойчивого диазосоединения, разлагающегося с выделением свободного азота и образованием гидроксикислот. Реакция применяется для количественного определения аминокислот по измерению объёма выделившегося газообразного азота.

Выполнение работы. К 1 мл раствора глицина прилить равный объём 5%-ного раствора нитрита натрия и 0.5 мл ледяной уксусной кислоты. Смесь взбалтывают и наблюдают выделение пузырьков азота.

2. Нингидриновая реакция

α -Аминокислоты, реагируя с нингидрином, подвергаются окислительному дезаминированию и одновременно декарбоксилированию. Образовавшийся аммиак затем реагирует с эквимолекулярными количествами окисленного и восстановленного нингидрина, образуя сине-фиолетовый комплекс — пурпур Руэмана* — интенсивность окраски которого пропорциональна количеству аминокислоты.

Некоторые аминокислоты не дают с нингидрином сине-фиолетового окрашивания. Так, пролин и гидроксипролин, содержащие иминогруппы, образуют с нингидрином производные иного строения, окрашенные в жёлтый или оранжевый цвета. Серосодержащие аминокислоты с нингидрином образуют соединения, имеющие оранжево-бурую окраску.

Реакция с нингидрином используется для обнаружения и точного определения небольших количеств аминокислот. При определенным образом подобранных условиях, интенсивность окраски можно исполь-

* Пурпур Руэмана или сине-фиолетовый Руэмана назван так по имени учёного, открывшего эту реакцию в 1910 году.

зовать для колориметрического определения концентрации аминокислот, так как этот метод обладает очень высокой чувствительностью. Кроме того, количественные определения можно проводить и газометрически, измеряя объём выделившегося углекислого газа.

Выполнение работы. В пробирку наливают 1 мл раствора глицина, в другую — 1 мл раствора пролина. В обе пробирки прибавляют по 0.5 мл 1%-ного раствора нингидрина. Содержимое пробирок нагревают на водяной бане несколько минут до появления окраски. В первой пробирке с раствором глицина появляется сине фиолетовое окрашивание, а во второй, с раствором пролина, ярко-жёлтое.

3. Образование комплексов с металлами

α -Аминокислоты образуют внутрикмоплексные соли с катионами двухвалентных металлов. Самыми устойчивыми являются соли меди, образующиеся в результате взаимодействия аминокислот с гидроксидом меди (II). Комплексы представляют собой окрашенные в синий цвет хелатные соединения. Водные растворы таких комплексных солей, в отличие от растворов солей соответствующих металлов, обладают очень низкой электропроводностью.

Выполнение работы. В три пробирки наливают по 1 мл 3%-ного раствора сульфата меди (II) и в каждую пробирку прибавляют несколько капель 10%-ного раствора гидроксида натрия до образования осадка. Затем в одну пробирку добавляют 0.5 мл концентрированного раствора глицина, во вторую — 0.5 мл раствора аргинина, а в третью — 0.5 мл раствора пролина. Сравнивают окраску образовавшихся комплексных солей. В пробирках с глицином и пролином окраска более насыщена по сравнению с раствором аргинина.

2.2.2. Специфические реакции

1. Реакция Миллона на тирозин

Тирозин образует с реактивом Миллона (смесь нитратов одно- и двухвалентной ртути с примесью азотистой кислоты) кроваво-красный осадок, представляющий ртутную соль динитротирозина.

Выполнение работы. К 1 мл концентрированного раствора тирозина прибавляют 0.5 мл реактива Миллона, перемешивают и нагревают до появления красного окрашивания.

2. Реакции на триптофан

Реакции триптофана с альдегидами или альдегидокислотами в кислой среде приводят к образованию окрашенных продуктов конден-

сации. Это качественные реакции на индольное кольцо триптофана, которое может быть обнаружено с помощью реакций Адамкевича (реагент — глиоксиловая кислота) и Эрлиха (реагент — *n*-диметиламинобензальдегид).

а) Реакция Адамкевича на триптофан

Взаимодействие триптофана с глиоксиловой кислотой, образующейся при взаимодействии уксусной кислоты с концентрированной серной кислотой, приводит к образованию красно-фиолетового продукта.

Выполнение работы. К 1 мл триптофана приливают 0.5 мл концентрированной уксусной кислоты, перемешивают и осторожно по стенке пробирки, наклонив её, приливают 1 мл концентрированной серной кислоты так, чтобы не происходило смешения жидкостей. На границе двух слоёв через некоторое время появляется красно-фиолетовое окрашивание.

б) Реакция Эрлиха на триптофан

Реакция триптофана с *n*-диметиламинобензальдегидом в серной кислоте приводит к образованию окрашенного в фиолетовый цвет продукта конденсации.

Выполнение работы. К 1 мл раствора триптофана приливают 0.5 мл раствора *n*-диметиламинобензальдегида в серной кислоте. Смесь нагревают до появления фиолетового окрашивания.

3. Реакция Сакагучи на аргинин

Эта реакция применяется для идентификации гуанидиновой группировки аргинина. При взаимодействии с α -нафтолом в присутствии окислителя в щелочной среде гуанидины дают соединения, окрашенные в красный цвет. Аргинин, реагируя с α -нафтолом и гипобромидом натрия, образует продукт конденсации оранжево-красного цвета.

Выполнение работы. К 1 мл раствора аргинина прибавляют 3 капли 10%-ного раствора гидроксида натрия и 2 капли спиртового раствора α -нафтола. Хорошо перемешивают, прибавляют 2 капли раствора гипобромита натрия и снова перемешивают. Для стабилизации быстро развивающегося оранжево-красного окрашивания приливают 0.5 мл 40%-ного раствора мочевины.

4. Реакция Паули на гистидин

Гистидин в щелочной среде реагирует с бензолсульфокислотой с образованием производного вишнёво-красного цвета. Диазобензолсульфокислота образуется при diazotировании сульфаниловой кислоты.

Взаимодействие диазобензолсульфокислоты с гистидином приводит к образованию азосоединения.

Выполнение работы. К 1 мл 1%-ного раствора сульфаниловой кислоты в 5%-ном растворе соляной кислоты прибавляют 2 мл 0.5%-ного раствора нитрита натрия, сильно встряхивают и сразу же приливают 2 мл раствора гистидина. После перемешивания содержимого пробирки приливают 6 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. Развивается интенсивная вишнёво-красная окраска.

5. Ксантопротеиновая реакция

Эта реакция служит для обнаружения α -аминокислот, содержащих ароматические радикалы. Тирозин, фенилаланин, триптофан при взаимодействии с концентрированной азотной кислотой образуют нитропроизводные, окрашенные в жёлтый цвет. В щелочной среде нитропроизводные аминокислот образуют соли, окрашенные в оранжевый цвет.

Выполнение работы. К 1 мл раствора тирозина приливают 0.5 мл концентрированной азотной кислоты и нагревают до появления жёлтой окраски. После охлаждения добавляют 2 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия до появления оранжевой окраски раствора.

6. Реакция Фоля на цистеин и цистин (сульфгидрильная реакция)

При щелочном гидролизе «слабосвязанная сера» в цистеине и цистине сравнительно легко отщепляется с образованием сульфида натрия или калия. При добавлении ацетата свинца происходит образование осадка сульфида свинца серо-чёрного цвета.

Выполнение работы. К 1 мл раствора цистеина приливают 0,5 мл 20%-ного раствора гидроксида натрия. Смесь нагреть до кипения, а затем добавляют 0,5 мл раствора ацетата свинца. Наблюдается выпадение серо-чёрного осадка.

2.2.3. Контрольная задача

Выполнение работы.

1. Получите у преподавателя набор пробирок с растворами.
2. С помощью универсальной реакции установите, во всех ли пробирках содержатся растворы аминокислот.
3. Используя специфические качественные реакции, определите, растворы каких белковых аминокислот находятся в пробирках.

Ход работы и результаты оформить в виде таблицы.

Последовательность качественных реакций на аминокислоты	Номер пробирки; результат реакции				
	1	2	3	4	5
1.					
2.					
3.					

2.2.4. Вопросы и задания для самоконтроля

1. Перечислите универсальные качественные реакции на белковые аминокислоты.
2. Можно ли с помощью реакции Ван-Слайка различить глицин и пролин?
3. Можно ли с помощью нингидриновой реакции отличить глицин от пролина?
4. Какая реакция является специфической на тирозин? Приведите схему этой реакции.
5. С помощью каких реакций можно обнаружить индольное кольцо в триптофане? Каков химизм этих реакций?
6. Чем объясняется интенсивность окраски конечного продукта в реакции Паули?
7. Предложите последовательность качественных реакций, с помощью которых можно различить растворы аланина, цистеина, пролина и аргинина.

2.3. Экспериментальная работа: горизонтальный электрофорез белковых аминокислот на бумаге

2.3.1. Физико-химические основы электрофореза

Электрофорез — один из основных методов разделения веществ, основанный на различной скорости передвижения соединений с неодинаковыми зарядами в однородном электрическом поле. Применение электрического поля при соответствующих условиях позволяет разделить как вещества, имеющие заряды противоположного знака, так и вещества, которые имеют одинаковый знак заряда и отличаются лишь по величине заряда.

В 1937 году Арне Тизелиус (лауреат Нобелевской премии) с помощью электрофореза впервые осуществил разделение белков. В настоящее время, используя электрофоретические методы, разделяют аминокислоты, пептиды, белки, полисахариды, витамины, коферменты, компоненты нуклеиновых кислот, бактериальные токсины и др. Высокая эффективность и чувствительность метода позволяют использовать электрофорез для достаточно быстрого исследования образовавшейся в результате гидролиза белка смеси аминокислот: определить, какое количество аминокислот содержится в белке и идентифицировать эти аминокислоты.

Разделение веществ с помощью электрофореза будет тем лучше, чем больше разница в их подвижности. На движение заряженных частиц

оказывают влияние сила электрического поля, сопротивление среды, форма самих ионов и их гидратация, продолжительность опыта.

Скорость миграции (V) заряженных частиц вещества в электрическом поле зависит от напряжения электрического поля (E), общего заряда вещества (Z) и сопротивления трения (f). Сопротивление трения определяется размером и формой молекул. Все указанные величины связаны между собой соотношением:

$$V = \frac{EZ}{f}$$

Наибольший вклад в электрофоретическую подвижность (V) вносит величина заряда. В меньшей степени на скорость перемещения оказывают влияние форма и масса молекул. Так, белки движутся в электрическом поле гораздо медленнее, чем простые ионы. Это связано с тем, что отношение заряда к массе в белках меньше, чем в простых ионах. Заряды молекул разделяемых веществ зависят от рН среды, поэтому электрофорез осуществляется в буферных системах, стабилизирующих рН.

Вследствие известного сопротивления среды при прохождении тока повышается температура, что приводит к изменению сопротивления среды и испарению растворителей. Для обеспечения воспроизводимости результатов применяют источники питания, поддерживающие постоянный уровень напряжения или силы тока, используют систему охлаждения. Однако для разделения веществ при небольшом напряжении (100–300 В) и даже более высоком (1500 В) применяют аппаратуру без охлаждения. Наилучшее разделение достигается обычно на приборах, рассчитанных на рабочее напряжение порядка 3000–10000 В. В такие приборы вмонтированы холодильники.

В зависимости от условий проведения различают несколько видов электрофореза. По величине используемого напряжения — *низковольтный и высоковольтный электрофорез*.

По состоянию среды:

- *свободный электрофорез* — разделение проводят в растворе;
- *зональный (или зонный) электрофорез* — разделение проводят на твёрдых влажных носителях, например, на хроматографической бумаге, силикагеле, геле из крахмала, полиакриламидном геле.

По расположению твёрдых поддерживающих сред — *горизонтальный и вертикальный электрофорез*.

Высокой разрешающей способностью характеризуется электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ-электрофорез) со стандартным размером пор, определяемым концентрацией исходных мономеров, взятых для полимеризации геля. ПААГ-электрофорез позволяет разделять вещества одновременно и по величине заряда, и по размеру молекул.

Аминокислоты, имеющие сравнительно малые размеры молекул, легко диффундируют и потому их разделение возможно только при использовании твёрдой подложки — бумаги или крахмала.

Наиболее распространённым методом разделения белковых аминокислот является электрофорез на бумаге. Водный раствор, содержащий смесь аминокислот, наносят на полоску фильтровальной или хроматографической бумаги. Ей дают высохнуть, после чего смачивают буфером с заданным значением рН и помещают в прибор. Концы полоски погружают в кюветы с электродами и включают высокое напряжение (рис. 1). В возникающем при этом постоянном электрическом поле аминокислоты разделяются в соответствии с их суммарным электрическим зарядом при выбранном значении рН. Аминокислоты, которые при этом значении рН представляют собой катионы, мигрируют к катоду, а аминокислоты, имеющие форму анионов, перемещаются к аноду. Через некоторое время бумажную полоску высушивают, опрыскивают раствором нингидрина и снова сушат. В результате на бумаге проступают окрашенные пятна, расположенные на разных расстояниях от линии старта. Получают электрофореграмму.

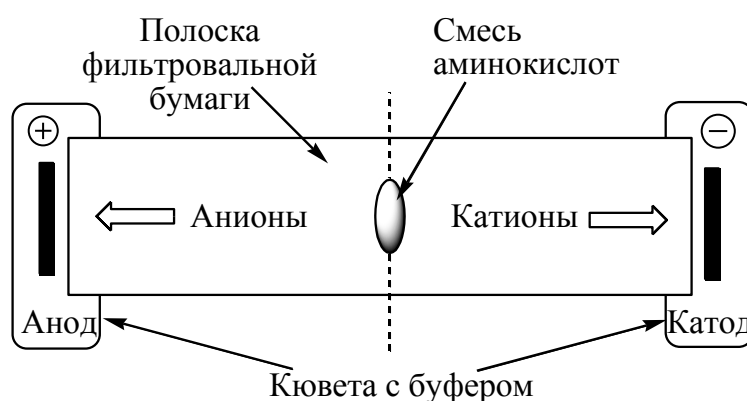


Рис. 1. Схема разделения аминокислот методом электрофореза на бумаге

2.3.2. Разделение аминокислот методом низковольтного горизонтального электрофореза на бумаге

Реактивы и оборудование

1. Растворы белковых аминокислот, фосфатный буфер с рН = 8 (945 мл раствора 8.9 г Na_2HPO_4 в 1 л воды смешивают с 55 мл раствора 6.8 г KH_2PO_4 в 1 л воды), 1%-ный раствор нингидрина в ацетоне.

2. Прибор для горизонтального электрофореза на бумаге ОЕ-201 (см. рис. 4 на с. 21), полоски хроматографической бумаги длиной 450 мм

и шириной 40 мм, капилляры (диаметр отверстий 0.5 мм) для нанесения раствора смеси аминокислот, резиновые перчатки, хроматографическая бумага, карандаши, линейки, пинцеты, сушильный шкаф.

Аппарат для горизонтального электрофореза (рис. 2) состоит из двух соединённых между собой частей. В кожухе из листового металла, покрытого цветным защитным лаком, встроены источник тока, реле и измерительные приборы.

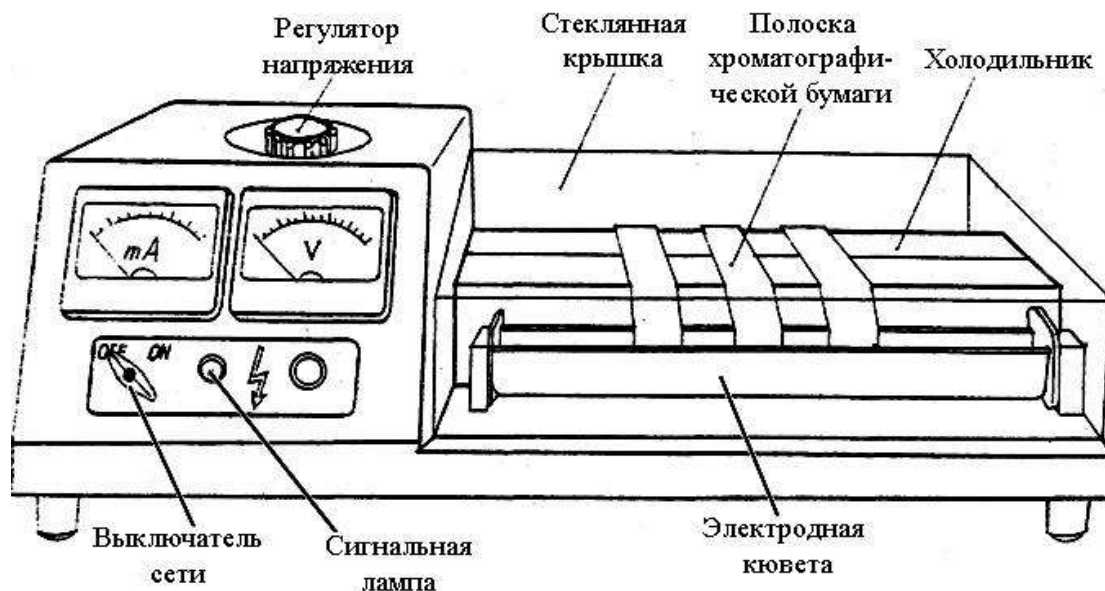


Рис. 2. Аппарат для горизонтального электрофореза на бумаге

Сетевое напряжение в 220 В повышается трансформатором от 0 до 1500 В. Напряжение, подаваемое на электроды, и силу тока показывают приборы на передней панели аппарата. Другая часть аппарата — рабочая камера, изготовленная из толстого стекла. В неё помещены две кюветы (анодная и катодная) с платиновыми электродами, приспособления для размещения и закрепления 8–10 полосок хроматографической бумаги, холодильник.

Кюветы разделяются перегородками на два отделения — наружное и внутреннее. В наружных отделениях кювет располагаются электроды, во внутренние погружаются концы полосок бумаги, на которую нанесена исследуемая жидкость. Разделение кювет на два отделения сделано для того, чтобы предотвратить попадание продуктов электролиза на полоски бумаги. Внутреннее и наружное отделения каждой кюветы соединяют посредством кусочков хроматографической бумаги, которые кладут на перегородки, разделяющие кюветы. Кюветы заполняют буферным раствором с определённым значением pH. Одинаковый уровень жидкости в кюветах поддерживается с помощью сифона.

Для предотвращения испарения жидкости рабочую камеру прибора закрывают пришлифованной толстой стеклянной крышкой. Аппарат может работать без охлаждения, если сила тока не превышает 4.5–4 мА.

Для безопасного проведения экспериментальной работы необходимо выполнить следующие требования:

- работать в резиновых перчатках;
- во время работы аппарата запрещается открывать крышку рабочей камеры;
- соблюдать все правила работы в химической лаборатории в соответствии с инструкцией № 315 по технике безопасности.

Порядок выполнения работы

1. Получите у лаборанта раствор смеси аминокислот с указанным номером или приготовьте сами смесь равных объёмов (по 1 мл) аминокислот, предложенных преподавателем. В небольшой стаканчик с раствором смеси аминокислот поместите капилляр.

2. Полоску хроматографической бумаги (перчатки!) положите на лист фильтровальной бумаги, посередине полоски проведите карандашом тонкую поперечную линию — стартовую. На одном из концов полоски обозначьте анод, на другом — катод, напишите свою фамилию и названия аминокислот.

3. На стартовую линию полоски штриховыми движениями капилляром (предварительно потренируйтесь на обычном фильтре) нанесите раствор смеси аминокислот. Нанесение повторите 4–5 раз; каждую новую порцию наносят после того, как подсохнет предыдущая. После последнего нанесения полоску просушите на воздухе.

4. Подготовьте прибор к работе. Налейте в кюветы по 200 мл буферного фосфатного раствора и поместите их в рабочую камеру так, чтобы контакты кювет совместились с электродами прибора.

5. Полоску хроматографической бумаги, с нанесённой смесью аминокислот, смочите буферным раствором, налитым в чашку Петри. Протяните концы полоски через раствор таким образом, чтобы центральная её часть на расстоянии 2 см по обе стороны стартовой линии осталась сухой. Избыток влаги удалите, промокнув полоску между листами фильтровальной бумаги.

6. Влажную полоску поместите в рабочую камеру аппарата на поверхность холодильника так, чтобы стартовая линия находилась на его центральной части. Концы полоски опустите во внутренние отделения кювет с буферным раствором. Полоска должна плотно прилегать к поверхности холодильника, а её концы прижаты стеклянными стержнями

для равномерного натяжения. После размещения всех полосок смочите их дополнительно буфером.

7. Закройте крышкой рабочую камеру. Включите аппарат в электросеть, повернув выключатель в положение «on». При этом загорается сигнальная лампа. Поворотом ручки регулятора напряжения по часовой стрелке доведите напряжение до 300 В. Вольтметр на передней панели аппарата показывает фактическое напряжение, а миллиамперметр — силу тока.

8. Электрофорез проводится в течение 1.5–2 часов. По истечении этого времени регулятором напряжения уменьшите напряжение до нуля, выключите аппарат, переведя выключатель сети в положение «off».

9. Снимите крышку рабочей камеры, полоски электрофореграмм выньте чистыми пинцетами и удалите с их концов избыток влаги с помощью фильтровальной бумаги. Затем поместите их в горизонтальном положении в сушильный шкаф. Сушат полоски при температуре 50 °С в течение 20–30 минут.

10. Высушенные полоски электрофореграмм смочите 1%-ным раствором нингидрина в ацетоне и для проявления снова поместите в сушильный шкаф при температуре 100°С на 10–15 минут.

11. После выполнения работы тщательно вымойте кюветы, стеклянные стержни и поверхность холодильника.

Проанализируйте полученные результаты. Рассчитайте суммарный заряд для каждой аминокислоты, входящей в смесь, при рН 8. Определите направление перемещения аминокислот при электрофорезе, расположение на электрофореграмме относительно стартовой линии и относительно друг друга. Сравните с полученной Вами электрофореграммой. Оформите работу в тетради.

2.3.3. Вопросы и задания для самоконтроля

1. На чём основаны электрофоретические методы разделения веществ?

2. Какие факторы влияют на перемещение частиц в электрическом поле?

3. Какая формула описывает зависимость скорости миграции заряженных частиц вещества от этих факторов?

4. Перечислите известные Вам электрофоретические методы и укажите их практическое применение.

5. Определите величину суммарного заряда валина, аспарагиновой кислоты и аргинина при рН 7, 3 и 10.

6. Смесь белковых аминокислот, содержащую аланин, цистеин, лизин и глутаминовую кислоту, разделили методом горизонтального электрофореза на бумаге при pH 6. Определите положение аминокислот на электрофореграмме.

7. Охарактеризуйте общий план устройства электрофорезера.

8. Какие токи чаще всего используют для электрофореза аминокислот?

9. Почему в процессе электрофореза требуется охлаждение?

10. Какая химическая реакция лежит в основе проявления электрофореграмм? Напишите соответствующее уравнение.

2.4. Экспериментальная работа: распределительная хроматография белковых аминокислот на бумаге

2.4.1. Теоретические основы метода хроматографии

Распределительная хроматография на бумаге является одной из модификаций хроматографического метода анализа, открытого в 1903 г. русским учёным М. С. Цветом. Основными достоинствами хроматографического метода, по сравнению с другими методами анализа, являются:

- относительная простота оборудования и проведения определений, особенно качественных;
- возможность разделения близких по строению веществ;
- определение почти всех типов органических соединений, независимо от их растворимости в воде;
- использование небольших количеств исследуемых веществ;
- быстрота проведения анализов.

Метод распределительной хроматографии основан на различии значений коэффициентов распределения вещества между двумя несмешивающимися жидкими фазами. Разделение веществ происходит в процессе перемещения смеси потоком подвижной фазы вдоль неподвижной. В случае бумажной хроматографии неподвижной жидкой фазой является вода, которая удерживается порами хроматографической бумаги из атмосферы (20–22% от массы бумаги), а жидкой подвижной фазой является насыщенный водой органический растворитель, не смешивающийся или частично смешивающийся с водой. Когда по бумаге под действием капиллярных сил движется неводный растворитель (подвижная фаза), молекулы вещества, нанесённые на бумагу, распределяются

между двумя фазами в соответствии с их коэффициентом распределения. Скорость перемещения веществ на бумаге зависит от их химического строения и от способности растворяться в подвижном и неподвижном растворителе. Чем выше растворимость вещества (в частности, аминокислоты) в подвижной фазе, тем дальше оно продвигается по бумаге вместе с растворителем и наоборот.

Коэффициент распределения (K) данного вещества определяют по следующей формуле:

$$K = \frac{\text{концентрация вещества в подвижной фазе}}{\text{концентрация вещества в неподвижной фазе}}$$



Рис. 3. Хроматограмма аланина

Однако определить значение коэффициента распределения (K) в распределительной хроматографии практически невозможно. Поэтому для количественной оценки способности разделения вещества на бумаге введён коэффициент распределения R_f , представляющий собой отношение расстояния, пройденного данным веществом (a), к расстоянию, пройденному фронтом растворителя (b) (рис. 3).

Величина R_f зависит от химического строения аминокислоты, применяемого растворителя, сорта хроматографической бумаги и окружающей температуры.

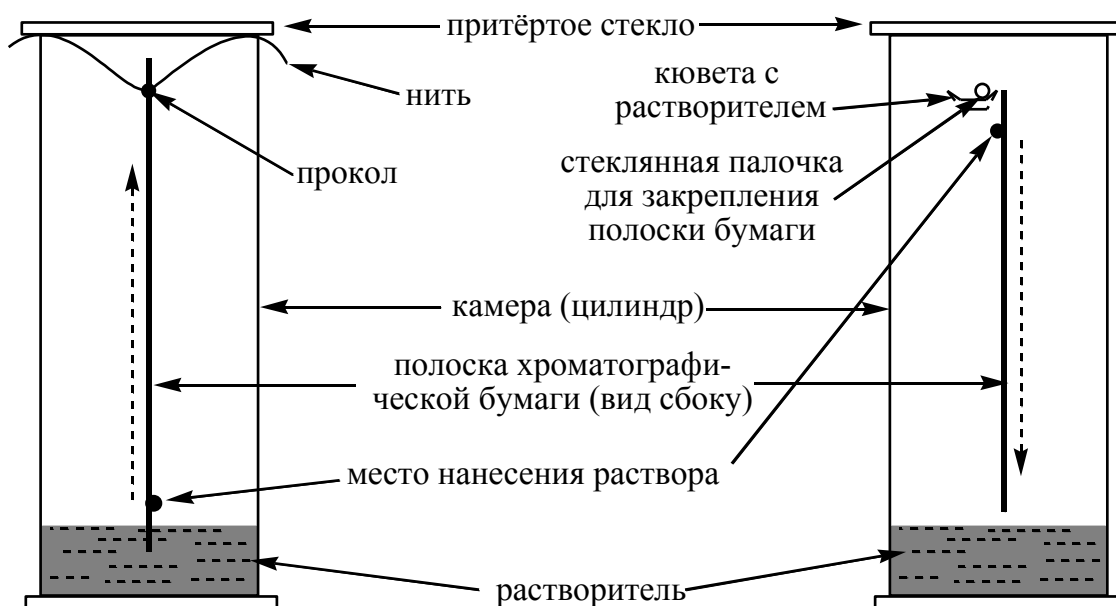
Значение R_f является величиной, характерной для каждой аминокислоты и постоянной при данных условиях опыта (растворитель, температура, сорт бумаги и др.). Чем больше различия в величинах R_f разделяемых веществ, тем лучше осуществляется разделение веществ при хроматографировании.

Идентификация аминокислот, содержащихся в исследуемой смеси, осуществляется сравнением стандартных значений R_f известных аминокислот с R_f аминокислот, полученных для исследуемых смесей (табл. 1).

Хроматографирование на бумаге проводят в камере *восходящим и нисходящим способами* (рис. 4). В обоих случаях на дно герметичной камеры наливают растворитель для насыщения камеры его парами, а затем помещают в камеру хроматографическую бумагу. При *восходящей хроматографии* бумажную полоску помещают вертикально так, чтобы нижний конец был опущен в растворитель. По мере движения растворителя вверх происходит разделение веществ.

**Значение R_f отдельных аминокислот (бумага ватман № 1),
по В. П. Плешкову**

Аминокислота	Растворители	
	<i>н-бутанол — ледяная уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1)</i>	<i>фенол, насыщенный водой</i>
1. Лизин	0.16	0.82
2. Гистидин	0.17	0.69
3. Аргинин	0.18	0.90
4. Серин	0.32	0.36
5. Аспарагиновая кислота	0.33	0.15
6. Глицин	0.34	0.41
7. Треонин	0.36	0.47
8. Глутаминовая кислота	0.37	0.25
9. α -Аланин	0.39	0.56
10. Пролин	0.50	0.89
11. Тирозин	0.53	0.63
12. Метионин	0.58	0.83
13. Валин	0.56	0.75
14. Триптофан	0.62	0.75
15. Фенилаланин	0.66	0.87
16. Изолейцин	0.68	0.86
17. Лейцин	0.72	0.87



*Рис. 4. Способы хроматографирования на бумаге:
нисходящая и восходящая хроматография*

При *нисходящей хроматографии* верхний конец полоски бумаги, с нанесённым веществом, закрепляют в кювете, которая находится в верхней части камеры, а нижний конец опускают так, чтобы он не соприкасался с налитым на дно камеры растворителем. Кювету заполняют растворителем перед началом работы. Растворитель, двигаясь вниз под действием капиллярных сил и силы тяжести, разделяет вещества.

Первый вид хроматографии применяется чаще (однако следует учитывать, что скорость движения растворителя при нисходящей хроматографии гораздо выше, чем при восходящей).

Для получения хороших хроматограмм необходимо использовать бумагу высокого качества.

Требования к бумаге для хроматографии:

- ♦ она должна быть химически чистой;
- ♦ химически и адсорбционно нейтральной;
- ♦ однородной по плотности;
- ♦ обеспечивать определённую скорость движения (бумага должна пропускать растворитель с такой скоростью, при которой достигалось бы полное разделение веществ между подвижной и неподвижной фазами и не допускалось бы быстрое испарение растворителя из бумаги).

Этим требованиям отвечают сорта бумаги, обеспечивающие скорость движения растворителя 1–2 сантиметра в час. Так, для хроматографического анализа наиболее пригодна бумага «ватман № 1», а также FN-II (Германия).

Хроматография требует и определённых растворителей. Жидкие фазы для хроматографирования на бумаге должны удовлетворять следующим основным требованиям:

- ♦ обе жидкости (подвижная и неподвижная фазы) должны ограниченно смешиваться друг с другом;
- ♦ подвижной фазой должен быть выбран такой растворитель, в котором компоненты разделяемой смеси имеют меньшую растворимость, чем в растворителе, применяемом в качестве неподвижной фазы. При этом растворимость в подвижном растворителе не должна быть очень большой или слишком малой. В первом случае вещества смеси будут двигаться со скоростью движения фронта подвижного растворителя, во втором — они будут оставаться на месте их нанесения;
- ♦ растворитель и, следовательно, коэффициенты распределения хроматографируемой смеси должны быть различными для выбранной пары растворителей. В противном случае разделения смеси веществ не произойдёт;
- ♦ состав растворителя в процессе хроматографирования не должен изменяться;

♦ растворители должны быть бесцветными или слабоокрашенными, легко удаляться с бумаги, быть безвредными для человека и коммерчески доступными.

В настоящее время индивидуальные растворители используются в качестве жидких фаз редко. Чаще применяют насыщенные водой н-бутиловый спирт, фенол, крезол и другие смеси химических реактивов (табл. 2).

Таблица 2

**Наиболее часто применяемые смеси растворителей
для хроматографического разделения аминокислот**

<i>Растворители</i>	<i>Соотношение растворителей и способ приготовления</i>
1. н-Бутиловый спирт, ледяная уксусная кислота, вода	4 : 1 : 5 (по объёму). После расслаивания смеси применяется её верхний слой.
2. н-Бутиловый спирт, 20%-ный раствор муравьиной кислоты, вода	5 : 1 : 1 (по объёму)
3. н-Бутиловый спирт, н-пропиловый спирт, вода	12 : 5 : 3 (по объёму)
4. н-Амиловый спирт, пиридин	9 : 1 (по массе)

Для определения местоположения соединений хроматограммы просматривают в ультрафиолетовом свете, проявляют парами йода или опрыскивают специальными растворами. Положение аминокислот на бумаге можно обнаружить при помощи цветной реакции с нингидрином. Отдельные аминокислоты обнаруживаются в виде пятен, окрашенных в голубой, фиолетовый или жёлто-оранжевый цвет (в зависимости от химической структуры аминокислоты).

**2.4.2. Разделение аминокислот
методом распределительной хроматографии на бумаге**

Реактивы и оборудование

1. Водные растворы аминокислот: глицина, аланина, триптофана, лейцина, лизина, фенилаланина и др. (40 мг аминокислоты растворяют в 10 мл воды, триптофан — в смеси воды и спирта 1 : 1, растворитель для хроматографирования: н-бутиловый спирт, ледяная уксусная кислота, вода смешиваются в соотношении 4 : 1 : 5 (по объёму) и встряхиваются в делительной воронке; после расслаивания бутанольный слой (верхний) отделяется и используется для работы, 1%-ный раствор нингидрина в 95%-ном растворе ацетона.

2. Полоски хроматографической бумаги длиной 25 см, шириной 3.5–4.0 см, цилиндры с притёртыми стёклами высотой 25 см, капилляры для нанесения растворов аминокислот, пипетки на 5 мл, пинцеты, ножницы, иголки, нитки, карандаши, линейка, термостат.

Порядок выполнения работы: восходящая хроматография

Все операции с хроматографической бумагой и хроматограммами необходимо выполнять тщательно вымытыми руками или в тонких резиновых перчатках. Вся аппаратура должна быть очень чистой, иначе на хроматограмме выступит много пятен, не относящихся к исследуемым соединениям.

1. Перед началом работы необходимо потренироваться в нанесении пятен растворов аминокислот. Для этого на полоски хроматографической бумаги (2 × 3 см) лёгким касанием капилляра нанесите каплю раствора аминокислоты, стремясь при этом, чтобы диаметр капли не превышал 2–3 мм.

2. На дно цилиндра, осторожно, не смачивая стенок, налейте с помощью пипетки 4 мл бутанольного раствора (это может сделать лаборант перед проведением работы).

3. Вырежьте полоску хроматографической бумаги длиной 25 см и шириной 3.5–4.0 см (если полоски нарезаны лаборантом, нужно аккуратно взять одну из них за края).

4. Через верхний конец полоски протяните нитку длиной 10–15 см на такое расстояние от края, чтобы при опускании полоски в цилиндр она слегка касалась бутанольного раствора.

5. На нижнем конце полоски, на расстоянии 1 см от края, проведите карандашом линию и наметьте три точки или маленьких кружочка диаметром 3–4 мм.

6. Приготовьте три маленьких стаканчика. Последовательно в каждый налейте растворы двух аминокислот и их смеси.

7. В середину кружочка при помощи капилляра нанесите каплю исследуемого раствора аминокислоты или смеси аминокислот. Нанесение проводите в 3–4 приёма, следя за тем, чтобы при каждом прикосновении капилляра пятно не растекалось более чем на 3–4 мм.

Каждую последующую порцию наносите после полного высыхания на воздухе предыдущей; это можно определить по исчезновению просвечивания бумаги в точке нанесения. Таким образом нанесите растворы двух аминокислот и их смесь.

8. Приготовленную полоску опускайте в цилиндр так, чтобы она погружалась в бутанольный раствор на 2–3 мм и висела вертикально, не касаясь стенок (рис. 5).

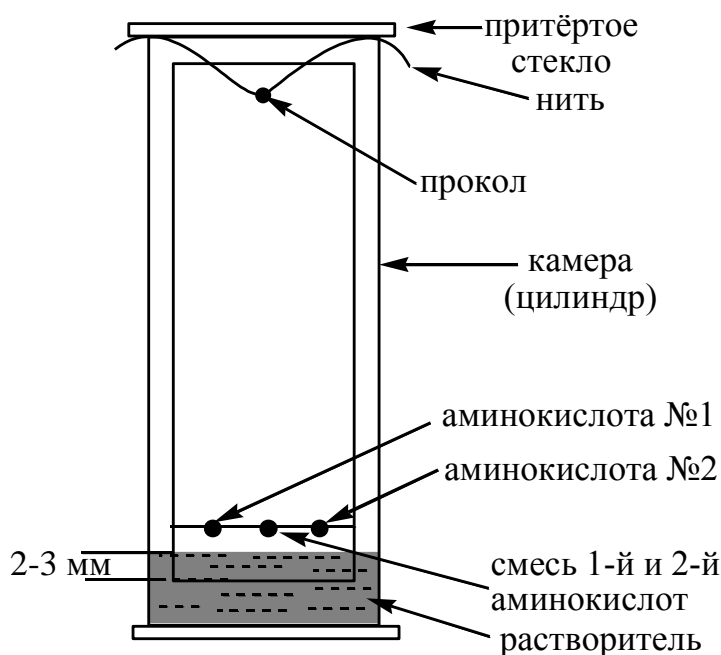


Рис. 5. Восходящая хроматография аминокислот на бумаге

9. Закройте цилиндр стеклом и наблюдайте за подъёмом растворителя по бумаге в течение 1-го часа. За это время фронт растворителя поднимется на 10–12 см (восходящая хроматография).

10. Выньте полоску из цилиндра за нитку, осторожно отметьте карандашом или надрежьте ножницами фронт растворителя и подвесьте её в вертикальном положении в сушильном шкафу, нагретом заранее до 50–100°C, на 10–15 минут.

11. После испарения растворителя полоску выньте из сушильного шкафа и, укрепив на штативе, опрысните из пульверизатора 1%-ным раствором нингидрина в ацетоне так, чтобы вся хроматограмма была равномерно смочена растворителем (можно также быстро протащить хроматограмму через раствор нингидрина, налитый в чашку Петри).

12. Снова поместите полоску в сушильный шкаф на 5–6 минут при температуре 100–110°C. После испарения растворителя можно наблюдать проявление хроматограммы — появление синих и фиолетовых пятен. Некоторые аминокислоты, например пролин, образует с нингидрином соединение жёлто-оранжевого цвета.

13. Далее хроматограмму положите на чистый стол или стеклянную пластинку и с помощью линейки измерьте расстояния:

а — от места нанесения капли (линия старта) до середины каждого пятна аминокислоты;

б — от места нанесения капли до фронта растворителя.

Вычислите R_f для каждой аминокислоты.

14. Идентификацию аминокислот из смеси проведите по совпадению на хроматограмме их позиций с положением аминокислот — свидетелей. Сравните вычисленные значения R_f с табличными (см. табл. 1).

15. Во избежание обесцвечивания пятен (сине-фиолетовый Руэмана через несколько дней разрушается), опустите хроматограмму в насыщенный раствор нитрата меди в 90%-ном растворе ацетона. Образующаяся в результате реакции комплексная соль красного цвета может храниться несколько месяцев.

Приведите уравнение реакции пурпура Руэмана с нитратом меди. Проанализируйте полученные результаты. Оформите работу в тетради.

*Порядок выполнения работы:
радиальная (круговая) хроматография*

Радиальная хроматография является одним из вариантов бумажной хроматографии. Камерами для получения радиальных хроматограмм служат две чашки Петри одинакового диаметра.

1. В одну из чашек Петри налейте 5–6 мл бутанольного раствора, используемого в предыдущем опыте (с. 24–25).

2. Из куска хроматографической бумаги вырежьте диск размером на 1.5 см больше диаметра чашки Петри. (Можно использовать также стандартные бумажные фильтры подходящего размера.)

3. Из центра диска с помощью циркуля карандашом проведите окружность диаметром 1.5–2.0 см и на ней поместите 3 точки или кружочка на равном расстоянии друг от друга (рис. 6).

4. Нанесите в середину каждого кружочка растворы аминокислот и их смесь так, как это описано в предыдущем опыте для восходящей хроматограммы.

5. После высыхания всех нанесённых капель сделайте с помощью скальпеля небольшое отверстие в центре диска и вставьте в него фитиль — скрученную узкую полоску хроматографической бумаги шириной 2–2.5 см — в соответствии с высотой нижней части чашки Петри.

6. Закройте бумажным диском нижнюю чашку Петри так, чтобы конец фитиля был погружен в растворитель.

7. Наблюдайте за распространением фронта растворителя радиально по бумаге.

8. Когда фронт растворителя окажется на расстоянии 0.5–1.0 см от краёв диска, выньте хроматограмму и отметьте карандашом фронт растворителя.

9. Высушите хроматограмму в сушильном шкафу при температуре 50–100°C.

10. Обработайте хроматограмму раствором нингидрина и снова поместите в нагретый сушильный шкаф на 5–6 минут до появления окрашенных пятен.

11. Обведите пятна карандашом и для закрепления опустите диск в ванночку с раствором нитрата меди или сульфата никеля.

12. Вычислите значения R_f для каждой аминокислоты и произведите идентификацию компонентов смеси путём сравнения величины R_f для каждого пятна смеси с величинами R_f «свидетелей» (рис. 6).

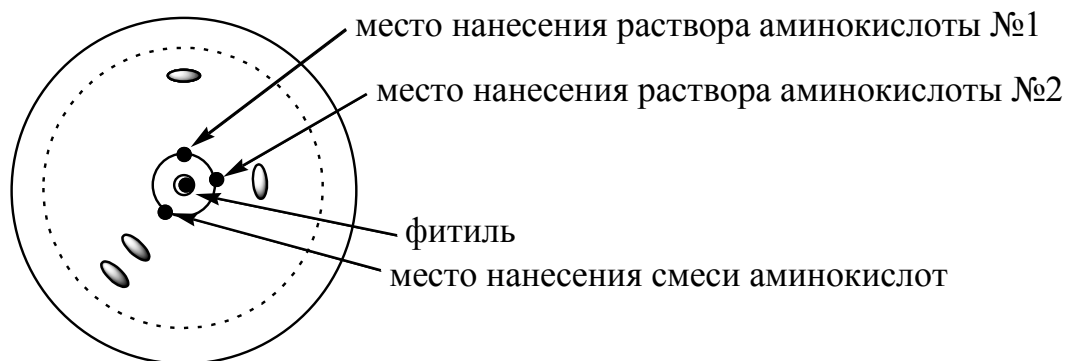


Рис. 6. Радиальная хроматография на бумаге

Проанализируйте полученные результаты. Оформите работу в тетради.

2.4.3. Вопросы и задания для самоконтроля

1. Кто и когда открыл метод хроматографического анализа?
2. Каковы основные достоинства метода хроматографического анализа?
3. Каковы основы метода распределительной хроматографии на бумаге?
4. Какой величиной пользуются для количественной оценки способности разделения веществ на бумаге?
5. От чего зависит величина R_f ?
6. Какие Вы знаете способы хроматографии на бумаге?
7. Каковы требования к хроматографической бумаге?
8. Каковы требования к растворителям для хроматографии?
9. Как проявляются хроматограммы? Каков химизм реакции с нингидрином?
10. Каким способом можно обеспечить длительное хранение хроматограммы аминокислот? Приведите уравнение реакции получения медной соли сине-фиолетового Руэмана.

3. ПЕПТИДЫ И БЕЛКИ: КАЧЕСТВЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ И МЕТОДЫ ОСАЖДЕНИЯ

3.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Пептиды и белки»

1. Какие доказательства можно привести в пользу полипептидной теории строения белков и пептидов?
2. Каковы особенности строения пептидной связи?
3. Классификация и роль природных пептидов в жизнедеятельности организмов.
4. Охарактеризуйте наиболее часто используемые методы синтеза пептидов. Какой принцип положен в основу классификации методов пептидного синтеза?
5. Приведите последовательность реакций синтеза трипептида ала-вал-фен различными методами.
6. Охарактеризуйте различия в структурной организации белков и пептидов.
7. Какова роль белков в жизнедеятельности организмов?
8. В чём особенности строения пептидной группы?
9. Обоснуйте взаимосвязь структуры белковой молекулы и её биологической активности?
10. Приведите примеры гомологичных белков, дайте определение понятиям: переменные и инвариантные участки первичной структуры гомологичных белков.
11. Обоснуйте зависимость конформационной организации полипептидной цепи от её первичной структуры и величины торсионных углов « ψ » и « ϕ ».
12. Изобразите схему формирования α -спирали, параллельной и антипараллельной β -структуры, β -изгиба. Какие взаимодействия стабилизируют данные конформации полипептидной цепи?
13. Дайте определение понятиям: «сверхвторичная структура», «ансамбли, или канонические мотивы вторичной структуры белка», «домены».
14. Какие химические и физические воздействия приводят к нарушению вторичной структуры белка?
15. Охарактеризуйте химические свойства белков, приведите примеры характерных реакций.

16. Перечислите взаимодействия, фиксирующие третичную структуру белка; приведите конкретные примеры таких взаимодействий.

17. Дайте определение нативной структуры белка.

18. Перечислите факторы денатурации белков, объясните изменения, происходящие при этом с белковой молекулой.

19. Физико-химические свойства белков. Изоэлектрическая точка.

20. В результате каких процессов происходит осаждение белков?

21. Что происходит с белковой молекулой при высаливании?

22. Какие изменения вызывает денатурация в структурной организации белковой молекулы?

23. В химии белка часто используются следующие реактивы: CNBr , мочевины, 6 н HCl , β -меркаптоэтанол, трипсин, надмуравьиная кислота, дансилхлорид, нингидрин, фенилизотиоцианат, химотрипсин. Какой из этих реактивов следует применять при идентификации аминоконцевого остатка в пептиде. Какой из этих реактивов следует применять:

- при определении последовательности аминокислот в небольшом пептиде;

- для обратимой денатурации белка, не содержащего дисульфидных связей, какой понадобится дополнительно реактив, если в белке имеются дисульфидные связи;

- для селективного гидролиза пептидных связей, образованных карбоксильными группами лизина и аргинина;

- для селективного гидролиза пептидных связей, образованных карбоксильными группами ароматических аминокислотных остатков;

- для проведения анализа по методу Сенгера, приведите пример такого типа реакций;

- для проведения анализа по методу Эдмана; приведите пример такого типа реакций;

- для определения N-концевых аминокислот, приведите пример такого типа реакций.

24. Выберите из нижеследующих утверждений правильные:

а) расположение аминокислот в полипептидных цепях носит закономерный характер;

б) для пептидов характерна высочайшая специфичность первичной структуры;

в) белки проявляют амфотерные свойства;

г) белки проявляют коллоидные свойства;

д) специфические свойства белков обусловлены наличием пуриновых оснований;

е) число дисульфидных мостиков в разных белках различно, но для каждого белка число и расположение этих связей специфично;

ж) белки не способны отвечать на внешнее воздействие изменением конфигурации молекулы;

з) все аминокислоты, встречающиеся в белках и пептидах, принадлежат к L-ряду;

и) наличие в белковых молекулах каких-либо иных ковалентных связей, помимо пептидных, является редким явлением;

к) на свойства белков не влияют изменения рН и повышение температуры среды;

л) белки содержат свободные аминогруппы, принадлежащие остаткам лиз, и свободные карбоксильные группы, принадлежащие остаткам асп и глу;

м) белки не способны отвечать на внешнее воздействие изменением конфигурации молекулы;

н) 2 н. раствор NaOH при 100°C в течение 8 часов не способен гидролизовать пептидные связи.

25. Выберите правильные парные сочетания фрагментов фраз (они обозначены буквами **А, Б, В, Г, Д**) и смысловых завершающих предложений (они обозначены буквами **а, б, в, г, д**).

А — Фенилтиогидантоиновый метод (метод Эдмана). **Б** — Метод динитрофенилирования по Сенгеру. **В** — Аминопептидаза. **Г** — Метод Акабори. **Д** — Карбоксипептидаз;

а) используется для определения N-концевых аминокислот в белках и пептидах без гидролиза остальных пептидных связей;

б) используется для энзиматического определения N-концевых аминокислот в белках и пептидах;

в) используется для определения N-концевых аминокислот в белках и пептидах, сопровождается полным гидролизом пептидных связей;

г) используется для определения C-концевых аминокислот в белках и пептидах.

3.2. Экспериментальная работа: качественное обнаружение пептидов и белков

В основе методов качественного обнаружения белков лежат цветные реакции и реакции осаждения.

Цветные реакции протекают по пептидным связям и аминокислотным радикалам; многие из них аналогичны цветным реакциям на белковые аминокислоты. По характеру этих реакций можно судить, до некоторой степени, о составе белков.

Реакции осаждения обусловлены изменением физико-химических свойств и структурной организации белковых молекул.

Реактивы и оборудование

1. Раствор яичного белка (овальбумина) в воде (белок : вода = 1 : 5), карбонат натрия (10%-ный раствор), ледяная уксусная кислота, 1%-ный раствор нингидрина, 3%-ный раствор сульфата меди, 10%- и 20%-ные растворы гидроксида натрия, реактив Миллона, концентрированная серная кислота, *n*-диметиламинобензальдегид, спиртовой раствор α -нафтола, раствор гипобромита натрия, 40%-ный раствор мочевины, 1%-ный раствор сульфаниловой кислоты, 5%-ный раствор соляной кислоты, 0.5%-ный раствор нитрита натрия, концентрированная азотная кислота, раствор ацетата свинца.

2. Пробирки, держатели, плитки, водяные бани.

Порядок выполнения работы

При подготовке к лабораторной работе следует изучить теоретический материал по теме «Белки» и выполнить задания для актуализации знаний, предложенные в методическом пособии. Перед выполнением экспериментальной работы необходимо подробно ознакомиться с предлагаемыми методиками проведения реакций и правилами техники безопасности.

Ход работы и результаты оформить в виде таблицы.

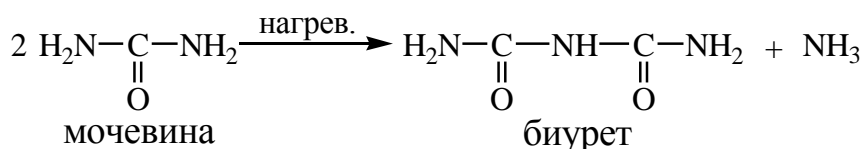
Лабораторная работа № 2. Качественные реакции на белки

<i>№ опыта</i>	<i>Название реакции и её краткое описание</i>	<i>Уравнение реакции</i>	<i>Наблюдения и объяснение</i>

3.2.1. Цветные реакции на белки

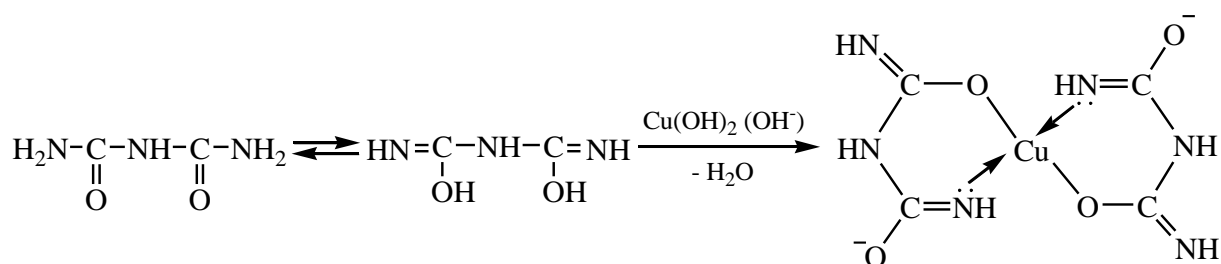
1. Биуретовая реакция (обнаружение пептидных связей)

Биуретовая реакция получила название от производного мочевины — биурета, который образуется при нагревании кристаллической мочевины.



В щелочной среде биурет претерпевает енолизацию. В присутствии гидроксида меди (II) енольная форма биурета образует окрашенный хе-

латный комплекс, в котором координационные связи образованы за счёт электронных пар азота иминных групп.



Биуретовая реакция проявляется у соединений, содержащих не менее двух последовательно расположенных амидных групп. Она широко применяется для обнаружения пептидов, включающих не менее трех аминокислотных остатков, и белков.

Выполнение работы. К 5 каплям 1%-ного раствора яичного белка прибавляют 5 капель 10%-ного раствора едкого натра, 2 капли 1%-ного раствора сульфата меди и всё перемешивают. Окраска растворов при проведении биуретовой реакции варьирует от синей до красной с преобладанием фиолетовой.

Нельзя добавлять избыток сульфата меди, так как синий осадок гидроксида меди (II) маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

2. Нингидриновая реакция (обнаружение аминогрупп)

Нингидриновая реакция является одной из наиболее чувствительных для обнаружения N-концевых аминогрупп. Белки, также как пептиды и белковые аминокислоты, образуют с нингидрином сине-фиолетовый комплекс — пурпур Рузмана.

Выполнение работы. К 5 каплям раствора белка добавляют 5 капель 1%-ного водного раствора нингидрина и кипятят 1–2 мин до появления сине-фиолетового окрашивания.

3. Реакция Миллона

(обнаружение тирозина в составе белковой молекулы)

Присутствие в белковой молекуле фенольных групп тирозинового остатка идентифицируется при добавлении к раствору белка реактива Миллона. Некоторые белки (например, желатин, протамины) реакции Миллона не дают, так как не содержат тирозина.

Выполнение работы. К 5 каплям раствора белка приливают 3 капли реактива Миллона, перемешивают и нагревают до появления характерного кроваво-красного окрашивания.

4. Обнаружение триптофана в составе белковой молекулы

Высокая активность индольного кольца по отношению к электрофильным реагентам способствует легкому обнаружению остатка триптофана в белках и пептидах с помощью реакций Адамкевича (реагент — глиоксиловая кислота) и Эрлиха (реагент — *n*-диметиламинобензальдегид).

а) Реакция Адамкевича

Выполнение работы. К 5 каплям раствора яичного белка добавляют 5 капель ледяной уксусной кислоты, содержащей в качестве примеси небольшое количество глиоксиловой кислоты. Смесь нагревают до растворения образующегося осадка. К охлаждённой смеси осторожно по стенке пробирки приливают 10 капель концентрированной серной кислоты так, чтобы жидкости не смешивались. Через некоторое время на границе раздела двух жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо.

Реакцию можно ускорить, если пробирку поместить в кипящую водяную баню. Чувствительность реакции повышается, если в реагирующую смесь прибавить 2–3 капли 3%-ного раствора сульфата меди

б) Реакция Эрлиха

Выполнение работы. К 5 каплям раствора белка приливают 3 капли раствора *n*-диметиламинобензальдегида в серной кислоте. Смесь нагревают до появления сиреневого цвета.

5. Реакция Сакагучи

(обнаружение аргинина в составе белковой молекулы)

Гуанидиновые группы остатков аргинина идентифицируются в белках при помощи взаимодействия с α -нафтолом в присутствии гипобромида, выполняющего роль окислителя; появление окраски объясняется образованием нафтоиминохиноидной структуры.

Выполнение работы. К 5 каплям раствора белка прибавляют 5 капель 10%-ного раствора гидроксида натрия и 3 капли спиртового раствора α -нафтола. При перемешивании добавляют 2 капли раствора гипобромида натрия; наблюдают появление оранжево-красного окрашивания.

6. Реакция Паули

(обнаружение гистидина и тирозина в составе белковой молекулы)

Радикалы гистидина и тирозина в слабо щелочной среде вступают в реакции азосочетания с диазобензолсульфокислотой с образованием азопроизводных, имеющих вишнёво-красную окраску.

Выполнение работы. К 3 каплям раствора сульфаниловой кислоты в соляной кислоте добавляют 6 капель 0.5%-ного раствора нитрита

натрия, 0.5 мл раствора белка и 1.5 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. После перемешивания развивается вишнёво-красное окрашивание.

*7. Ксантопротеиновая реакция
(обнаружение ароматических аминокислотных остатков —
фенилаланина, тирозина, триптофана)*

Активированные ароматические системы остатков фенилаланина, тирозина, триптофана легко нитруются концентрированной азотной кислотой*. Образующиеся нитропроизводные аминокислот (фен, тир, три) имеют желтую окраску. В щелочной среде нитропроизводные аминокислот (фен, тир, три) превращаются в более интенсивно окрашенные продукты — соли нитроновых кислот.

Выполнение работы. 5 капель раствора белка и 3 капли концентрированной азотной кислоты нагревают до появления жёлтой окраски. После охлаждения прибавляют 10–15 капель 20%-ного раствора гидроксида натрия до появления оранжевого окрашивания.

*8. Реакция Фоля
(обнаружение остатков цистеина и цистина)*

При нагревании в щелочной среде остатки серосодержащих аминокислот (цис) претерпевают нуклеофильную атаку (ОН⁻). Выделяющиеся при этом сульфид-ионы идентифицируются с помощью катионов свинца с образованием сульфида серо-чёрного цвета.

Выполнение работы. К 10 каплям неразбавленного раствора яичного белка приливают вдвое больший объём 10%-ного раствора гидроксида натрия. Содержимое пробирки перемешивают и нагревают 1–2 минуты до кипения. Затем к полученному щелочному раствору добавляют 5 капель 10%-ного раствора ацетата свинца (II) и снова нагревают до появления серо-чёрного цвета.

3.2.2. Осаждение белков

Глобулярные белки — гидрофильные вещества, растворимые в воде с образованием коллоидных растворов. Важнейшим фактором растворимости белков в воде, является способность их молекул к гидратации. Первичная гидратная оболочка формируется из диполей воды, удерживаемых водородными связями с гидрофильными группами полипептида.

* При нагревании процесс нитрования ароматических радикалов может сопровождаться гидролизом полипептида.

Наличие устойчивых гидратных оболочек наряду с зарядом протеиновых глобул определяют устойчивость белковых растворов.

Растворимость белков в воде возрастает при добавлении небольших количеств нейтральных солей (сульфатов натрия, магния, аммония и др.), что способствует увеличению полярности среды и облегчает ионизацию групп COOH , NH_3 , присутствующих в радикалах аминокислотных остатков. При высокой концентрации солей белковые молекулы выпадают в осадок из водных растворов (высаливаются), так как в этих условиях происходит разрушение гидратных оболочек. Кроме того, избыточное количество солевых ионов адсорбируется на поверхности белковых глобул, что приводит к снижению их заряда и, соответственно, к потере растворимости.

Растворимость белков зависит и от pH среды. Она минимальна в изоэлектрической точке, когда заряд белковых молекул равен нулю и между глобулами отсутствует электростатическое отталкивание. К осаждению белков также приводят воздействия, которые вызывают нарушение связей, стабилизирующих нативную пространственную структуру белковой молекулы. То есть при денатурации растворимость белков существенно уменьшается.

1. Высаливание белков сульфатом аммония и хлоридом натрия

Для проведения реакций осаждения белков используют неразбавленные белковые растворы.

Выполнение работы. А) К 0,5 мл раствора белка добавляют равный объём насыщенного раствора сульфата аммония. Смесь слегка встряхивают. Появляется муть от выпадающих в осадок глобулинов. При добавлении воды осадок растворяется.

Б) В пробирку наливают 0,5 мл раствора белка и прибавляют порошок NaCl до получения насыщенного раствора. Через несколько минут в осадок выпадает белок, затем добавляют воду и наблюдают растворение осадка.

2. Денатурация белков



Тепловая денатурация белков

Денатурация большинства белков начинается уже при температуре 50–55°C. На скорость и интенсивность процесса тепловой денатурации оказывают большое влияние pH раствора и добавление электролитов. Быстро и наиболее полно денатурация белков происходит в изоэлектри-

ческой точке. Сдвиги рН в кислую или щелочную стороны затормаживают процесс осаждения белков. В сильно кислых и сильно щелочных растворах осаждения белков при кипячении практически не происходит. Внесение в раствор белка нейтральных солей (хлорида натрия, сульфата аммония и др.) облегчает тепловую денатурацию вследствие уменьшения первичной гидратной оболочки белковых частиц.

Выполнение работы. В пять пробирок наливают по 0,5 мл раствора белка. Содержимое первой пробирки нагревают. Осадок белка появляется ещё до того, как жидкость закипит. Во вторую пробирку добавляют одну каплю 1%-ного раствора уксусной кислоты и нагревают. Хлопьевидный осадок выпадает скорее и полнее вследствие того, что в результате подкисления рН раствора приблизился к изоэлектрической точке белка. В третью пробирку прибавляют 10 капель уксусной кислоты и нагревают. Осадок белка не образуется даже при кипячении. В четвёртую пробирку добавляют 10 капель 10%-ного раствора уксусной кислоты и несколько капель насыщенного раствора хлорида натрия. Содержимое пробирки нагревают. Образуется осадок белка. В пятую пробирку прибавляют 10 капель раствора гидроксида натрия и нагревают. Осадок белка не образуется даже при кипячении.



Денатурация белков под действием концентрированных кислот, солей тяжёлых металлов и органических растворителей

Выполнение работы. А) В три сухие пробирки наливают по 0,5 мл концентрированных кислот: в одну — азотной, в другую — серной, в третью — соляной. Затем, наклонив каждую пробирку, осторожно по стенке из пипетки приливают по 10 капель раствора белка так, чтобы он не смешивался с кислотой. На границе соприкосновения двух жидкостей появляется белый аморфный осадок белка. При встряхивании осадок, выпавший в пробирке с азотной кислотой, увеличивается, а в остальных пробирках растворяется.

Б) В две пробирки наливают по 0,5 мл раствора белка и медленно (по каплям) прибавляют в одну из них 3%-ный раствор сульфата меди, а в другую — 1%-ный раствор ацетата свинца до появления хлопьевидных осадков. Осадки растворяются при добавлении избытка указанных реактивов.

В) В две пробирки наливают по 0,5 мл раствора белка. В одну из них приливают 0,5 мл этилового спирта, в другую — 0,5 мл ацетона. Растворы становятся мутными. При добавлении в эти растворы насыщенного раствора хлорида натрия через некоторое время появляется осадок белка.

3.2.3. Вопросы и задания для самоконтроля

1. Сравните химизм и наблюдаемые изменения при взаимодействии белковых аминокислот и белков с гидроксидом меди.
2. Можно ли с помощью специфической биуретовой реакции различить раствор белка и раствор пептида?
3. Какие качественные реакции на белки сопровождаются денатурацией и почему? Каков их химизм?
4. Охарактеризуйте качественные реакции, протекающие при участии ароматических радикалов аминокислотных остатков белковых молекул?
5. Можно ли с помощью реакции Сакагучи отличить раствор белка от раствора аргинина?
6. Сравните реакции Адамкевича и Эрлиха. Каков их химизм? Какая из этих реакций проще в аппаратном оформлении и почему?
7. От чего зависит растворимость глобулярных белков?
8. Каковы сходства и различия процессов высаливания и денатурации?

4. УГЛЕВОДЫ: КАЧЕСТВЕННОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ

4.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Углеводы»

1. Дайте определение и приведите общие формулы альдоз и кетоз. Объясните, можно ли считать формальдегид простейшим углеводом?

2. Какие виды изомерии свойственны моносахаридам? Приведите примеры всех пространственных изомеров альдопентоз, укажите оптические антиподы и диастереомеры.

3. По какому признаку относят моносахариды к D- или L- ряду? Напишите проекционные формулы D-моносахарида, вращающего плоскость поляризованного света вправо и D-моносахарида, вращающего плоскость поляризованного света влево.

4. Чем можно объяснить, что из всего многообразия моносахаридов в природных полисахаридах в качестве мономерных звеньев содержится почти исключительно D-глюкоза?

5. Какой гидроксил называется гликозидным? Почему ему дано особое название?

6. Дайте определение явлению таутомерии. Чем отличаются друг от друга α - и β -формы моносахаридов?

7. Что такое мутаротация? Приведите примеры циклических форм моносахаридов.

8. Дайте определение понятиям: энантиомеры, диастереомеры, эпимеры, аномеры. Какие моносахариды являются эпимерами D-галактозы?

9. Какие вещества называют гликозидами? Каковы структурные различия между α - и β -метилгликозидами D-глюкозы?

10. Что такое гликозильный остаток и агликон?

11. Какие химические реакции характерны для моносахаридов по карбонильной группе и по спиртовым гидроксилам?

12. Объясните, почему альдозы и кетозы не реагируют с концентрированным раствором бисульфита натрия.

13. Какие химические превращения доказывают восстанавливающие свойства маннозы и глюкозы?

14. Какие химические превращения характерны только для полуацетальной формы моносахаридов?

15. По какому типу построены молекулы дисахаридов? В чем отличие в строении сахарозы, мальтозы и трегалозы?

16. Какова роль гомо- и гетерополисахаридов в организме животных?
17. Объясните различия в строении крахмала и гликогена.
18. Какими общими химическими свойствами обладают полисахариды?
19. Какие эфиры клетчатки находят техническое применение?
20. В чем отличие гемицеллюлозы от целлюлозы? Какие вещества образуются при гидролизе гемицеллюлоз?
21. Укажите нахождение в природе пектиновых веществ. Каково строение и свойства пектиновых веществ?
22. Приведите примеры белоксодержащих полимеров.

4.2. Экспериментальная работа: качественное обнаружение углеводов

Реактивы и оборудование

1. 1%-ный и 5%-ный растворы глюкозы, 0.5%-ный раствор фруктозы, 5%-ный раствор мальтозы, 5%-ный раствор сахарозы, свежеприготовленный крахмальный клейстер, 10%-ный раствор гидроксида натрия, 3%-ный раствор сульфата меди (II), аммиачный раствор оксида серебра, резорцин, концентрированная соляная кислота, уксуснокислый фенилгидразин, 10%-ный раствор серной кислоты, раствор йода в воде.
2. Пробирки, держатели, плитки, водяные бани, фильтровальная бумага

Порядок выполнения работы

При подготовке к лабораторной работе следует изучить теоретический материал по теме «Углеводы» и выполнить задания для актуализации знаний, предложенные в методическом пособии. Перед выполнением экспериментальной работы необходимо подробно ознакомиться с предлагаемыми методиками проведения реакций и правилами техники безопасности.

Ход работы и результаты оформить в виде таблицы.

Лабораторная работа № 3. Качественные реакции на углеводы

№ опыта	Название реакции и её краткое описание	Уравнение реакции	Наблюдения и объяснение

4.2.1. Качественные реакции на моносахариды

1. Доказательство наличия нескольких гидроксильных групп в глюкозе.

Образование сахара меди

Выполнение работы. В пробирку налейте 2 мл 1%-ного раствора глюкозы, 1 мл 10%-ного раствора едкого натра и по каплям (2–3 капли) при встряхивании добавьте 3–4 капли 3%-ного раствора сульфата меди (II). Образовавшийся вначале осадок гидроксида меди (II) немедленно растворяется и получается прозрачный раствор синего цвета, свидетельствующий об образовании хелатного комплекса с ионом меди. Объясните наблюдаемые явления, приведите схему реакции. Полученный раствор сохраните для следующего опыта.

2. Окисление моносахаридов щелочным раствором гидроксида меди (II) (проба Троммера)

Выполнение работы. Полученный в предыдущем опыте раствор осторожно нагрейте на пламени спиртовки до начала кипения. Окисление глюкозы до глюконовой кислоты сопровождается переходом синего цвета раствора в зелёный цвет, затем образованием вначале желтого осадка гидроксида меди (I), переходящего в красный осадок оксида меди (I). Эта реакция называется пробой Троммера и используется для обнаружения глюкозы в моче. Приведите схему реакции, сделайте вывод, для каких типов углеводов характерна эта реакция.

3. Окисление моносахаридов аммиачным раствором оксида серебра (реакция «серебряного зеркала»)

Выполнение работы. В чисто вымытую пробирку налейте 1 мл аммиачного раствора оксида серебра, добавьте 1 мл 1%-ного раствора глюкозы и поместите в баню с горячей водой. Через некоторое время (5–10 мин) наблюдается выделение серебра в виде зеркального слоя на стенках пробирки, либо в виде черного осадка серебра. Приведите схему реакции. Объясните, какая группировка подверглась окислению в данном случае?

4. Проба Селиванова на кетозу (фруктозу)

Выполнение работы. В пробирку поместите крупинку сухого резорцина, прилейте 2 капли концентрированного раствора HCl* и 2 капли 0.5%-ного раствора фруктозы. Содержимое пробирки нагрейте до начала кипения. Постепенно жидкость приобретает красное окрашивание,

* Реактив Селиванова = 50 мл конц. HCl + 50 мл воды + 0,5 г резорцина.

обусловленное образованием фенилметанового красителя, синтез которого явился результатом двухстадийного процесса. Первоначально в условиях кислотного катализа фруктоза подверглась окислению и дегидратации, сопровождавшейся ароматизацией с образованием гидроксиметилфурфурола, который легко конденсируется с резорцином в присутствии кислоты. Приведите схему конденсации гидроксиметилфурфурола с резорцином. Разберите механизм реакции и объясните, чем обусловлено появление окраски.

5. Образование оазона глюкозы

Выполнение работы. В пробирку налейте 3 мл 5%-ного раствора глюкозы и 3 мл уксусно-кислого фенилгидразина. Пробирку поместите в кипящую баню на 10–15 минут и периодически встряхивайте. Когда начнут появляться желтые кристаллы фенилгидразона, нагревание прекратите; пробирку закрепите на штативе. Выпадают желтые кристаллы оазона глюкозы. Приведите схему реакции, объясните, почему идентичный оазон образуют фруктоза и манноза?

4.2.2. Качественные реакции на дисахариды

1. Окисление восстанавливающих дисахаридов щелочным раствором гидроксида меди (II)

Выполнение работы. В пробирку налейте 1 мл 5%-ного раствора мальтозы, а в другую — 1 мл 5%-ного раствора сахарозы, затем в каждую пробирку добавьте по 1 мл 10%-ного раствора едкого натра и несколько капель 5%-ного раствора сульфата меди. После нагревания обеих пробирок лишь в первой пробирке, содержащей восстанавливающий дисахарид, выпадает осадок оксида меди (I). Дайте объяснения наблюдаемым результатам, приведите схему реакции.

2. Гидролиз сахарозы

Выполнение работы. Налейте в пробирку 1 мл 5%-ного раствора сахарозы, добавьте 4–5 капель 10%-ного раствора серной кислоты и кипятите 2–3 минуты на пламени спиртовки. Охладите раствор и разделите пополам. К одной части раствора прибавьте 1 мл 10%-ного раствора едкого натра, несколько капель 5%-ного раствора сульфата меди и прокипятите смесь — появляется красный осадок оксида меди (I). Вторую часть раствора используйте для обнаружения фруктозы по реакции Селиванова. Дайте объяснения наблюдаемым результатам, приведите схемы реакций.

4.2.3. Качественные реакции на полисахариды

1. Качественная реакция на крахмал

Выполнение работы. Налейте в пробирку 1–2 капли крахмального клейстера 0.5 мл воды. Добавьте каплю сильно разбавленного раствора йода (йодной воды). Появляется синее окрашивание. Дайте объяснения наблюдаемым результатам, приведите схему реакции.

2. Кислотный гидролиз крахмала

Выполнение работы. Приготовьте 10 пробирок с 5 каплями разбавленной йодной воды в каждой. В колбочке смешайте 30–40 мл 1%-ного крахмального клейстера с 5–10 мл 10%-ного раствора серной кислоты и нагрейте смесь на закрытой плитке. Через каждые 1–2 минуты после начала кипения отбирайте пробы для проведения качественной реакции с раствором йода. Отмечайте изменение окраски йода. После того, как в очередной пробе окраска не изменилась, нагревание прекратите. Дайте объяснения наблюдаемым результатам, приведите схемы реакций.

4.2.4. Вопросы и задания для самоконтроля

1. С помощью каких качественных реакций можно доказать, что глюкоза является альдегидоспиртом?
2. Почему фруктоза даёт реакцию серебряного зеркала? Охарактеризуйте явление эимеризации.
3. Какие моносахариды превращаются в тот же озазон, что и глюкоза и почему?
4. С помощью каких качественных реакций можно различить лактозу и трегалозу? В чём различие между восстанавливающими и невосстанавливающими дисахаридами?
5. Почему гликоген, в отличие от крахмала, не даёт тёмно-синего окрашивания с раствором йода?

5. ЛИПИДЫ: ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

5.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Липиды»

1. Охарактеризуйте биологические функции липидов.
2. Почему высшие жирные кислоты не растворяются в воде, но хорошо растворимы в растворах щелочей?
3. Приведите структурные формулы наиболее распространенных предельных жирных кислот, входящих в состав липидов. Назовите их по систематической и тривиальной номенклатурам.
4. Приведите структурные формулы пространственных изомеров наиболее распространенных ненасыщенных высших жирных кислот. Какие из этих изомеров входят в состав липидов?
5. Какие ВЖК обозначают как «Омега-3»? Каковы их биологические функции?
6. Какие группы липидов и по каким признакам относят к эйкозаноидам?
7. Каковы биологические функции простагландинов и тромбоксанов?
8. В чём заключаются структурные отличия стеролов и стеридов? Приведите структурные формулы холестерина и пальмитохолестерида.
9. Перечислите группы стеролов в соответствии с их биологическими функциями.
10. Охарактеризуйте биологическую роль холестерина.
11. Какова роль фито- и микостеролов в живой природе?
12. Приведите примеры желчных кислот. Какова их биологическая роль?
13. Дайте определение стероидным гормонам. Какие группы стероидных гормонов принято различать? Приведите примеры.
14. Сравните строение молекул кортикостероидов и половых гормонов. В чём их сходства и различия? Каковы их функции?
15. Какие вещества относятся к группе простых липидов?
16. Какими физическими и химическими свойствами обладают жиры, содержащие преимущественно остатки непредельных жирных кислот?
17. Перечислите способы количественного определения жиров и их состава в природных веществах? Приведите соответствующие схемы реакций.

18. Какие вещества относятся к группе глицерофосфолипидов? Какие вещества образуются при их полном гидролизе? Какова биологическая роль этих веществ и области практического применения?

19. В молекулах какой группы липидов содержится остаток церамида? Охарактеризуйте строение этих веществ и их биологические функции.

20. Дайте определение следующим понятиям: гликолипиды, цереброзиды и ганглиозиды. Каково их строение и биологические функции?

21. Чем обусловлены амфифильные (дифильные) свойства фосфо- и гликолипидов? Каково значение дифильных свойств фосфо- и гликолипидов в живой природе?

22. Какими способностями к самоорганизации обладают амфифильные молекулы? Дайте определение следующим понятиям: эмульсия, мицелла, липосома, билипидный слой. Какие химические взаимодействия реализуются при формировании этих структур?

23. Какие вещества относятся к группе липопротеинов? Охарактеризуйте типы липопротеинов плазмы крови и их свойства в зависимости от состава.

24. Какие типы химических связей и взаимодействий реализуются между структурными компонентами липопротеинов?

25. Дайте определение следующим понятиям: свободные липопротеины, структурные липопротеины. Какова биологическая функция этих веществ?

26. Охарактеризуйте различные группы липопротеинов плазмы крови по степени родства к холестеролу. Раскройте сущность понятий «плохой» и «хороший» холестерол.

5.2. Экспериментальная работа: выделение липидов и изучение их свойств

Реактивы и оборудование

1. Свежее некипячёное молоко, растительное масло, 1%-ный раствор холестерола в хлороформе, 10%-ный раствор гидроксида натрия, карбонат натрия, нитрат калия, безводный сульфат магния (или гидросульфат калия), раствор хлорида кадмия, сульфат железа (II), аммиачный раствор оксида серебра, раствор йода в воде, 0.001 н раствор йода в хлороформе, бромная вода, металлический натрий, концентрированная серная кислота, 10%-ный раствор соляной кислоты, 10%-ный раствор азотной кислоты, молибденовый реактив ($\text{H}_3\text{PO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 + \text{HNO}_3$),

диэтиловый простой эфир, этиловый спирт, хлороформ, ацетон, индикаторная бумага (лакмус или универсальный индикатор).

2. Пробирки, держатели, плитки, водяные бани, бюретки, фильтровальная бумага.

Порядок выполнения работы

При подготовке к лабораторной работе следует изучить теоретический материал по теме «Липиды» и выполнить задания для актуализации знаний, предложенные в методическом пособии. Перед выполнением экспериментальной работы необходимо подробно ознакомиться с предлагаемыми методиками проведения реакций и правилами техники безопасности.

Ход работы и результаты оформить в виде таблицы.

Лабораторная работа № 4. Выделение липидов и изучение их свойств

<i>№ опыта</i>	<i>Название опыта и его краткое описание</i>	<i>Уравнение реакции или схема процесса</i>	<i>Наблюдения и объяснение</i>

5.2.1. Выделение омыляемых липидов и некоторые их свойства

Выделение жира из молока

Выполнение работы. К 6 мл цельного молока в пробирке прилить 2 мл 10%-ного раствора карбоната натрия, хорошо перемешать палочкой и затем взболтать с 5 мл диэтилового простого эфира. Эфирный слой слить в фарфоровую чашечку и выпарить досуха на водяной бане в вытяжном шкафу. После испарения эфира на дне чашечки остаются капли жира.

Примечание. Чтобы результат был более наглядным, рекомендуется объединить в одной фарфоровой чашечке эфирные растворы нескольких (3–5) пробирок.

2. Растворимость ацилглицеролов

Выполнение работы. В четыре пробирки поместить по 1–2 капли растительного масла, в каждую пробирку добавить по 3–4 мл одного из перечисленных растворителей: вода, спирт, хлороформ, эфир. Содержимое пробирок энергично взболтать. Растворяется ли жир при комнат-

ной температуре? При нагревании на водяной бане? Аналогичный опыт осуществите, поместив в пробирки по кусочку животного жира величиной с горошину. Результаты запишите в таблицу. Сделайте вывод относительно растворимости ацилглицеридов.

3. Обнаружение глицерола в жирах (акролеиновая проба)

Обнаружение свободного глицерола в жирах осуществляют опосредованно, путем превращения его в процессе дегидратации в акролеин — ненасыщенный альдегид с резким запахом. Липиды, не содержащие свободного глицерола, не дают акролеиновой пробы.

Выполнение работы. В пробирку вносят 2–3 капли масла (или жира) и 100–200 мг безводного сульфата магния или гидросульфата калия, выполняющих роль дегидратирующих агентов. Пробирку осторожно нагревают (в вытяжном шкафу!) до появления белых густых паров. Отмечают резкий раздражающий запах акролеина.

Внесите в пары полоску фильтровальной бумаги, смоченную аммиачным раствором оксида серебра. Какие признаки реакции наблюдаются? Запишите ваши наблюдения.

Затем внесите в пары полоску фильтровальной бумаги, смоченную раствором фуксинсернистой кислоты. Какие признаки реакции наблюдаются? Запишите ваши наблюдения. Напишите схемы проведенных реакций и сделайте вывод, какая функциональная группа идентифицирована в каждой из проведенных реакций?

4. Проба на ненасыщенные жирные кислоты

Обнаружение свободных ненасыщенных кислот и их ацильных остатков в составе природных триацилглицеролов производят с помощью качественных реакций на кратные связи.

Выполнение работы. А) В пробирку с эмульсией, состоящей из 10 капель растительного масла и 10 капель воды, добавить 2–3 капли спиртового раствора йода и встряхнуть содержимое пробирки. Какие признаки реакции наблюдаются?

Затем в пробирку добавить несколько капель раствора крахмала. Изменилась ли окраска раствора? Проиллюстрируйте наблюдения схемой реакции нейтрального жира, содержащего остатки олеиновой и пальмитиновой кислот с йодом. Объясните наблюдаемые результаты.

Б) К 4 каплям растительного масла в пробирке добавить 1–2 капли бромной воды.

Какие признаки реакции наблюдаются? Проиллюстрируйте наблюдения схемой реакции нейтрального жира, содержащего остатки стеариновой, линолевой и линоленовой кислот с бромной водой.

5. Сравнительное определение степени ненасыщенности жиров

Выполнение работы. В пробирки помещают по 0.5 г различных жиров (подсолнечное масло, свиной жир и т. д.). Предварительно растопив на водяной бане, образцы твердых жиров растворяют в 3 мл хлороформа и титруют из бюретки 0.001 н раствором йода в хлороформе до появления отчетливо розовой окраски.

Объясните причину появления окраски. Зафиксируйте объем раствора йода, израсходованного на насыщение каждого вида жира. Сделайте вывод о сравнительном содержании ненасыщенных кислот в исследованных жирах.

6. Выделение фосфатидилхолина из яичного желтка

Выполнение работы. Половину яичного желтка помещают в пробирку, добавляют 20 мл кипящего спирта и тщательно перебивают содержимое пробирки палочкой в течение 5–10 минут. Затем жидкость фильтруют в сухую пробирку, осадок на фильтре промывают 5 мл кипящего спирта. Полученный фильтрат содержит α -, и β -фосфатидилхолины (лецитины). Напишите формулы этих веществ. Каким методом они выделены из биологического материала? Полученный раствор используйте для дальнейших исследований свойств фосфатидилхолина.

7. Осаждение фосфатидилхолина

Осаждение фосфатидилхолина проводят путем связывания его в виде нерастворимых комплексов, либо посредством добавления менее полярных, чем вода, растворителей.

Выполнение работы. А) К 6 каплям спиртового раствора фосфатидилхолина в сухой пробирке, добавляют 2 капли насыщенного раствора хлорида кадмия. При стоянии через некоторое время выпадает белый хлопьевидный осадок комплексного соединения фосфатидилхолина с хлоридом кадмия, который плохо растворим в спирте. Напишите формулу этого комплекса, учитывая, что его молекула содержит четыре частицы CdCl_2 на три фосфатидилхолина.

Б) В сухую пробирку приливают 10 капель ацетона и по каплям добавляют спиртовой раствор фосфатидилхолина. Что происходит при стоянии этой смеси при комнатной температуре? Объясните наблюдаемое явление.

8. Изучение химического состава фосфатидилхолина

Выполнение работы. Оставшийся от предыдущих опытов спиртовой раствор фосфатидилхолина помещают в фарфоровую чашку и выпаривают досуха на водяной бане. Остаток делят на три части и используют в дальнейших опытах.

А) Гидролиз фосфатидилхолина

Первую часть осадка фосфатидилхолина помещают в пробирку, добавляют 2–3 мл 10%-ного раствора едкого натрия и кипятят 3–5 минут. Какие химические превращения при этом происходят? Напишите схему реакции для фосфатидилхолина, содержащего остатки пальмитиновой и олеиновой кислот.

В процессе кипячения должен ощущаться запах селедочного рассола, характерный для триметиламина. Триметиламин следует идентифицировать по посинению влажной красной лакмусовой бумажки, которую держат у отверстия пробирки. Почему изменил окраску индикатор? Напишите схемы реакции.

Б) Обнаружение азота в фосфатидилхолине

Работу проводят в вытяжном шкафу, надевают защитные очки!

Ко второй части осадка фосфатидилхолина в пробирке добавляют кусочек металлического натрия величиной с горошину. Смесь осторожно нагревают на небольшом пламени до разложения вещества (процесс иногда сопровождается вспышкой). Нагревание продолжают еще 1–2 минуты, доводя пробирку до слабо-красного каления. Раскаленную пробирку опускают в ступку с водой (5 мл), от быстрого охлаждения пробирка растрескивается, а ее содержимое растворяется в воде. Кусочки плава хорошо измельчают пестиком, нерастворенный остаток и стеклянный лом отделяют фильтрованием. К раствору добавляют на кончике скальпеля немного сульфата железа (II), смесь нагревают до кипения, кипятят 1–2 минуты, затем охлаждают и добавляют несколько капель 10%-ного раствора соляной кислоты до кислой реакции. Выпадает синий осадок берлинской лазури. Если азота в исходном материале было мало, то жидкость приобретает зелено-синюю окраску и осадок выделяется, лишь после стояния. Приведите уравнения реакций, соответствующих описанным превращениям.

В) Обнаружение фосфора в фосфатидилхолине

Третью часть осадка фосфатидилхолина переносят в пробирку, тщательно смешивают с двукратным количеством смеси, состоящей из двух частей карбоната натрия и одной части нитрата калия. Пробирку осторожно нагревают в вытяжном шкафу. Реакция идет бурно, сопровождается небольшой вспышкой.

При разложении фосфатидилхолина образуется триметиламин, идентифицируемый по посинению лакмусовой бумажки, которую держат у отверстия пробирки. После охлаждения серовато-бурую золу растворяют в 10%-ном растворе азотной кислоты и в полученном растворе обнаруживают фосфорную кислоту с помощью молибденового реактива. Для этого к 2 мл молибденового реактива ($\text{H}_3\text{PO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 + \text{HNO}_3$) прибавляют небольшими порциями испытуемый раствор. Смесь слегка нагревают. Образуется желто-зеленый осадок фосфомолибдата аммония. Приведите уравнения реакций, соответствующих описанным превращениям.

5.2.2. Свойства неомыляемых липидов, цветные реакции на холестерол

1. Реакция Сальковского

При добавлении к хлороформенному раствору холестерина или сливочного масла концентрированной серной кислоты жидкость окрашивается в красный цвет. Реакция обусловлена образованием продукта дегидратации холестерина — холестерилена, имеющего красный цвет.

Выполнение работы. В сухую пробирку наливают 10 капель 1%-ного раствора холестерина в хлороформе и осторожно по стенке добавляют равный объем концентрированной серной кислоты. При легком встряхивании на границе двух слоев жидкости образуется оранжевое кольцо, которое при стоянии переходит в красное. Приведите уравнение реакции и дайте объяснение наблюдаемым результатам.

2. Реакция Либермана — Бурхардта

В основе данной реакции также лежит способность холестерина отщеплять воду под действием концентрированной серной кислоты и уксусного ангидрида, с образованием димеров (бихолестадиенов), которые с серной кислотой образуют диеновые кислоты: с двумя молекулами H_2SO_4 — продукт красного цвета, с одной молекулой H_2SO_4 — продукт зеленого цвета.

Выполнение работы. В сухую пробирку наливают 10 капель 1%-ного раствора холестерина в хлороформе, 3–6 капель уксусного ангидрида и 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки осторожно встряхивают и помещают в баню при температуре 40°C на 1–2 минуты или оставляют при комнатной температуре на 5–10 минут.

В присутствии холестерина появляется сначала красное окрашивание, которое затем переходит в фиолетовое, синее и зеленое. Приведите соответствующие химические уравнения.

Реакция Либермана-Бурхардта нашла применение в методах качественного и количественного определения стеролов.

5.2.3. Вопросы и задания для самоконтроля

1. Приведите схемы качественных реакций, с помощью которых можно различить растворы олеиновой и пальмитиновой кислот.

2. Напишите структурные формулы нейтральных жиров: а) простого, б) смешанного, в составе которого преобладают насыщенные ВЖК, в) смешанного, в составе которого преобладают ненасыщенные ВЖК. Формулы оптически активных веществ изобразите с помощью проекций Фишера.

3. Какие спирты или аминспирты входят в состав липидов? Сравните их растворимость в воде.

4. Можно ли разделить смесь гликолипидов и фосфолипидов с помощью хлорида кадмия? Ответ обоснуйте.

5. Можно ли с помощью бромной воды различить раствор холестерина и стеариновой кислоты в гексане? Ответ подтвердите уравнениями реакций.

6. Приведите уравнение кислотного гидролиза пальмитохолестерида. Какова его роль в живых клетках?

6. НУКЛЕОПРОТЕИНЫ: ВЫДЕЛЕНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОСТАВА

6.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Нуклеиновые кислоты»

1. В каких условиях может осуществляться гидролиз ДНК и РНК? Каковы продукты этих реакций? Назовите химические связи, которые подвергаются гидролизу.
2. Какие виды таутомерии характерны для азотистых оснований, входящих в состав НК? В какой форме азотистые основания входят в состав НК?
3. Какие минорные азотистые основания встречаются в нуклеиновых кислотах?
4. Чем отличаются нуклеотиды от нуклеозидов? Каковы их биологические функции?
5. Объясните особенности строения нуклеозид-5'-ди- и трифосфатов. Какие свойства проявляют фосфоангидридные связи нуклеозид-5'-ди- и -трифосфатов?
6. Какие химические превращения сопровождаются образованием макроэргических связей?
7. Какие химические превращения приводят к высвобождению энергии макроэргических связей? Приведите примеры важнейших макроэргических нуклеотидов.
8. Охарактеризуйте строение полинуклеотидной цепи: какова связь строения сахарофосфатного остова и азотистых оснований со свойствами полинуклеотида?
9. Какие виды ДНК существуют в живых организмах? В чем их сходство и различие? Каковы их функции?
10. Что такое плазмиды (эписомы)?
11. Какие виды РНК существуют в живых организмах? Каковы их функции?
12. Раскройте смысл правил Чаргаффа.
13. Как проявляется принцип комплементарности в строении ДНК и РНК?
14. Какие взаимодействия стабилизируют вторичную и третичную структуры ДНК?
15. С какими веществами ассоциируются полинуклеотиды ДНК и РНК? Каково значение этих взаимодействий?

16. Приведите примеры природных нуклеопротеиновых комплексов. Какие компоненты их формируют, какие взаимодействия их связывают?

17. Как формируется вторичная и третичная структуры ДНК прокариот?

18. Как формируется вторичная и третичная структуры ДНК эукариот?

19. Каковы особенности первичных структур разных типов РНК?

20. Как формируются вторичные и третичные структуры разных типов РНК?

21. Каким образом происходит кодирование и считывание генетической информации?

22. Каковы физические свойства НК? Дайте определение понятию «температура плавления ДНК».

23. Какие процессы лежат в основе метода молекулярной гибридизации ДНК? Каково значение этого метода?

24. Какова роль процессов метилирования и диазотирования азотистых оснований ДНК? Приведите примеры конкретных химических превращений.

25. Что такое мутация? Какие химические превращения приводят к мутациям?

6.2. Экспериментальная работа:

выделение нуклеопротеинов из дрожжей и определение их состава

Реактивы и оборудование

1. Пекарские дрожжи, 1%-ный и 7%-ный растворы сульфата меди (II), 1%-ный раствор нитрата серебра, 0.4%-ный, 10%-ный и 30%-ный растворы гидроксида натрия, 25%-ный раствор аммиака, 5%-ный раствор уксусной кислоты, 10%-ный раствор серной кислоты, молибденовый реактив ($\text{H}_3\text{PO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 + \text{HNO}_3$), диэтиловый простой эфир, индикаторная бумага (универсальный индикатор или лакмус).

2. Ступки и пестики, речной песок, пробирки, обратные воздушные холодильники, держатели, плитки, водяные бани, центрифуга, центрифужные пробирки.

Правила работы с центрифугой:

- равномерно располагать центрифужные пробирки в гнездах, уравнивая противоположные позиции;
- постепенно переключать скорость вращения;
- не трогать центрифугу до полного прекращения вращения.

Порядок выполнения работы

При подготовке к лабораторной работе следует изучить теоретический материал по теме «Нуклеиновые кислоты» и выполнить задания для актуализации знаний, предложенные в методическом пособии. Перед выполнением экспериментальной работы необходимо подробно ознакомиться с предлагаемыми методиками проведения реакций и правилами техники безопасности.

Экспериментальная работа состоит из трёх этапов:

- выделение нуклеопротеинов из дрожжей;
- кислотный гидролиз нуклеопротеинов;
- определение состава гидролизата.

Ход работы и результаты оформить в виде блок-схемы (первый этап) и таблицы (второй и третий этапы).

Лабораторная работа № 5.

Выделение нуклеопротеинов из дрожжей и определение их состава

А) Выделение нуклеопротеинов (блок-схема)

Б) Кислотный гидролиз нуклеопротеинов и анализ гидролизата (таблица):

<i>№ опыта</i>	<i>Название реакции и её краткое описание</i>	<i>Уравнение реакции</i>	<i>Наблюдения и объяснение</i>

6.2.1. Выделение нуклеопротеинов из дрожжей

Доступными и удобными организмами, особенно богатыми нуклеопротеинами, являются дрожжи. Нуклеопротеины извлекаются из дрожжевых клеток при механическом разрушении тканей клеток. Дальнейшее их выделение связано со свойством растворяться в разбавленных щелочных растворах и легко осаждаться при подкислении.

Выполнение работы.

1. Навеску 1 г сухих дрожжей помещают в ступку, добавляют 0.5 г речного песка, 2–3 капли эфира и 2 капли воды.

2. Для разрушения клеток содержимое ступки энергично и непрерывно растирают в течение 2–3 минут до образования пластичной массы.

3. Добавляют в ступку 4 мл 0.4%-ного раствора едкого натра и полученную массу также энергично растирают в течение 5 минут.

4. Выливают содержимое ступки в центрифужную пробирку.

5. Помещают пробирки в центрифугу и центрифугируют в течение 10 минут (центрифугу вводят постепенно).

6. После полной остановки центрифуги вынимают пробирки. Надосадочную жидкость осторожно пипеткой переносят в фарфоровую чашку.

7. Медленно при размешивании стеклянной палочкой к содержимому чашки прибавляют 1.5 мл 5%-ного раствора уксусной кислоты. При добавлении уксусной кислоты происходит выпадение нуклеопротеинов в осадок.

8. Полученный суспенз нуклеопротеинов переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 10 минут.

9. Надосадочную жидкость сливают; осадок заливают 4 мл 10%-ного раствора серной кислоты, и размешивают. Образовавшийся суспенз переносят в пробирку, в которой будут проводить гидролиз.

6.2.2. Кислотный гидролиз нуклеопротеинов

При непродолжительном гидролизе нуклеопротеинов, выделенных из дрожжевой массы, происходит разрушение нуклеопротеиновых комплексов, при этом отделившиеся белки частично гидролизуются до пептидов, а полинуклеотиды полностью распадаются на пуриновые и пиримидиновые основания, рибозу и 2-дезоксирибозу и фосфорную кислоту. Продукты гидролиза нуклеопротеинов могут быть обнаружены в гидролизате специфическими (качественными) реакциями для каждого типа соединений.

Выполнение работы. Кислый суспенз нуклеопротеинов помещают в широкую пробирку, добавляют заплавленный капилляр или кипелки из необожженной глины для равномерного кипения, вставляют в пробирку обратный воздушный холодильник (трубку) и кипятят в течение 1.5 часов, затем охлаждают. Охлажденный гидролизат профильтровывают через складчатый фильтр. Фильтрат используют для качественного анализа на полипептиды, пуриновые основания, пентозы и фосфорную кислоту.

Составьте схему частичного и полного гидролиза дезоксирибонуклеопротеинов и рибонуклеопротеинов, используя структурные формулы, а также названия всех промежуточных и конечных продуктов гидролиза.

6.2.3. Анализ гидролизата

1. Биуретовая реакция на полипептиды

Пептиды, образовавшиеся в ходе гидролиза нуклеопротеинов, дают все характерные для них качественные реакции, одной из которых является биуретовая реакция.

Выполнение работы. 5 капель гидролизата нейтрализуют 20 каплями 10%-ного раствора едкого натра (до pH 9 по универсальному индикатору) и добавляют 1–2 капли 1%-ного раствора сульфата меди (II). Раствор окрашивается в сине-фиолетовый цвет. Изменение окраски объясняется образованием комплексного соединения меди с белками или пептидами. Приведите соответствующее уравнение реакции.

2. Реакция на пуриновые основания

При взаимодействии с нитратом серебра пуриновые основания образуют соли, нерастворимые в растворе аммиака.

Выполнение работы. 10 капель гидролизата нейтрализуют 6 каплями 25%-ного раствора аммиака (до pH 4 по универсальному индикатору, так как серебряный комплекс пуриновых оснований выпадает в слабокислой среде, а затем добавляют 5 капель 1%-ного раствора азотнокислого серебра. Наблюдается образование мелкодисперсного комплекса серебра с пуриновыми основаниями, опалесцирующего в растворе.

3. Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу

Пентозы, образовавшиеся в ходе гидролиза нуклеопротеинов, дают все характерные для них качественные реакции, одной из которых является проба Троммера.

Выполнение работы. 5 капель гидролизата нейтрализуют 15 каплями 30%-ного раствора едкого натра (до pH 9), затем добавляют 1 каплю 7%-ного раствора сульфата меди (избыток сернокислой меди меняет окраску). Раствор при этом окрашивается в синий цвет, так как образуются соответствующие сахараты. Пробирку с раствором нагревают до кипения и наблюдают постепенный переход окраски от жёлтого к красному. Объясните причину происходящих изменений. Приведите химические уравнения.

4. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

Выполнение работы. К 20 каплям молибденового реактива ($\text{H}_3\text{PO}_4 + (\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4 + \text{HNO}_3$) добавляют 3 капли гидролизата и кипятят несколько минут, затем охлаждают. Образуется кристаллический осадок комплексного соединения — фосфомолибдата аммония желтого цвета. Приведите уравнение реакции.

На основании полученных результатов сделайте выводы относительно состава нуклеопротеинов и тех химических процессов, которым они подвергались.

6.2.4. Вопросы и задания для самоконтроля

1. Каким образом происходит выделение нуклеопротеинов из биологического материала?
2. Какие методы используются для фракционирования НК?
3. Какие методы используются для определения молекулярной массы НК?
4. Какие качественные реакции позволяют идентифицировать наличие белкового компонента в гидролизате нуклеопротеинов?
5. Какие качественные реакции позволяют идентифицировать наличие азотистых оснований в гидролизате нуклеопротеинов?
6. Какие качественные реакции позволяют идентифицировать наличие пентоз в гидролизате нуклеопротеинов?
7. Какие качественные реакции позволяют идентифицировать наличие фосфорной кислоты в гидролизате нуклеопротеинов?

7. ВИТАМИНЫ: КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

7.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Витамины»

1. Дайте определение понятиям «витамин» и «витаминоподобное соединение»?
2. Приведите примеры витаминов, в состав которых входит аминокислотная группа. Приведите их формулы.
3. Какие витамины содержат гетероциклические системы? Приведите их формулы.
4. Какие витамины содержат системы сопряжённых кратных связей? Приведите их формулы.
5. Приведите примеры оптически активных витаминов. Напишите их формулы, обозначьте хиральные центры.
6. Каковы принципы классификации витаминов?
7. Проанализируйте строение молекул жирорастворимых витаминов и объясните, с чем связана их гидрофобность.
8. Какова роль витаминов в составе ферментов?
9. Дайте определения понятиям: витаминерия, витаминеры.
10. Приведите примеры витаминов, входящих в состав окислительно-восстановительных ферментов.
11. Что такое авитаминозы и гиповитаминозы?
12. Каковы причины появления симптомов гипо- и гипervитаминозов?
13. Какова химическая природа ретинола и кальциферола? Какие вещества являются их провитаминами и почему?
14. Каковы специфические признаки авитаминозов, вызванных отсутствием в пище ретинола и кальциферола?
15. Какова связь между ретинолом, зрительным пурпуром и «куриной» слепотой?
16. Чем обусловлены кровоизлияния при недостатке филлохинона (витамин К) и какова причина кровоизлияния при недостатке аскорбиновой кислоты?
17. Каковы специфические признаки авитаминозов, вызванных отсутствием в пище тиамина, рибофлавина, никотинамида, пиридоксина.
18. Какие витамины синтезируются симбиотическими бактериями желудочно-кишечного тракта человека?

19. Какие витамины не устойчивы к действию солнечного света и почему?

20. Какие витамины в первую очередь разрушаются при тепловой обработке?

21. Приведите примеры антагонизма и синергизма при взаимодействии витаминов.

22. На конкретных примерах раскройте сущность понятия «анти-витамины».

7.2. Экспериментальная работа: качественные реакции на витамины

Реактивы и оборудование

1. Рыбий жир, 0.1%-ный спиртовой раствор α -токоферола, 0.1%-ный спиртовой раствор викасола или 0.2%-ного спиртового раствора метиона, кристаллический тиамин (или его 5%-ный раствор), 0.0025%-ный раствор рибофлавина, никотиновая кислота, 1%-ный раствор пиридоксина, 0.05%-ный раствор аскорбиновой кислоты, насыщенный водный раствор рутина, сульфат железа (II), хлорид железа (III), железосинеродистый калий, 5%-ный раствор гидрокарбоната натрия, 5%-ный раствор гидросульфита натрия, 10%-ный и 30%-ные растворы гидроксида натрия, 1%-ный раствор гидроксида калия, концентрированная серная кислота, концентрированная соляная кислота, концентрированная азотная кислота, гранулированный цинк, ледяная уксусная кислота, 0.025%-ный раствор цистеина, анилин, 1%-ный спиртовой раствор диэтилмалонного эфира, раствор брома в безводном хлороформе (1 : 60), 5%-ный раствор ацетата меди (II), хлороформ, изобутиловый (или изоамиловый) спирт.

2. Пробирки, держатели, плитки, водяные бани.

Порядок выполнения работы

При подготовке к лабораторной работе следует изучить теоретический материал по теме «Витамины» и выполнить задания для актуализации знаний, предложенные в методическом пособии. Перед выполнением экспериментальной работы необходимо подробно ознакомиться с предлагаемыми методиками проведения реакций и правилами техники безопасности.

Экспериментальная работа состоит из двух этапов:

– проведение качественных реакций на витамины;

– выполнение контрольной задачи, связанной с определением витаминов в предложенных растворах.

Ход работы и результаты оформить в виде таблицы.

Лабораторная работа № 6.
Качественные реакции на витамины

<i>№ опыта</i>	<i>Название реакции и её краткое описание</i>	<i>Уравнение реакции и условия её проведения</i>	<i>Наблюдения и объяснение</i>

7.2.1. Жирорастворимые витамины

1. Качественные реакции на ретинол (витамин А)

А) С концентрированной серной кислотой (реакция Друммонда).

В основе реакции лежит способность серной кислоты отщеплять от витамина А воду с образованием окрашенных продуктов реакции.

Выполнение работы. В одну пробирку наливают 1–2 мл рыбьего жира и 4–6 мл хлороформа, в другую раствор 10%-ного растительного масла в хлороформе, затем в каждую добавляют по 1–2 мл концентрированной серной кислоты. При наличии витамина А появляется голубая окраска, сменяющаяся фиолетовой, а затем красно-бурой вследствие образования липохрома. Приведите уравнение реакции.

Б) Реакция с сульфатом железа (II)

Выполнение работы. К 1–2 мл рыбьего жира или 0.06%-ного раствора витамина А в хлороформе добавляют 5–10 мл ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II) и 1–2 мл концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное. Каротины дают в этой реакции зеленоватое окрашивание.

*2. Качественные реакции на кальциферолы
(витамины группы D)*

А) С анилином.

Выполнение работы. В сухую пробирку наливают 1 мл витаминизированного рыбьего жира, прибавляют 4–5 мл анилина и 0.5 мл концентрированной соляной кислоты. Содержимое пробирки перемешивают, осторожно нагревают при постоянном перемешивании до

кипения, и кипятят 30 с. При наличии витаминов группы D жёлтая эмульсия делается сначала зелёной, а затем красной. Через 1–2 мин эмульсия делится на два слоя, из которых нижний окрашен в интенсивно красный цвет.

Б) Бромхлороформенная проба на кальциферолы

Выполнение работы. В сухую пробирку наливают 1–3 мл рыбьего жира или концентрата витамина D и 2–4 мл раствора брома в безводном хлороформе (в соотношении 1 : 60), перемешивают и нагревают на водяной бане в течение 1–2 минут. В присутствии кальциферолов постепенно появляется зеленовато-голубое окрашивание. Реакция неспецифична. Приведите уравнение реакции.

3. Качественные реакции на токоферолы (витамины группы E)

А) С азотной кислотой

Метод основан на реакции окисления α -токоферола азотной кислотой в α -токоферилхинон, окрашенный в жёлтый или желтовато-красный цвет.

Выполнение работы. В сухую пробирку помещают 2–3 мл 0.1%-ного спиртового раствора α -токоферола и осторожно прибавляют 5–6 мл концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирки слегка встряхивают и помещают пробирку в водяную баню, нагретую до 70°C. Образовавшаяся эмульсия постепенно расслаивается. Верхний маслянистый слой приобретает красную окраску. Приведите химическое уравнение.

Примечание. Иногда реакция протекает бурно. Поэтому азотную кислоту необходимо прибавлять медленно, по стенке пробирки и проводить реакцию в вытяжном шкафу.

Б) С хлоридом железа (III)

Метод основан на реакции окисления α -токоферола хлоридом железа (III) в α -токоферилхинон, окрашенный в жёлтый или желтовато-красный цвет.

Выполнение работы. В сухую пробирку помещают 1–2 мл 0.1%-ного спиртового раствора α -токоферола, прибавляют 0.5 мл раствора хлорида железа (III) и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Затем пробирку помещают в водяную баню и наблюдают окрашивание раствора в красный цвет. Приведите уравнение реакции.

4. Качественные реакции на филлохиноны (витамины группы К)

А) Со щелочным раствором цистеина

В основе метода лежит реакция восстановления метинона цистеином, сопровождающаяся образованием продукта конденсации, придающего раствору жёлтую окраску.

Выполнение работы. В сухую пробирку наливают 1 мл 0.1%-ного спиртового раствора викасола (синтетический аналог витамина К₁) или 0.2%-ного спиртового раствора метинона (синтетический аналог витамина К₃). Затем прибавляют 1 мл 0.025%-ного раствора цистеина и 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия. Появляется жёлтое окрашивание. Приведите соответствующее уравнение реакции.

Б) С диэтилмалоновым эфиром

Выполнение работы. В сухую пробирку наливают 2 мл 0.1%-ного спиртового раствора викасола, 0.5 мл 1%-ного спиртового раствора диэтилмалонового эфира и 0.1 мл 1%-ного раствора гидроксида калия. Возникает фиолетово-красное окрашивание.

В) С анилином

Анилин восстанавливает филлохиноны до соответствующих нафтохинонов, окрашенных в красный цвет. Так, метинон восстанавливается анилином до 2-метил-3-аминофенил-1,4-нафтохинона.

Выполнение работы. В сухую пробирку наливают 2 мл 0.2%-ного спиртового раствора метинона (или викасола), добавляют 1 мл анилина и перемешивают. Смесь окрашивается в красный цвет. Приведите соответствующее уравнение реакции.

7.2.2. Водорастворимые витамины и витаминоподобные соединения

1. Качественная реакция на тиамин (витамин В₁) с железосинеродистым калием

Выполнение работы. В пробирку вносят 2–3 мг тиамина (или к 1 мл 5%-ного раствора тиамина), добавляют 2–3 мл 5%-ного железосинеродистого калия* и 2 мл 30%-ного гидроксида натрия. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и нагревают на водяной бане. При

* Железосинеродистый калий также принято называть феррицианидом калия.

нагревании жидкость окрашивается в жёлтый цвет вследствие превращения тиамин^{*} в тиохром. Далее в пробирку вносят 1 мл изобутилового спирта^{*} и содержимое интенсивно взбалтывают. При освещении полученного раствора тиохрома в изобутаноле ультрафиолетовыми лучами видна голубая флюоресценция.

2. Качественная реакции на рибофлавин (витамин B₂) в присутствии цинка с соляной кислотой

Метод основан на реакции восстановления изоаллоксазинового кольца водородом в момент выделения, который образуется при взаимодействии цинка с соляной кислотой. Образующийся при этом лейкофлавин придаёт раствору розовую окраску. Однако при стоянии снова окисляется в рибофлавин.

Выполнение работы. В пробирку наливают 5 мл 0.0025%-ного раствора рибофлавина в воде, добавляют 3 мл концентрированной соляной кислоты и опускают зёрнышко металлического цинка. Начинается бурное выделение пузырьков водорода и жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет. Затем окраска начинает бледнеть и жидкость обесцвечивается (если жидкость остается розовой, то следует прибавить новую порцию металлического цинка). При стоянии в верхнем слое жидкости появляется желтое окрашивание вследствие окисления лейкофлавина кислородом воздуха в рибофлавин.

3. Качественные реакции на никотиновую кислоту (витамин B₃)

А) С ацетатом меди (II)

Выполнение работы. В пробирку насыпают 5–10 мг никотиновой кислоты (на кончике скальпеля) и растворяют при нагревании в 10 мл 10%-ного раствора уксусной кислоты. К нагретому до кипения раствору добавляют равный объем 5%-ного раствора ацетата меди (II). Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

Б) С гидросульфитом натрия

Выполнение работы. В пробирку вносят 100 мг витамина PP, приливают 10 мл 5%-ного раствора гидрокарбоната натрия, перемешивают и добавляют 10 мл свежеприготовленного 5%-ного раствора гидросуль-

^{*} Можно использовать изобутиловый или изоамиловый спирт.

фита натрия. Витамин РР восстанавливается и образуется соединение, окрашенное в желтый цвет.

4. Качественная реакция на пиридоксин (витамин В₆) — феррихлоридная проба

Выполнение работы. В пробирку наливают 1 мл 1%-ного раствора пиридоксина и добавляют 1 мл 1%-ного раствора хлорного железа (III). Жидкость приобретает красную окраску вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа. Приведите уравнение реакции.

5. Качественные реакции на аскорбиновую кислоту (витамин С)

А) С нитратом серебра

Выполнение работы. В пробирку наливают 1 мл 0.05%-ного раствора аскорбиновой кислоты и 1 мл 1%-ного раствора нитрата серебра. Выпадает осадок металлического серебра. В отличие от углеводов аскорбиновая кислота восстанавливает серебро без добавления щёлочи. Приведите уравнение реакции.

Б) С железосинеродистым калием

Аскорбиновая кислота с феррицианидом калия в присутствии разведенной хлороводородной кислоты окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты с образованием железистосинеродистой кислоты. В присутствии раствора хлорида железа (III) она образует берлинскую лазурь, окрашивающую раствор в синий цвет.

Выполнение работы. В две пробирки наливают по 1–2 мл 2%-ного раствора железосинеродистого калия, по 1 мл 10%-ной соляной кислоты и по 1 мл 1%-ного раствора хлорида железа (III). В первую пробирку добавляют 5 мл 0.05%-ного раствора аскорбиновой кислоты (или капустного сока, содержащего аскорбиновую кислоту*), а во вторую — столько же дистиллированной воды. Жидкость в первой пробирке приобретает зеленовато-синюю окраску и выпадает синий раствор берлинской лазури. Во второй пробирке зеленовато-бурая окраска жидкости остаётся без изменения.

* При проведении опыта по обнаружению витамина С в капустном соке рекомендуется применять более концентрированный — 45%-ный раствор железосинеродистого калия.

*6. Качественные реакции на рутин
(витаминоподобное соединение группы Р)*

А) С железосинеродистым калием

Выполнение работы. В пробирку наливают 1–2 мл насыщенного водного раствора рутина и прибавляют к нему несколько капель 1%-ного раствора хлорида железа (III). Возникает зелёное окрашивание вследствие образования комплексного соединения хлорида железа (III) с рутином. Приведите уравнение реакции.

Б) С концентрированной серной кислотой

Выполнение работы. В пробирку вносят 1–2 мл насыщенного водного раствора рутина и осторожно по стенке пробирки добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей возникает окрашенное в жёлтый цвет кольцо. Это объясняется тем, что концентрированная серная кислота образует с флавонами и флавонолами оксониевые соли, растворы которых характеризуются ярко-жёлтой окраской. Приведите уравнение реакции.

7.2.3 Контрольная задача

Выполнение работы.

1. Получить у преподавателя или лаборанта набор пробирок с неизвестными растворами.
2. Определить с помощью качественных реакций, какие витамины находятся в этих пробирках
3. Результаты работы записать в таблицу:

<i>№ пробирки</i>	<i>H₂O</i>	<i>Цветные реакции на витамины</i>							
		<i>B₁</i>	<i>B₂</i>	<i>B₃</i>	<i>B₆</i>	<i>C</i>	<i>A</i>	<i>D</i>	<i>E</i>
1									
2									
3									

3. Какие витамины можно идентифицировать посредством комплексообразования с ионом Fe^{+3} ? Приведите схемы реакций.

4. Какой витамин идентифицируют посредством комплексообразования с ионом Cu^{+2} ? Приведите схему реакции.

5. Какой витамин теряет окраску в процессе восстановления? Приведите схему реакции.

6. Какой витамин в процессе восстановления анилином превращается в окрашенное вещество? Приведите схему реакции.

7. Какой витамин превращается в окрашенную хиноидную структуру под действием окислителей? Приведите схему реакции.

8. Почему ретиналь — продукт окисления ретинола — окрашен, а ретинол — бесцветное вещество? Приведите схему образования ретиналя.

9. Почему при взаимодействии нитрата серебра с аскорбиновой кислотой образуется серебро? Приведите схему реакции.

8. ФЕРМЕНТЫ: КАЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СВОЙСТВ

8.1. Вопросы для актуализации знаний по теме «Ферменты»

1. Что такое ферменты?
2. Какие специфические свойства отличают ферменты от обычных катализаторов?
3. Почему большинство ферментов являются глобулярными белками, какими свойствами они обладают?
4. Каково принципиальное различие простых и сложных ферментов? Приведите примеры простых и сложных ферментов.
5. Какие функциональные участки выделяют в составе молекул ферментов? Каковы их функции?
6. Какие вещества выступают в роли небелковых компонентов сложных ферментов?
7. Дайте определение понятиям «витамин», «кофермент», «протетическая группа», «кофактор». Как они соотносятся между собой? Каковы их функции?
8. Приведите примеры коферментов и назовите входящие в их состав витамины.
9. Дайте определение субстратному центру фермента, каковы особенности его строения?
10. Дайте определение каталитическому центру фермента, каковы особенности его строения?
11. Дайте определение аллостерическому центру фермента, каковы особенности его строения?
12. Охарактеризуйте каталитическую активность ферментов? В каких единицах она выражается?
13. Назовите количественные показатели активности фермента?
14. Как изменяется активность ферментов в зависимости от температуры и pH среды?
15. Охарактеризуйте специфичность действия ферментов. Какие виды специфичности проявляют ферменты?
16. Какая зона фермента определяет специфичность его действия?
17. От каких факторов зависит активность фермента?

18. Что такое термолабильность?
19. Каковы оптимальные значения pH для работы ферментов человека?
20. Как ферменты влияют на маршрут реакции?
21. Охарактеризуйте стадии ферментативного катализа. Что является главным условием осуществления каталитического акта?
22. Какие теории образования фермент-субстратных комплексов вы знаете?
23. Как осуществляется регуляция активности ферментов?
24. Что такое активаторы и ингибиторы ферментов?
25. Какие правила лежат в основе номенклатуры ферментов?
26. Перечислите все известные классы ферментов. Какой принцип положен в основу классификации ферментов?
27. Приведите примеры ферментов, содержащих в качестве коферментов витамины?
28. Какие ферменты катализируют окислительно-восстановительные реакции?
29. Какие подклассы оксидоредуктаз известны? Дайте им краткую характеристику.
30. Что означают термины «первичная» и «вторичная» дегидрогеназы?
31. Приведите механизм действия кофермента НАД⁺ и простетической группы ФАД.
32. Какова структура гидролитических ферментов? На какие подгруппы они делятся в зависимости от типа субстрата, на который действуют?
33. Приведите примеры реакций катализируемых пептидазами, эстеразами, гликозидазами.
34. Какие ферменты относятся к классу трансфераз?
35. Охарактеризуйте основные подклассы трансфераз. Приведите примеры реакций.
36. Какие трансферазы являются сложными белками? Какие кофакторы и витамины обеспечивают их каталитическую активность?
37. Какой кофактор содержат фосфотрансферазы? Какой биологический смысл имеют реакции фосфорилирования различных субстратов?
38. В чем отличие лиаз (синтаз) и лигаз (синтетаз)? Какие реакции катализируют данные классы ферментов?
39. Почему действие синтетаз требует распада молекулы АТФ?

40. Охарактеризуйте основные подклассы изомераз.
41. Какие классы ферментов не имеют коферментов?
42. Охарактеризуйте принцип разделения ферментов в клетке.
43. Что представляют собой иммобилизованные ферменты?
44. Охарактеризуйте основные направления применения ферментов.
45. Какова роль ферментов в медицине?

8.2. Экспериментальная работа: качественные реакции на ферменты

Реактивы и оборудование

1. Свежее коровье молоко, метиленовый синий (0.01%-ный); клубень картофеля, насыщенный раствор тирозина; мышечная ткань (мясо, фарш), кровь, 2%-ный раствор сахарозы, 0.5%-ный раствор крахмала, раствор дрожжевой сахаразы, раствор амилазы слюны, 1%-ный раствор пепсина в 0.5%-ной соляной кислоте (или натуральный желудочный сок), 5%-ный раствор панкреатина, 5%-ный раствор мочевины, соевая мука.

2. 10%-ный раствор гидроксида натрия, карбонат кальция, 10%-ный раствор NaHCO_3 , 1%-ный раствор перекиси водорода, формальдегид (0.4%-ный), реактив «надь» (1%-ный раствор α -нафтола в спирте, 1%-ный водный раствор N,N-диметилпара-фенилендиамина, 1.5%-ный раствор Na_2CO_3 , янтарная кислота (3%-ный нейтрализованный раствор), яблочная кислота (3%-ный нейтрализованный раствор), метиленовый синий (0.02%-ный раствор), реактив Фелинга, 1%-ный раствор йода в йодистом калии, масло вазелиновое, 1%-ный раствор фенолфталеина, индикаторная бумага (универсальный индикатор или лакмус).

3. Водяные бани, термометры, бюретки, пипетки, пробирки, стеклянные палочки, штативы, держатели, фильтровальная бумага, вата.

Порядок выполнения работы

При подготовке к лабораторной работе следует изучить теоретический материал по теме «Ферменты» и выполнить задания для актуализации знаний, предложенные в методическом пособии. Перед выполнением экспериментальной работы необходимо подробно ознакомиться с предлагаемыми методиками проведения реакций и правилами техники безопасности.

Ход работы и результаты оформить в виде таблицы.

Лабораторная работа № 7

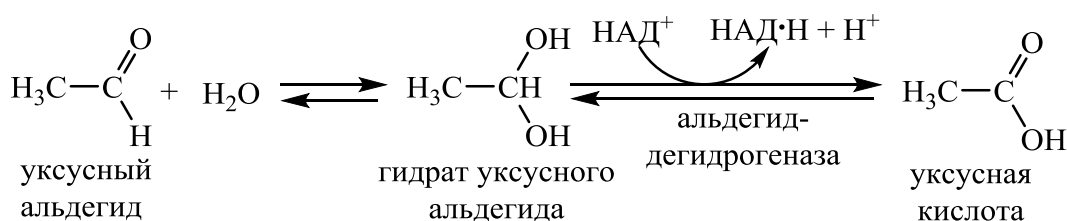
Качественные реакции на ферменты

№ опыта	Название реакции и её краткое описание	Уравнение реакции и условия её проведения	Наблюдения и объяснение

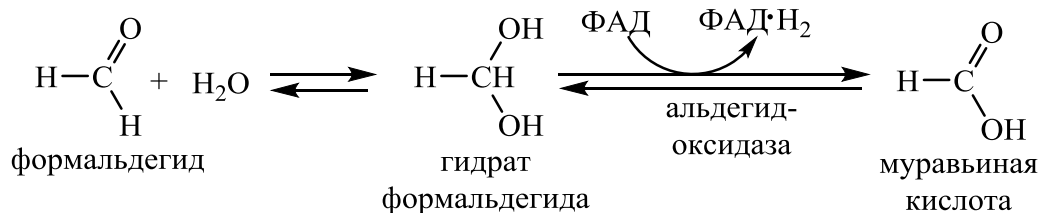
8.2.1. Обнаружение ферментов класса оксидоредуктаз и изучение их свойств

1. Обнаружение альдегидоксидазы в сыром молоке

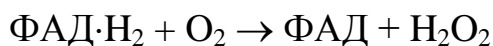
Наиболее распространённым путём окисления альдегидов в биологических объектах является их дегидрирование с участием НАД⁺(НАДФ⁺)-зависимых дегидрогеназ:



Значительно реже окисление альдегидов происходит под действием дегидрогеназ флавинового ряда (ФАД-зависимых дегидрогеназ). Один из таких ферментов — альдегидоксидаза — содержится в коровьем молоке. Альдегидоксидаза представляет собой металлофлавопротеин, коферментной группой которого является ФАД, связанный с атомом молибдена. Окисление формальдегида с участием альдегидоксидазы можно представить в виде следующей схемы:



Далее восстановленный флавопротеин отдаёт атомы водорода кислороду воздуха с образованием перекиси водорода.



Для обнаружения действия оксидоредуктаз используют вещества, способные легко принимать атомы водорода в условиях окислительно-восстановительной реакции (промежуточные акцепторы водорода). В таком качестве особенно интересны некоторые красители, которые, присоединяя водород, обесцвечиваются. Например, метиленовый синий, принимая атомы водорода, снятые с субстрата оксидазой, переходят в бесцветное соединение (лейкоформу). При взбалтывании на воздухе бесцветная лейкоформа метиленового синего отдаёт принятые атомы водорода кислороду воздуха (окисляется) и снова приобретает окраску.

Выполнение работы. В три пробирки наливают по 5 мл свежего молока. Одну пробу кипятят в течение 2–3 минут и охлаждают. В прокипячённую пробу (№ 1) и в одну из некипяченных проб (№ 2) добавляют по 1 мл 0.4%-ного раствора формальдегида, а в пробу № 3 — 1 мл воды. Во все три пробирки добавляют по 1 мл 0.01%-ного раствора метиленового синего. Содержимое хорошо перемешивают и доливают сверху 3–4 капли вазелинового масла, чтобы предохранить жидкость от соприкосновения с воздухом. Пробы помещают в водяную баню, нагретую до 40 °С. Через некоторое время (15–20 минут) обесцвечивается жидкость в той из некипяченных проб, в которую был добавлен раствор формальдегида.

Реакция обусловлена восстановлением метиленового синего в лейкоформу за счёт окисления формальдегида в муравьиную кислоту при каталитическом действии альдегидоксидазы молока.

Если затем бесцветный раствор метиленового синего встряхнуть на воздухе, то раствор вновь приобретает синий цвет, так как восстановленная форма отдаёт водород кислороду воздуха с образованием перекиси водорода.

Приведите уравнения реакций для описанных превращений. Объясните, почему не происходит обесцвечивание метиленового синего в прокипячённой пробе и некипячённой пробе (без добавления раствора формальдегида).

2. Обнаружение тирозиназы (полифенолоксидазы) в картофеле

Тирозиназа (полифенолоксидаза) относится к группе ферментов, окисляющих фенолы и родственные им соединения. Тирозиназа является медьсодержащим металлопротеином. Медь служит переносчиком электронов от субстрата на кислород воздуха. Тирозиназа содержится во многих растениях, грибах, а также в отдельных органах и тканях животных. Она в больших количествах присутствует в растительных тканях и

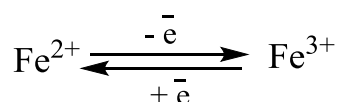
вызывает потемнение сорванных фруктов. У животных тирозиназа участвует в синтезе диоксифенилаланина (ДОФА) и в образовании чёрного пигмента кожи и волос — меланина.

Выполнение работы. Сырой картофель натирают на тёрке, отжимают через марлю и немедленно фильтруют. К нескольким каплям раствора тирозина добавляют 0.5 мл отфильтрованного экстракта из картофеля, встряхивают и ставят пробирку водяную баню, нагретую до 40°C. Время от времени пробирку встряхивают для лучшего соприкосновения жидкости в пробирке с воздухом. Окраска жидкости постепенно становится розово-красной, бурой и через 1–2 часа — чёрной.

Под влиянием фермента тирозиназы тирозин окисляется вначале до красного пигмента, а при дальнейшем окислении переходит в чёрный пигмент — меланин. Приведите соответствующие уравнения реакций.

3. Обнаружение цитохромов и цитохромоксидазы в мышечной ткани

Цитохромы — группа железосодержащих белков, участвующих в переносе электронов в дыхательной цепи ферментов. В состав цитохромов входят железопорфириновые простетические группы, подобные гемму. В ходе переноса электронов происходит обратимое изменение степени окисления содержащегося в цитохромах железа:



В митохондриях животных и растений обнаружено пять типов цитохромов: а, а₃, b, с, с₁. С кислородом реагируют лишь цитохромы а и а₃, входящие в структуру терминального фермента дыхательной цепи — цитохромоксидазы. Эти цитохромы обладают ферментативной активностью, в отличие от цитохромов b, с, с₁, которые выполняют лишь функцию переноса электронов дыхательной цепи. В присутствии кислорода воздуха система цитохромов и дыхательных ферментов катализирует окисление многих веществ (аминов, фенолов и др.).

Если на мышечную ткань, содержащую цитохромы и цитохромоксидазу, подействовать реактивом «надй»^{*} (α-нафтол и диметилпарафе-

^{*} *Приготовление реактива «надй».* Реактив «надй» (α-нафтол + N,N-диметилпара-фенилендиамин) нестойк, поэтому его готовят перед употреблением: смешивают 5 капель 1%-ного водного раствора N,N-диметилпара-фенилендиамина с 5 каплями 1%-ного спиртового раствора α-нафтола и 5 каплями 1.5%-ного раствора Na₂CO₃.

нилендиамин), то в присутствии кислорода воздуха произойдёт окисление реактива «надй» с образованием красителя синего цвета.

Выполнение работы. Около 100 мг промытой мышечной кашицы* помещают на кусочек фильтровальной бумаги и добавляют 1–2 капли реактива «надй». Через 3–5 минут появляется синее или зеленовато-синее окрашивание, обусловленное образованием красителя — индофенолового голубого.

Приведите уравнение реакции.

Другую часть промытой мышечной кашицы (около 100 мг) нагревают в пробирке на кипящей водяной бане в течение 5 минут, охлаждают и переносят на кусочек фильтровальной бумаги. При добавлении реактива «надй» окраска не появляется, так как фермент инактивирован при нагревании.

4. Обнаружение сукцинатдегидрогеназы в мышечной ткани и специфичность её действия

Сукцинатдегидрогеназа катализирует реакцию окисления янтарной кислоты в фумаровую; является флавопротеином, в молекуле которого с белком ковалентно связан ФАД, выполняющий в этой реакции роль акцептора водорода. Восстановленный флавопротеин передаёт снятые с янтарной кислоты электроны и протоны в дыхательную цепь.

В условиях опыта роль промежуточного акцептора водорода играет метиленовый синий, который далее отдаёт водород кислороду воздуха.

Приведите уравнения реакций, описывающих механизм действия ФАД в составе сукцинатдегидрогеназы, последующее восстановление метиленового-синего и транспорт протонов и электронов на кислород.

Выполнение работы. В три пронумерованные пробирки помещают по 3–4 мл мышечной кашицы и добавляют:

* *Приготовление мышечной кашицы.* Мясо (лучше от молодых животных) пропускают через мясорубку и многократно промывают при помешивании дистиллированной водой до тех пор, пока промывные воды не перестанут окрашиваться в розовый цвет от присутствующей в мышцах крови. Промытую и отжатую мышечную кашицу настаивают в течение часа в 0.9%-ном растворе поваренной соли. Для сохранения препарата к мышечной кашице прибавляют несколько капель толуола и помещают в холодильник.

– в первую пробирку — 0.5 мл 3%-ного раствора янтарной кислоты, нейтрализованной по лакмусу 10%-ным раствором гидроксида натрия;
– во вторую пробирку — 0.5 мл 3%-ного раствора яблочной кислоты, нейтрализованной по лакмусу 10%-ным раствором гидроксида натрия;

– в третью пробирку — 0.5 мл воды.

В каждую пробирку добавляют по 2–3 капли 0.02%-ного раствора метиленового синего (до окрашивания смеси в голубой цвет). Содержимое каждой пробирки перемешивают и пробирки одновременно помещают в водяную баню при температуре 37–40°C. Через 5–10 минут наблюдают обесцвечивание метиленового синего в первой пробирке. Первую пробирку после обесцвечивания сильно взбалтывают; вновь появляется синее окрашивание вследствие окисления лейкооснования метиленового синего ($MC \cdot H_2$) кислородом воздуха. О чём свидетельствует отсутствие обесцвечивания метиленового синего в пробирке с яблочной кислотой?

5. Разложение перекиси водорода каталазой крови

Каталаза обладает способностью разлагать перекись водорода на молекулярный кислород и воду. При этом одна молекула перекиси водорода окисляется и служит донором электронов, а другая восстанавливается и является акцептором электронов.

Приведите уравнение реакции.

Выполнение работы. В пробирку наливают 10–20 капель 1%-ного раствора перекиси водорода и добавляют 1 каплю крови. Происходит бурное выделение кислорода: жидкость вспенивается, и пена заполняет всю пробирку.

8.2.2. Обнаружение ферментов класса гидролаз и изучение их свойств

1. Дрожжевая сахараза

Сахараза (β -фруктофуранозидаза или инвертаза) является гидролитическим ферментом и относится к подклассу гликозидаз. Она действует на гликозидную связь в сахарозе, расщепляя её в присутствии воды с образованием глюкозы и фруктозы.

Приведите уравнение реакции.

Выполнение работы. В две пробирки наливают по 0.5 мл раствора дрожжевой сахаразы^{*}. Содержимое одной из них кипятят для разрушения фермента и охлаждают. Затем в обе пробирки добавляют по 3 мл 2%-ного раствора сахарозы и оставляют в водяной бане при температуре 40°C на 10–15 минут. По истечении указанного времени в обе пробирки добавляют по 2 мл раствора реактива Фелинга^{**} и нагревают до начала кипения. В пробирке, где фермент разрушен, осадка оксида меди (I) не появляется. В другой пробирке с активным ферментом образуется красный осадок оксида меди (I), что указывает на присутствие глюкозы.

Приведите уравнение реакции глюкозы с реактивом Фелинга.

2. Амилаза и мальтаза слюны

В слюне присутствуют два основных гидролитических фермента — амилаза слюны (птиолин) и мальтаза слюны. Оба фермента относятся к подклассу гликозидаз. Так, амилазы катализируют гидролиз α -1,4-гликозидных связей в полисахаридах (крахмал, гликоген и др.) и олигосахаридах с образованием в качестве конечного продукта мальтозы. Мальтаза катализирует гидролиз мальтозы до глюкозы. В процессе ступенчатого гидролиза молекулы крахмала под действием амилаз возникают в качестве промежуточных продуктов распада декстрины разной степени сложности. Протекание процесса гидролиза крахмала можно проследить по изменению окраски крахмала с йодом. Крахмал даёт с йодом синее окрашивание, растворимый крахмал — сине-фиолетовое, амилодекстрины — фиолетовое, эритродекстрины — от красно-бурого до красного, мальтоза и глюкоза не изменяют окраски йода.

^{*} *Приготовление дрожжевой сахаразы.* 100 г пекарских дрожжей тщательно растирают в ступке с пеком, наносят тонким слоем на стекло и высушивают на воздухе. Высушенные дрожжи растирают в порошок. Для извлечения сахаразы к полученному порошку приливают небольшими порциями 200 мл воды при постоянном перемешивании. Всю массу оставляют стоять в термостате при 25–30°C на 1–2 часа. Затем массу вновь растирают и полученную суспензию фильтруют через складчатый фильтр. Фильтрат содержит фермент сахаразу и может быть использован для опытов.

Для получения кристаллической сахаразы фильтрат упаривают в вакууме при 35°C до небольшого объёма и выливают в пятикратный объём ацетона, перемешивают и через несколько минут центрифугируют. Образующийся осадок высушивают при температуре 38°C и растирают в ступке в порошок. Сахараза длительно сохраняется, если к порошку добавить кристаллик тимола в качестве антисептика.

^{**} Реактив Фелинга представляет собой комплексное соединение меди (II) с калиево-натриевой солью винной кислоты.

Приведите уравнения, описывающие ступенчатый гидролиз крахмала в присутствии амилазы и мальтазы. Назовите промежуточные и конечные продукты.

А) Гидролиз крахмала под действием амилазы слюны.

Выполнение работы. В пробирку наливают 5 мл крахмального клейстера и 5 мл раствора слюны*. В 5 пробирок наливают по 2–3 мл дистиллированной воды и прибавляют по 1 капле 1%-ного раствора йода в йодистом калии. Пробирку с клейстером и ферментом помещают в водяную баню при 40 °С. Через несколько секунд наблюдают уменьшение опалесценции жидкости в пробирке со слюной вследствие образования растворимого крахмала.

Через одну минуту с момента нагревания отбирают с помощью стеклянной палочки пробу и вносят её в пробирку с раствором йода. Повторяют подобное исследование действия фермента через 2, 4, 6, 10 минут. Окраска проб с йодом меняется от синей к сине-фиолетовой, буро-красной и, наконец, жёлтой.

После этого к оставшейся жидкости в пробирке добавляют 1–2 мл раствора реактива Фелинга и смесь нагревают в пламени спиртовки до начала кипения. Образуется красный осадок оксида меди (I). Восстановление гидроксида меди (II) в оксид меди (I) производится образовавшейся мальтозой и глюкозой, а также низкомолекулярными декстринами.

Напишите уравнение реакции мальтозы с реактивом Фелинга.

Б) Специфичность действия амилазы и сахаразы

Выполнение работы. Нумеруют четыре пробирки. В первую и вторую пробирки наливают по 2 мл раствора крахмала, в третью и четвертую пробирки — по 2–3 мл раствора сахарозы. Затем в первую и третью пробирки вносят по 0.5 мл раствора разбавленной слюны, а во вторую и четвертую пробирки — по 0.5 мл раствора дрожжевой сахаразы. Перемешивают содержимое пробирок и ставят пробирки на 10 мин в водяную баню, нагретую до 38–40°С. После реакции проводят пробу с раствором йода (в пробирках с крахмалом) и с реактивом Фелинга (в пробирках с сахарозой).

Последовательно опишите полученные результаты, приведите уравнения реакций, сделайте вывод о специфичности действия амилазы и сахаразы.

* *Приготовление разбавленной слюны.* Ополаскивают два раза рот, чтобы удалить остатки пищи. Отмеряют цилиндром 20 мл дистиллированной воды, сливают её в стакан и ополаскивают ею рот в течение 1–2 минут. Затем сплёвывают жидкость в другой стакан или колбу. Собранную жидкость фильтруют через вату и фильтрат употребляют для работы.

3. Пепсин

Фермент пепсин является гидролитическим ферментом и катализирует гидролиз пептидных связей. Пепсин выделяется в полость желудка в виде профермента — пепсиногена и на первом этапе активируется соляной кислотой, а затем аутокаталитически, то есть при действии пепсина на пепсиноген. Соляная кислота создаёт оптимальные условия среды для действия пепсина (рН 1.5–2.5) и вызывает набухание белка. Пепсин гидролизует пептидные связи в молекулах белков со стороны аминогрупп остатков ароматических аминокислот (фен, тир, три) и моноаминодикарбоновых кислот (асп, глу).

А) Створаживание молока пепсином желудочного сока

Выполнение работы. К 5 каплям активного желудочного сока добавляют небольшое количество мелко истолчённого карбоната кальция до нейтральной реакции на лакмус; жидкость фильтруют. Часть фильтрата кипятят и охлаждают. В две пробирки наливают по 1 мл свежего молока. В одну из пробирок добавляют 2–3 капли нейтрализованного желудочного сока, в другую — 2–3 капли прокипячённого нейтрализованного желудочного сока. Обе пробирки помещают в водяную баню при температуре 40°C и следят за наступлением створаживания молока. Створаживание наступает только в той пробирке, в которой присутствует непрокипячённый фермент, субстрат и ионы кальция.

Створаживание молока обусловлено способностью пепсина путём частичного протеолиза превращать казеиноген молока в казеин, кальциевая соль которого нерастворима в воде.

Б) Гидролиз белка в присутствии пепсина

Гидролитическую активность пепсина можно наблюдать при действии подкисленного раствора пепсина на белок фибрин. Фибрин, нерастворимый в воде, под влиянием пепсина постепенно растворяется — происходит ферментативный гидролиз фибрина до растворимых в воде пептидов (альбумоз и пептонов), способных давать биуретовую реакцию.

После кипячения (разрушения фермента) или нейтрализации соляной кислоты желудочный сок теряет способность расщеплять фибрин, так как ни соляная кислота ни пепсин порознь не производят расщепление белка.

Выполнение работы. В три пробирки наливают по 1 мл активного желудочного сока (или 1%-ного раствора пепсина в 0.5%-ной соляной кислоте). Содержимое первой пробирки кипятят 2–3 минуты и охлаждают в стакане с холодной водой. Содержимое второй пробирки нейтрализуют раствором соды до слабощелочной реакции на лакмус (1–

2 капли 10%-ного раствора NaHCO_3). Третью пробирку оставляют без изменения.

Во все три пробирки добавляют по маленькому кусочку фибрина и ставят в водяную баню при температуре 38°C . Через 15–20 минут пробирки вынимают и встряхивают. Отмечают видимые изменения фибрина (растворение, набухание) и проводят биуретовую реакцию.

Положительная биуретовая реакция с красным оттенком получается только в той пробирке, где присутствуют пепсин, соляная кислота и фибрин.

Приведите уравнение ферментативного гидролиза белковой молекулы и реакцию образования пептонами биуретового комплекса.

4. Гидролиз жира молока в присутствии липазы

Липаза относится к классу гидролаз и ускоряет гидролиз нейтральных жиров. Липаза содержится в соке поджелудочной железы. Липазу можно обнаружить, добавив её раствор к молоку, содержащему эмульгированный жир. Полученную смесь подщелачивают раствором карбоната натрия до бледно-розовой окраски на фенолфталеин. В присутствии липазы происходит гидролитическое расщепление жира на глицерин и высшие жирные кислоты, реакция среды сдвигается в кислую сторону, розовая окраска исчезает.

Выполнение работы. В две пробирки наливают по 1 мл молока. В первую пробирку добавляют 5 капель раствора панкреатина или вытяжки из поджелудочной железы, содержащие липазы. Во вторую добавляют такое же количество воды. В обе пробирки добавляют по одной капле 1%-ного раствора фенолфталеина и по каплям 1.5%-ный раствор карбоната натрия.

Пробирки помещают в водяную баню при температуре 38°C на 30 минут. Наблюдают изменение окраски в пробирке, содержащей липазу.

Приведите уравнение ферментативного гидролиза любого известного Вам нейтрального жира.

5. Гидролиз мочевины в присутствии уреазы

Уреаза (карбамидамилогидролаза) в значительных количествах содержится в соевой муке и обладает абсолютной специфичностью: она ускоряет гидролиз мочевины (карбамида) на аммиак и углекислый газ.

Выполнение работы. В пробирку наливают 3 мл 5%-ного водного раствора мочевины и добавляют 1 г соевой муки. В отверстие пробирки вставляют полоску влажной индикаторной бумаги (лакмус или универ-

сальный индикатор) и оставляют на некоторое время в штативе. Через несколько минут индикаторная бумага синее от выделяющегося аммиака, который можно обнаружить и по запаху

Приведите уравнение соответствующей реакции.

8.2.3. Вопросы и задания для самоконтроля

1. С помощью каких качественных реакций можно отличить раствор фермента рибонуклеазы от раствора глюкозы?
2. Приведите шесть уравнений биохимических превращений, катализируемых ферментами — представителями разных классов.
3. Предложите химический метод, позволяющий отличить витамин В₁ от кофермента тиаминпирофосфата (ТПФ).
4. Предложите химический метод, позволяющий отличить тиаминпирофосфат от пиридоксальфосфата.
5. Предложите химический метод, позволяющий отличить рибофлавин от флавиномононуклеотида.
6. В каком случае и в составе какого фермента ФАД выступает в качестве первичной дегидрогеназы? Какого типа специфичность действия проявляет этот фермент?
7. Какие коферменты принимают участие в пируватдегидрогеназной реакции и какие витамины необходимы для их образования?

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Биохимия / под ред. Е. С. Северина. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004.
2. Северин Е. С., Алейникова Т. Л., Осипов Е. В. Биологическая химия. М.: Медицина, 2000. (<http://biochemistry.vov.ru/pages/materials.htm>)
3. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. М.: Медицина, 2004. (<http://www.xumuk.ru/biologhim/>)
4. Комов В. П., Шведова В. Н. Биохимия. М.: Дрофа, 2004.
5. Биологическая химия / В. К. Кухта и др. М.; Минск: Бином, Асар, 2008.
6. Новикова Т. А., Остроглазов Е. С., Ефремова И. Е. Белковые аминокислоты: качественное определение, электрофорез и хроматография: методическая разработка. СПб.: ООО «Копи-Р Групп». 2012. 41 с.
7. Ефремова И. Е., Новикова Т. А., Остроглазов Е. С. Пептиды и белки: учебное пособие. 2-е изд. СПб.: Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена. 2013. 59 с.
8. Ефремова И. Е., Новикова Т. А., Остроглазов Е. С. Углеводы: учебное пособие. 2-е изд. СПб.: Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена, 2014. 70 с.
9. Новикова Т. А., Остроглазов Е. С., Ефремова И. Е. Липиды: учебное пособие. СПб.: Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена, 2013. 55 с.
10. Новикова Т. А., Ефремова И. Е., Остроглазов Е. С. Нуклеиновые кислоты: учебное пособие. СПб.: Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена, 2015. 87 с.
11. Новикова Т. А., Остроглазов Е. С., Ефремова И. Е., Байчурин Р. И. Витамины: учебное пособие. — СПб.: ООО «Р-КОПИ», 2016. — 48 с.
12. Остроглазов Е. С., Новикова Т. А., Ефремова И. Е. Ферменты: учебное пособие. СПб.: Астерион. 2017. — 76 с.
13. Группа ВКонтакте «Биохимия в РГПУ»: <http://vk.com/im#/club6696990>

Остроглядов Евгений Сергеевич
Новикова Тамара Александровна
Ефремова Ирина Евгеньевна

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ
ПО БИОХИМИИ

Учебное пособие

Корректурa Л. Г. Савельевой
Верстка Л. А. Овчинниковой

Подписано в печать 15.11.2018. Формат 60 × 84¹/₁₆.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Объем 5,0 уч.-изд. л.
5,0 усл. печ. л. Тираж 500 экз. Заказ № 582к
Издательство РГПУ им. А. И. Герцена.
191186, С.-Петербург, наб. р. Мойки, 48

Типография РГПУ. 191186, С.-Петербург, наб. р. Мойки, 48