

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА  
ИМЕНИ МИРЗО УЛУТБЕКА**



# **ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ ПО БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

**Ташкент-2011**

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА  
ИМЕНИ МИРЗО УЛУГБЕКА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ  
КАФЕДРА “ХИМИЯ ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ”

Далимов Д.Н., Хаитбаев А.Х.

# **ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ ПО БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

**(для бакалавров)**

Ташкент - 2011

## ВВЕДЕНИЕ

Настоящий лабораторный практикум по курсу биоорганической химии для бакалавров разработан на основе утвержденной рабочей программы, Ученым советом химического факультета НУУз от 2009 г 27-августа (№1).

Лабораторные работы по курсу биоорганической химии имеют целью практическое усвоение студентами научно-теоретических положений данного курса, овладение ими техники экспериментальных исследований и анализа полученных результатов, привитие навыков работы с лабораторным оборудованием, контрольно-измерительными приборами и вычислительной техникой.

При выполнении лабораторных работ студенты должны научиться безопасным приемам обращения с химическими реактивами, приборами и посудой, приобрести навыки исследования свойств высокомолекулярных природных соединений (белков, нуклеиновых кислот, углеводов, жиров и липидов, а также их составляющих), приобрести навыки работы со справочной и научной литературой.

В лабораторном практикуме приведены общие положения правил техники безопасности при работе в лаборатории биоорганической химии, условия и аналитические эффекты качественных реакций на важнейшие классы природных соединений, а также перечислен необходимый минимум лабораторного оборудования и химической посуды. Практикум знакомит студентов с основными методами обнаружения и анализа (качественные реакции) высокомолекулярных биорегуляторов таких как нуклеиновые кислоты, белки (аминокислоты, пептиды), углеводы (моно- и олигосахара), липиды (непредельные и предельные карбоновые кислоты), ферменты (основы ферментативной кинетики, вычисление скорости субстратного гидролиза, скорости обратимого ингибирования).

Для более углубленного изучения курса биоорганической химии в практикум включены таблицы, схемы, рисунки, углубляющие знания основ данного предмета. Закреплению учебного материала способствуют приводимые после каждой темы вопросы и задачи для контроля знаний. Что позволяет студенту проверить степень усвоения изучаемого материала. Зачетные вопросы служат базой на основе которой кафедра строит контроль на занятии.

## ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ В ЛАБОРАТОРИИ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Лабораторные опыты по биоорганической химии проводятся с малыми количествами веществ, что снижает опасность работы и вероятность несчастных случаев, но не исключает их полностью.

Каждый работающий в лаборатории должен изучить инструкции по технике безопасности, разработанные на основе общих «Правил по

технике безопасности и производственной санитарии при работе в химических лабораториях учебных заведений». Кроме того, необходимо изучить правила пожарной безопасности и меры оказания первой помощи при несчастных случаях. Следует ознакомиться с имеющимися в лабораториях средствами пожаротушения и знать их местонахождение.

Перед началом работы в химической лаборатории каждый студент проходит инструктаж по технике безопасности, о чем нужно сделать запись в соответствующем журнале.

**Меры предосторожности при работе с пробирками.** Для опытов используют только сухие пробирки. Нагревание пробирок следует производить постепенно. При нагревании на открытом огне может произойти выбрасывание жидкости из пробирки, поэтому ее отверстие должно быть направлено в сторону от работающего и соседа. Особенно опасно попадание брызг жидкости в глаза, поэтому нельзя наклоняться над пробиркой и смотреть в ее открытое отверстие. При нагревании пробирку держат не в вертикальном, а наклонном положении — в этом случае брызги ударяются о стенки и остаются в пробирке. При нагревании пробирки ее следует непрерывно вращать и периодически осторожно встряхивать содержимое.

При работе с прибором, имеющим газоотводную трубку, нужно следить, чтобы конец этой трубки был погружен в жидкость, через которую побулькивает газ. Убирать горелку из-под пробирки с реакционной смесью можно только после удаления конца газоотводной трубки из жидкости. Если жидкость начинает подниматься по газоотводной трубке, то следует сразу опустить пробирку, чтобы уровень жидкости в ней стал, ниже конца газоотводной трубки, и продолжить нагревание, пока выделяющийся газ не вытолкнет жидкость из газоотводной трубки.

**Меры предосторожности при работе с легковоспламеняющимися жидкостями (ЛВЖ).** В зависимости от температуры вспышки ЛВЖ условно делятся на три группы: *особо опасные* (до 13°C), *постоянно опасные* (13-27°C) и *опасные* при повышенной температуре (27-66°C).

К особо опасным относятся ацетон, ацетальдегид, бензин, гексан, диэтиламин, диэтиловый эфир, петролейный эфир и др. К постоянно опасным ЛВЖ относятся бензол, гептан, диоксан, метанол, пиридин, этилацетат, этанол и др.; к опасным при повышенной температуре — бутанол, керосин, муравьиная кислота, пропанол, скипидар, уксусная кислота, уксусный ангидрид и др.

Все работы с ЛВЖ должны проводиться под тягой вдали от открытого огня. Нагревать ЛВЖ можно только на банях, заполненных соответствующими теплоносителями (водяных, песчаных). Диэтиловый эфир нагревают только с помощью горячей воды, предварительно нагретой

вдали от рабочего места. Во избежание отравления нельзя вдыхать пары ЛВЖ. Отходы ЛВЖ собирают в специальные емкости для слива.

При воспламенении ЛВЖ в каком-либо сосуде его следует быстро накрыть противопожарным одеялом. Если горящая жидкость разлилась, то ее тушат песком. В случае загорания одежды на человеке его быстро и плотно закутывают в противопожарное одеяло, пока пламя не погаснет.

**Меры предосторожности при работе с кислотами и щелочами.** Минеральные (хлороводородная, азотная, серная), а также сильные органические кислоты при попадании на кожу вызывают химические ожоги. Все работы с концентрированными кислотами и щелочами проводят в вытяжном шкафу.

Разбавлять концентрированные кислоты можно только в жаростойкой посуде путем приливания кислоты к воде, а **не наоборот!** Щелочи растворяют путем постепенного прибавления к воде небольших кусочков, которые следует брать пинцетом. Разлитые кислоты и щелочи засыпают песком и после этого производят уборку.

**Меры предосторожности при работе с металлическим натрием.** Металлический натрий воспламеняется при соприкосновении с водой. В лаборатории нарезанный кусочками натрий хранят под слоем керосина или вазелинового масла. Перед употреблением кусочки натрия «обсушивают» между листками фильтровальной бумаги и помещают только в сухую пробирку.

Работу с металлическим натрием проводят обязательно вдали от воды или брызгающих водопроводных кранов. Остатки натрия в пробирке уничтожают, растворяя их в спирте.

**Меры предосторожности при работе с токсичными веществами.** Большинство химических веществ в той или иной степени ядовиты. Меры предосторожности при работе с химическими веществами направлены на предотвращение случаев проникновения их в организм через рот, легкие или кожу. В производственной санитарии химические вещества характеризуют значениями *предельно допустимых концентраций* (ПДК) вредных веществ в воздухе рабочей зоны, т. е. такими концентрациями в воздухе, которые при ежедневной работе не могут вызвать заболеваний или отклонений в состоянии здоровья. Кроме этого, химические вещества делятся на 4 *класса опасности* (первый — наиболее опасные, четвертый — наименее опасные). Ниже приведен ряд широко распространенных органических веществ с указанием значений ПДК и обозначением их класса опасности.

Вещество	ПДК, мг/м <sup>3</sup>	Класс опасности	Вещество	ПДК, мг/м <sup>3</sup>	Класс опасности
Анилин	0,1	2	Пропанол	10	3
Ацетальдегид	5	3	Скипидар	300	4
Ацетон	200	4	Тетрагидрофуран	100	4
Бензальдегид	5	3			
Бензилхлорид	0,5	1	Тетрахлорметан	20	2
Бензол	5	2	Толуол	50	3
Бутанол	5	3	Триметиламин	5	2
Гидразин	0,1	1	Уксусная кислота	5	3
Диметиламин	1	2			
Диоксан	2	3	Фенол	0,3	2
Дихлорэтан	10	2	Формальдегид	0,5	2
Диэтиловый эфир	300	4	Хлорбензол	3	3
Метанол	5	3	Циклогексан	80	4
Муравьиная кислота	1	2	Этанол	1000	4
			Этилбромид	5	3
Нафталин	20	4	Этил ацетат	200	4
Пиридин	5	2			

Многие органические соединения — ароматические (анилин) и алифатические (диметиламин) амины, ароматические углеводороды (бензол, толуол), галогенопроизводные (хлорбензол, тетрахлорметан) — оказывают вредное воздействие, проникая через дыхательные пути и кожу. Необходимо осторожно обращаться с этими веществами, не вдыхать их пары, избегать попадания на руки. Если это все же произошло, то следует вымыть руки теплой водой с мылом, при вдыхании паров — немедленно выйти на свежий воздух.

Пары бензилхлорида и бензальдегида оказывают раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и верхних дыхательных путей. В качестве противоядия можно дать понюхать пострадавшему водный раствор аммиака слабой концентрации, затем вывести его на свежий воздух.

Этиленгликоль опасен при попадании внутрь. Он может всасываться и через кожу. Токсическое действие гидросиламина обусловлено способностью этого соединения вступать в организме в реакции, блокирующие некоторые ферментные системы.

При работе с вышеперечисленными, а также другими химическими веществами, используемыми при выполнении лабораторных опытов, необходимо соблюдать все меры предосторожности.

Категорически запрещается пробовать любые химические вещества на вкус. При случайном попадании токсичного вещества внутрь рекомендуется вызвать рвоту, давая пострадавшему большое количество

теплой воды с несколькими каплями нашатырного спирта. При первых симптомах отравления следует поставить в известность преподавателя, обратиться к врачу или вызвать скорую помощь.

**Меры оказания первой помощи при несчастных случаях.** При порезе рук стеклом надо, прежде всего, удалить пинцетом кусочки стекла из ранки. Затем смазать рану спиртовым раствором йода (или раствором Люголя) и наложить повязку. При небольшом ранении после обработки раствором йода ранку можно закрыть кусочком лейкопластыря или замазать клеем БФ-6.

Если кровотечение сразу не прекращается, то прикладывают кусочек кровоостанавливающей ваты. Ее можно изготовить в лаборатории, пропитав гигроскопическую вату 10% раствором хлорида железа (III) или 3% раствором пероксида водорода. При сильном кровотечении, связанном с ранением более крупных сосудов, надо временно перетянуть руку эластичным жгутом из резиновой трубки выше раны.

При термических ожогах нужно сразу же смочить обожженное место 5% раствором танина в 40% этиловом спирте. Лучше наложить небольшой компресс из ваты или марли, смоченной этим раствором.

При химических ожогах крепкими кислотами надо немедленно промыть пораженный участок водой, 1% раствором гидрокарбоната натрия (сода), а затем наложить компресс из ваты или марли, смоченной этим раствором. При ожогах крепкими щелочами нужно промыть пораженный участок водой и наложить компресс из ваты, смоченной 1% раствором уксусной кислоты.

Если кислота или щелочь попали в глаз, то следует его тщательно промыть водой, а затем либо 2% раствором гидрокарбоната натрия (для нейтрализации кислоты), либо 2% раствором борной кислоты (для нейтрализации щелочи). Для промывания рекомендуется пользоваться специальной глазной ванночкой.

При ожогах кожи бромом следует быстро смыть его спиртом и смазать пораженное место мазью от ожогов.

При ожогах горячими органическими жидкостями необходимо промыть обожженное место подходящим органическим растворителем (но не водой), чаще спиртом. При ожогах жидким фенолом следует растирать побелевший участок кожи глицерином, пока не восстановится нормальный цвет кожи, и наложить компресс из ваты, смоченной глицерином.

## СОСТАВЛЕНИЕ ОТЧЕТА ПО ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЕ

Каждый эксперимент, проведенный в лаборатории курса Биоорганической химии, должен быть запротоколирован в виде отчета. Отчет позволяет систематизировать исследования, сделать правильные выводы из экспериментов, найти ошибки и наметить пути их устранения, а также вести контроль и учет расходования реактивов, посуды и времени на постановку опыта.

### Примерная форма отчета по исследованию свойств аминокислот

#### О Т Ч Е Т по лабораторной работе\_(название) студента\_группы\_

1. Номер и название опыта.

##### *Опыт 1*

##### *Физическо-химические свойства аминокислот*

2. Методика проведения.

а) Аминокислота – белое кристаллическое вещество.

б) Очень хорошо растворяется в воде, плохо или вообще не растворяется в органических растворителях. Водный раствор аминокислотной кислоты (глицины) имеет нейтральную среду.

в) Так как все аминокислоты проявляют амфотерные свойства они взаимодействуют как с растворами кислот, так и могут взаимодействовать с растворами щелочей.

3. Аналитический эффект.

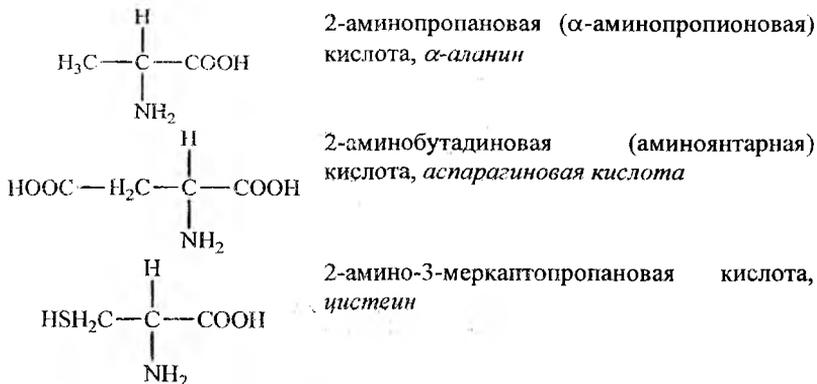
4. Результаты эксперимента (таблица).

5. Выводы по занятию.

6. Подпись студента (работа выполнена).

7. Подпись лаборанта о сдаче реактивов, посуды и рабочего места.

8. Подпись руководителя занятия (после защиты работы).



Тривиальные названия часто связаны с источниками выделения. Серин входит в состав фиброина шелка (от лат. *sericus* - шелковистый), тирозин впервые выделили из сыра (от греч. *tyros* - сыр), цистин из камней мочевого пузыря (от греч. *kystis* - пузырь) и т.д.

Значительно реже встречаются аминокислоты с  $\beta$  или  $\gamma$ -положением аминогрупп ( $\beta$ -аминопропионовая или  $\gamma$ -аминомасляная кислоты).

В зависимости от отдельных признаков аминокислоты классифицируют:

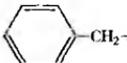
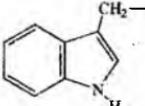
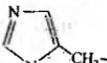
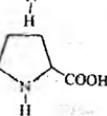
**1. По характеру углеводородного радикала:**

1 ациклические (алифатические);

2 циклические:

- *гомоциклические*;
- *гетероциклические* (табл. 2).

Таблица-2. Важнейшие α-аминокислоты

Строение - R	Название	Сокращенное название аминокислотного остатка
<i>Алифатические</i>		
H-	Глицин	Gly
CH <sub>3</sub> -	Аланин	Ala
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-	Валин	Val
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCH <sub>2</sub> -	Лейцин	Leu
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )-	Изолейцин	Ile
<i>Содержащие OH-группу</i>		
HO-CH <sub>2</sub> -	Серин	Ser
CH <sub>3</sub> -CH(OH)-	Треонин	Thr
<i>Содержащие COOH-группу</i>		
HOOC-CH <sub>2</sub> -	Аспарагиновая	Asp
HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	Глутаминовая	Glu
<i>Содержащие NH<sub>2</sub>CO-группу</i>		
NH <sub>2</sub> CO-CH <sub>2</sub> -	Аспарагин	Asn
NH <sub>2</sub> CO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	Глутамин	Gln
<i>Содержащие NH<sub>2</sub>-группу</i>		
NH <sub>2</sub> CO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -	Лизин	Lys
NH <sub>2</sub> -C(=NH)-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	Аргинин	Arg
<i>Серосодержащие</i>		
HS-CH <sub>2</sub> -	Цистеин	Cys
CH <sub>3</sub> -S-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	Метионин	Met
<i>Ароматические</i>		
	Фенилаланин	Phe
	Тирозин	Tyr
<i>Гетероциклические</i>		
	Триптофан	Trp
	Гистидин	His
	Пролин	Pro

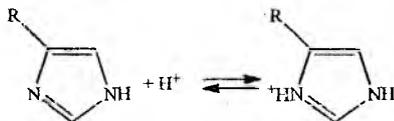
В водном растворе аминокислоты существуют в форме биполярного иона (*цвиттер-иона*):



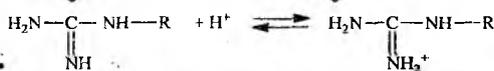
Положение равновесия определяется по pH среды. Общим свойством для аминокислот является преобладание катионных форм в сильнокислой среде и анионных - в щелочной.

Диссоциация других функциональных групп протекает согласно уравнениям:

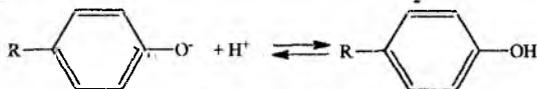
*Имидазольная*



*Гуанидиновая*



*Гидроксил  
тиразина*



*Сульфгидрильная*



Изменяя pH раствора, можно изменять заряд молекулы аминокислот. При определенном для каждой аминокислоты значении pH наступает такое состояние, при котором заряд аминокислоты становится нейтральным. Такое значение pH получило название *изоэлектрической точки (pI)*.

При значении pH равным изоэлектрической точке, аминокислоты не перемещаются в электрическом поле. При pH ниже изоэлектрической точки (pH < pI) катион аминокислоты движется к *катоду*, а при pH выше pI (pH > pI) анион аминокислоты движется к *аноду*.

На этих свойствах аминокислот основана возможность их разделения в *электрическом поле (электрофорез)*. Кислые аминокислоты имеют pI в слабокислой среде, основные - в слабощелочной, нейтральные - в нейтральной.

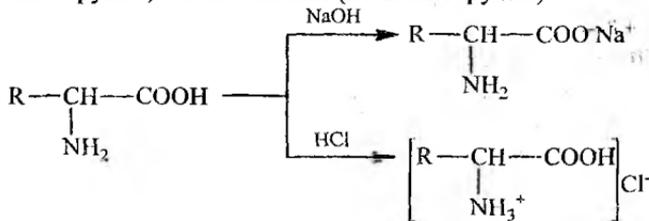
Биполярность молекул аминокислот обуславливает свойства указанных соединений: хорошую растворимость в воде и низкую растворимость в органических растворителях, высокие значения диэлектрической проницаемости, большие дипольные моменты молекул, высокие значения температур плавления (выше 200°C). Высокая растворимость в

воде является важным фактором обеспечения биологического функционирования аминокислот в организме: всасывание, транспорт и т.п.

## II. Химические свойства

### 1. Амфотерность

Амфотерность обусловлена наличием в молекуле двух функциональных групп, поэтому они образуют соли со щелочами (по карбоксильной группе) и с кислотами (по аминогруппе).



Аминокислоты, обладая амфотерными свойствами, могут играть роль буферной системы, реагируя, как слабая кислота:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{R}-\text{COO}^-]}{[\text{R}-\text{COOH}]}$$

где  $K_a$  - константа диссоциации кислоты; или как слабое основание

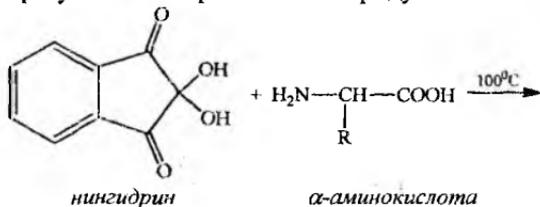
$$K_b = \frac{[\text{R}-\text{NH}_3^+][\text{OH}^-]}{[\text{R}-\text{NH}_2]}$$

где  $K_b$  - константа диссоциации основания.

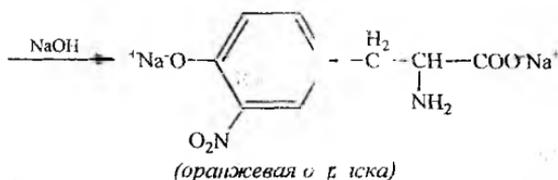
Следовательно, аминокислотная буферная система может обладать двумя областями pH с высокой буферной емкостью.

### 2. Качественные реакции

• **Реакция с нингидрином.** При нагревании аминокислот с нингидрином образуется сине-фиолетовый продукт:





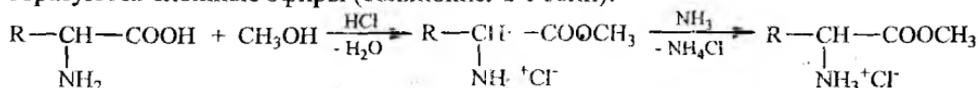


**• Реакция на отдельные аминокислоты:**

- триптофан с *n*-диметиламинобензальдегидом в среде концентрированной серной кислоты образует красно-фиолетовое кольцо (реакция Эрлиха)

- цистеин при нагревании с ацетатом свинца образует черный осадок

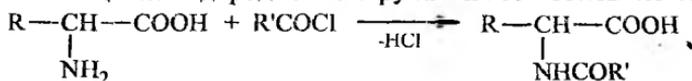
1. **Образование эфиров.** При этерификации соединений спиртами в присутствии кислотного катализатора (хлороводород) с хорошим выходом образуются сложные эфиры (солянокислые соли):



метильный эфир α-аминокислоты

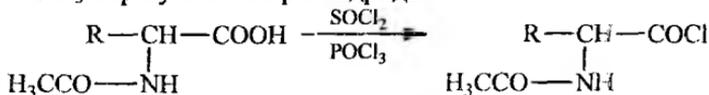
Сложные эфиры обладают высокой летучестью и могут быть выделены в чистом виде, что позволяет разделять смесь аминокислот (эфирный метод - Э.Фишер, 1901)

2. **Образование N-ацильных производных (защита аминогруппы).** При взаимодействии с галогенангидридами или ангидридами кислот происходит замещение водорода аминогруппы на остаток кислоты.

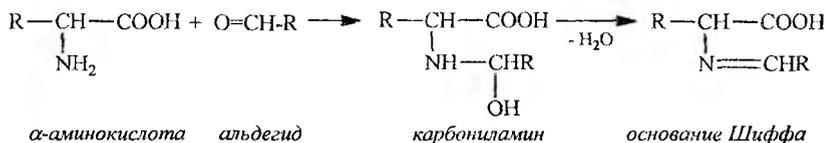


N-ацилпроизводные легко гидролизуются с образованием исходной аминокислоты, поэтому их используют для «защиты» аминогруппы.

3. **Образование галогенангидридов.** При действии на аминокислоты (с защищенной аминогруппой) тионилхлорида (SOCl<sub>2</sub>) или оксид трихлорида фосфора POCl<sub>3</sub> образуются хлорангидриды:

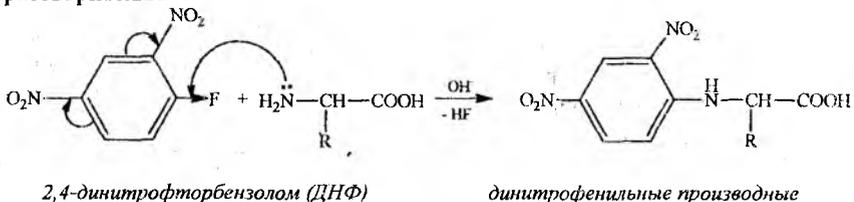


4. **Образование оснований Шиффа.** При взаимодействии с альдегидами образуются замещенные имины (основания Шиффа) через стадию получения карбиноламинов:



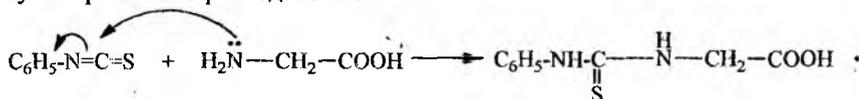
особое значение имеет реакция взаимодействия с формальдегидом (формальное титрование).

5. Образование ДНФ-производных (реакция Сенгера). Аминокислоты образуют с 2,4-динитрофторбензолом (ДНФ) окрашенные в желтый цвет динитрофенильные производные, растворимые в органических растворителях.



Реакция протекает по механизму нуклеофильного замещения в бензольном кольце

6. Образование ФТИГ-производных (реакция Эдмана). Взаимодействие аминокислот с фенилизотиоцианатом (ФТИГ) протекает по механизму нуклеофильного присоединения:



## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Реактивы*

1. Спирт для спиртовки
2. Соляная кислота (1:1)
3. Азотная кислота (конц.)
4. Серная кислота (10%-ный)
5. Уксусная кислота
6. Сульфат меди (10%-ный)
7. Нингидрин
8. Вода дистиллированная
9. Гидроксид натрия (6%-ный)
10. Гидрокарбонат натрия (5%-ный)
11. Водный раствор нитрата серебра (5%-ный)
12. Ацетат свинца (капельница)
13. Исследуемое вещество (глицин, аланин)

### *Посуда и приборы*

1. Пробирки
2. Спиртовка
3. Пипетка
4. Капельницы
5. Держатель
6. Фильтровальная бумага
7. Водяная баня
8. Индикаторная бумага
9. Штатив

### *Опыт 1*

#### *Физическо-химические свойства аминокислот*

а) Укажите агрегатное состояние, внешний вид аминокислоты.

б) Растворимость в воде, органических растворителях.

В пробирку поместите 0,05 г аминокислоты и прилейте 1-3 мл воды (органического растворителя - этилового спирта, ацетона, петролейного эфира). Смесь перемешайте стеклянной палочкой. Для водного раствора укажите pH среды (универсальная индикаторная бумага).

в) Отношение к кислотам и щелочам

В две пробирки поместите по 0,05 г аминокислоты и прилейте по 1-3 мл разбавленных соляной и уксусной кислот. Смесь перемешайте стеклянной палочкой. Отметьте изменения.

В пробирку поместите 0,05 г аминокислоты и прилейте 1-3 мл разбавленного раствора гидроксида натрия. Смесь перемешайте стеклянной палочкой. Укажите изменения.

г) Отношение к нагреванию.

В сухую пробирку поместите 0,05 г аминокислоты и осторожно нагревайте на пламени спиртовки. Укажите изменения.

Результаты оформите в виде таблицы-3.

Таблица-3

№	Аминокислота	Внешний вид	Растворимость в воде pH	Растворимость в органических	Отношение к кислоте	Отношение к щелочи	Отношение к нагреванию	Примечание
1								
2								
3								
4								

**Опыт 2****Химические свойства аминокислот**

а) К 1 мл (2%-ный) раствора аминокислоты прилейте 3-4 капли раствора ацетата свинца. *Аналитический эффект:*

б) К 1 мл (2%-ный) раствора аминокислоты прилейте 3-4 капли раствора нитрата серебра. *Аналитический эффект:*

в) К 1 мл (2%-ный) раствора аминокислоты прилейте 3-4 капли раствора сульфата меди, а затем избыток раствора. *Аналитический эффект:*

**Опыт 3****Качественные реакции**

**Буретовая реакция.** К 1 см<sup>3</sup> раствора аминокислоты добавьте 1 см<sup>3</sup> раствора едкого натра, затем по каплям добавляйте раствор сернистой меди.

*Аналитический эффект: раствор приобретает фиолетовый цвет.*

**Нингидриновая реакция.** К 3 см<sup>3</sup> раствора аминокислоты добавьте 1 см<sup>3</sup> свежеприготовленного 0,1% раствора нингидрина. Смесь нагрейте до кипения.

*Аналитический эффект - раствор приобретает синюю окраску.*

**Ксантопротеиновая реакция.** К 3 см<sup>3</sup> раствора аминокислоты осторожно добавьте 1 см<sup>3</sup> азотной кислоты (конц.). Затем нагрейте до

кипения. После охлаждения добавьте по каплям концентрированной раствор щелочи.

*Аналитический эффект: образование оранжево-красного окрашивания.*

**Вопросы и задачи для самостоятельной работы  
и для контроля знаний**

1. Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
2. Дайте определение и приведите классификацию аминокислот.
3. Перечислите протеиногенные аминокислоты.
4. Сформулируйте правила образования названия аминокислот.
5. Перечислите качественные реакции на аминокислоты (реактивы, условия проведения, аналитический эффект).
6. Укажите реакции аминокислот по карбоксильной группе, напишите уравнения реакций.
7. Укажите реакции аминокислот по аминогруппе, напишите уравнения реакций.
8. Какие элементы можно обнаружить в составе аминокислот?
9. Предложите схему синтеза аланина из этилового спирта. Для аминокислоты напишите уравнения реакций взаимодействия с гидроксидом натрия и соляной кислотой.
10. Сколько мл раствора NaOH (10%,  $\rho=1,1$  г/мл) потребуется для нейтрализации карбоксильной группы аминокислотной кислоты (глицина), полученной из 3,2 г карбида кальция?
11. Приведите строение структурных и пространственных изомеров аланина.
12. Охарактеризуйте кислотно-основные свойства  $\alpha$ -аминокислот.
13. Напишите схемы реакций образования двух типов солей  $\alpha$ -аминокислот.
14. Напишите схему реакции этерификации валина этанолом в присутствии хлороводорода. Какова роль хлороводорода в этой реакции?
15. Определите молярную концентрацию фенилаланина в водном растворе, если при взаимодействии 100 мл этого раствора с избытком нитрита натрия в кислой среде выделилось 56 мл газа при нормальных условиях.
16. Несмотря на большую летучесть эфиров аминокислот по сравнению с самими кислотами, эти эфиры не могут быть подвергнуты перегонке при атмосферном давлении, так как они при этом претерпевают химические превращения. Например, из метилового эфира валина при нагревании образуется вещество состава  $C_{10}H_{18}N_2O_2$ . Какое строение имеет этот продукт?
17. L-Глутаминовая кислота при нагревании превращается не в дигетопиперазин, образующийся обычно при нагревании  $\alpha$ -аминокислот, а в другое циклическое соединение, называемое пироглутаминовой кислотой. Напишите его структуру. Существуют ли стереоизомеры пироглутаминовой кислоты?
18. Для синтеза пантотеновой кислоты (витамин  $B_3$ ) необходим  $\beta$ -аланин (3-аминопропановая кислота). Из какой  $\alpha$ -аминокислоты путем декарбоксилирования образуется  $\beta$ -аланин? Почему при монодекарбоксилировании субстрата *in vitro* образуется  $\beta$ -аланин, а не  $\alpha$ -аланин?
19. Напишите схему реакции декарбоксилирования лизина *in vitro*. Какой диамин получается в результате этой реакции?

20. Какое соединение получится при действии азотистой кислотой на L-α-аланин. Напишите схему реакции и определите, обладает ли полученный продукт оптической активностью.
21. Напишите схему реакции дезаминирования фенилаланина *in vitro*. Назовите полученный продукт.
22. Какая гидроксикислота получается при взаимодействии L-аспарагиновой кислоты с азотистой кислотой? Напишите схему реакции.
23. Каким образом с помощью реакции дезаминирования *in vitro* можно различить растворы глицина и лизина равной концентрации? Напишите схему реакции дезаминирования лизина.
24. Почему водный раствор аспарагиновой кислоты изменяет окраску синей лакмусовой бумаги (зона перехода к красной окраске при pH=5), а водный раствор аспарагина - не изменяет?
25. Напишите схему реакции образования основания Шиффа при взаимодействии α-аланина с пиридоксальфосфатом. Какая из функциональных групп молекулы пиридоксальфосфата участвует в этой реакции?
26. Какая из функциональных групп молекулы серина участвует во взаимодействии с фенилизотионанатом? Напишите схему реакции и укажите, по какому механизму она протекает.
27. При длительном хранении водных растворов цистеина на воздухе выпадает осадок цистина. Напишите схему происходящей реакции.
28. Вычислите массу 15%-ного раствора аминокусусной кислоты, которую можно получить из 15 г уксусной кислоты двухстадийным синтезом с выходом продукта на каждой стадии, равным 75%.
29. К 150 г 5%-ного раствора аминокусусной кислоты добавили 100 г 5%-ного раствора гидроксида калия. Определите массовые доли веществ в полученном растворе.
30. Какие вещества и в каких количествах образуются при действии 50 мл соляной кислоты с концентрацией 3 моль/л на 14,6 г лизина?
31. Какие вещества и в каких количествах образуются при действии 85 мл раствора гидроксида калия с концентрацией 2 моль/л на 14,7 г глутаминовой кислоты?
32. Этиловый эфир глицина массой 2,06 г прокипятили с раствором, содержащим 1,50 г гидроксида калия, и полученный раствор выпарили. Рассчитайте массу сухого остатка.
33. Метилловый эфир аланина массой 3,09 г прокипятили с раствором, содержащим 2,10 г гидроксида калия, и полученный раствор выпарили. Рассчитайте массу сухого остатка.
34. 16,3 г смеси α-аминокислоты и первичного амина (молярное соотношение 3 : 1) могут прореагировать с 20 г 36,5%-ной соляной кислоты. Определите качественный и количественный (в граммах) состав смеси, если известно, что оба вещества содержат одинаковое число атомов углерода.
35. Смесь массой 32,2 г, состоящая из проиламина, аминокусусной кислоты и этилацетата, может прореагировать с хлороводородом объемом 4,93 л (н. у.). Та же смесь такой же массы может прореагировать с 200 мл 1,5 М раствора гидроксида калия. Вычислите массовые доли веществ в исходной смеси.

## *Лабораторная работа №2* **ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ПЕПТИДОВ**

### **Цель работы:**

1. Ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций пептидов;
2. Закрепить представления о структурах белковых молекул;
3. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
4. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
5. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

### **Реактивы**

1. Спиртовой раствор  $\alpha$ -нафтола
2. Этанол
3. Водный раствор белка 1 %
4. 3 % раствор яичного белка в 1 % растворе NaCl
5. Серная кислота (конц.)
6. Соляная кислота
7. Раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (1%-ный)
8. Раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (10%-ный)
9. Азотная кислота (конц.)
10. Раствор NaOH (10%-ный)
11. Раствор сульфата меди (10%-ный)
12. Раствор йода в KI
13. Раствор нитрата серебра
14. Раствор  $\text{CuSO}_4$  (0,1%-ный)
15. Раствор едкого натра (конц.)
16. Раствор  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
17. Раствор  $\text{NaNO}_2$
18. Раствор нингидрина (0,1%-ный)
19. Резорцин
20. Раствор сахарозы (10%-ный)
21. Раствор формальдегида
22. Раствор NaCl (3%-ный)
23. NaCl (тв.)
24. Раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (насыщ.)
25.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (тв.)
26. Раствор фенола (5%-ный)
27. Мочевина (тв.)
28. Сульфосалициловая кислота (20%-ный водный раствор)
29. Трихлоруксусная кислота (10%-ный водный раствор)
30. Лакмус (индикаторная бумажка)
31. Универсальная индикаторная бумага

### **Посуда и приборы**

1. Пробирка
2. Капельница
3. Держатель

4. Спиртовка
5. Водяная баня
6. Кристаллизатор со льдом
7. Стеклянная палочка
8. Микрощпатель
9. Часовое стекло

Пептиды и белки (или полипептиды) представляют собой соединения, построенные из остатков  $\alpha$ -аминокислот. Условно считают, что пептиды содержат в молекуле до 100 (соответствует молекулярной массе 10000), а белки свыше 100 аминокислотных остатков (молекулярная масса от 10000 до нескольких миллионов).

*Пептиды классифицируют на:*

- дипептиды, трипептиды содержат 2 или 3 аминокислотных остатка;
- олигопептиды (низкомолекулярные) содержат до 10 аминокислотных остатков;
- полипептиды.

*Белки* - это высокомолекулярные соединения, образующие при гидролизе  $\alpha$ -аминокислоты.

Иногда их называют *протеинами* (от греч. *protos* - первый, важнейший). Для живых существ белки являются основными компонентами и по содержанию и по значению. В организме у животных их содержится до 40-50 % и более на сухую массу, а у растений - до 20-35%.

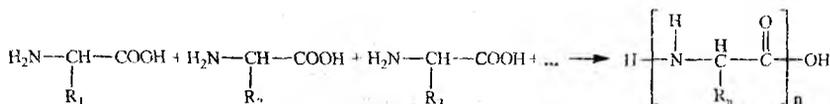
Белки как основа всего живого были издавна в центре внимания естественных наук. Более чем двухсотлетняя история химии белка наполнена непрерывным совершенствованием экспериментальных методов и богата различными идеями.

Среди ученых многих стран, внесших большой вклад в изучение белков, следует отметить Э.Фишера, Т.Курциуса, М.Бергмана, Ф.Сенгера, П.Эдмана, А.Я.Данилевского, Н.Д.Зелинского, А.С.Садикова, Д.Л.Талмуда и др.

В настоящее время достигнуты большие успехи в изучении структур белка, их функций, механизма участия в процессе метаболизма, понимании молекулярных основ патогенеза многих болезней.

*Белки* - сложные высокомолекулярные соединения, построенные из остатков  $\alpha$ -аминокислот, соединенных пептидными связями.

Пептидную молекулу формально можно представить как продукт поликонденсации  $\alpha$ -аминокислот, протекающий с образованием *пептидной (амидной)* связи между мономерными звеньями:



Элементный состав белков колеблется в пределах: С=50-52%, Н=6,8-7,7%; О=19-24%; N=15-18%; S=0,5-2%.

**Первичная структура** белков определяется последовательностью аминокислотных остатков в полипептидной цепи.

Первичная структура характеризует состав полипептидной цепи, количество аминокислотных остатков, связанных пептидными связями, порядок чередования этих остатков.

**Вторичная структура** - это упорядоченное пространственное расположение отдельных участков полипептидной цепи без учета типа и конформации боковых радикалов аминокислот. Стабилизация вторичной структуры происходит водородными связями. Атом кислорода каждой пептидной группы образует водородную связь с NH-группой. При этом формируются структуры: α-спираль, β-структура, β-изгиб. Часть полипептидной цепи не имеет упорядоченного строения, такие участки называют *аморфными* или *бесструктурными* областями.

**Третичная структура** характеризует пространственное расположение упорядоченных и аморфных участков полипептидной цепи, которое достигается за счет взаимодействия боковых радикалов и зависит от их типа и конформации.

**Четвертичная структура** характерна для белков, молекула которых состоит из двух или более полипептидных цепей, связанных нековалентно.

Под четвертичной структурой понимают способ взаимного расположения в пространстве отдельных полипептидных цепей в молекуле и характер связи между ними. Белки, обладающие четвертичной структурой, называют *олигомерными*.

Каждая отдельная полипептидная цепь в таком белке называется *протомером* или *субъединицей*.

### **Классификация белков**

#### **1. По строению:**

1. Простые (*протеины*) состоят только из остатков аминокислот.
2. Сложные (*протеиды*) при гидролизе образуют аминокислоты и другие соединения:

а) *нуклеопротеиды*: белок + нуклеиновая кислота, растворимы в щелочах, не растворимы в кислотах;

б) *фосфопротеиды*: белок + остаток фосфорной кислоты. Денатурируют при действии кислот (казеин молока);

в) *гликопротеиды*: белок + углевод. Не растворимы в воде, растворимы в щелочах, нейтральны (слизь);

г) *хромопротеиды*: белок + красящее вещество (гемоглобин)

### **II. По растворимости**

1. *Склеропротеины* - не растворимы в воде.

2. *Альбумины* - растворимы в воде.

3. *Глобулины* - растворимы в растворах солей.

4. *Глутамины* - растворимы в кислотах и щелочах.

5. *Глиадины* - растворимы в 70 %-ном этаноле.

6. *Гистоны и протамины* - растворимы в щелочах.

### **III. По форме**

1. *Глобулярные* имеют сложную конформацию: полипептидные цепи свернуты в компактные глобулы.

2. *Фибриллярные* имеют вытянутую, нитевидную форму и состоят из нескольких полипептидных цепей.

### **Функции белков**

1. *Структурные* (коллаген, фиброин, кератин и т.п.).

Входят в состав мембран клеток и отличаются высокой гидрофобностью. Составляют остов многих тканей и органов, определяют их механические свойства: *коллаген* соединительных тканей, костей, суставов; эластин связок,  *$\alpha$ -кератин* кожи, волос, ногтей, рогов, перьев, *склеротин* - наружного скелета насекомых, *фиброин* шелка. К этой группе можно отнести белковые вещества клеточных стенок бактерий, оболочек вирусов, мембранные и рибосомальные белки.

2. *Двигательные* (сократительные - *актин*, *миозин*).

Наиболее известны белки сократительного аппарата мышц - *актин* и *миозин*. Их разновидностью является *тубулин*, входящий в состав микротрубочек, обеспечивающих перемещение ресничек и жгутиков клетки.

3. *Каталитические* (ферментативные - *энзимы*).

Ежесекундно в клетке протекает множество ферментативных реакций. В настоящее время выделено около 2000 ферментов клетки. Особое значение имеют РНК- и ДНК-*полимеразы*, *липазы* и т.п. Ферменты могут быть построены из одной полипептидной цепи, нескольких цепей или даже образовывать комплексы. Ферменты увеличивают скорость реакции в миллионы и миллиарды раз. Например, уреазы при pH 8,0 и 20°C ускоряет гидролиз мочевины в  $10^{14}$  раз.

4. *Транспортные* (*гемоглобин*, *миоглобин*, *цитохром* и др.).

Ряд белков выполняет функции переноса веществ из одного компартмента клетки в другой или между органами целого организма.

Например, гемоглобин переносит кислород от легких к тканям, а углекислый газ от тканей к легким. В крови локализованы специальные транспортные белки - *альбумины*, переносящие различные экзогенные и эндогенные вещества. Имеются также специальные белки - *пермеазы*, переносящие различные вещества через биологические мембраны.

#### 5. Регуляторные (*гормоны-гистоны, репрессоры*).

В организме существует специальный класс белков, выполняющих регуляторные функции. В первую очередь к ним относятся *гормоны* белково-пептидной природы. Эти белки играют основную роль в регуляции клеточной и физиологической активности. Например, гормон *инсулин* регулирует потребление клетками глюкозы, *кальцитонин* - содержание кальция в крови и костной ткани и т.п.

#### 6. Защитные (*антитела и иммуноглобулины*).

Защитные белки включают вещества, которые помогают организму преодолевать патологические состояния или бороться с возбудителями заболеваний. Антитела и иммуноглобулины синтезируются в костном мозге и предохраняют организм от чужеродных бактерий. Они обладают уникальным свойством распознавать чужеродные бактерии, вирусы и белки, связываться с ними и нейтрализовывать их. Сюда относятся антигены тканевой совместимости, антивирусные факторы - *интерферон*, факторы некроза опухолей, а также *фибриноген*, *тромбин* и *фибрин*, предохраняющие организм от потери крови (обеспечивают свертываемость).

#### 7. Рецепторные (*родопсин, холинорецептор и т.п.*).

Играют важную роль при передаче нервного или гормонального сигнала в клетку или ее некоторые компартменты. Рецепторы локализованы в мембранах, и механизмы передачи информации связаны в основном с изменениями конформации белка, поглощением или выделением энергии и т.п.

#### 8. Запасные и питательные (*казеин молока, яичный альбумин и т.п.*).

Ряд белков используется клетками в качестве резервного, питательного материала. К ним относятся *проламини* и *глобулины* - белки растений, преимущественно зерновых, *овальбумин* - питательный белок птичьих яиц.

#### 9. Токсические (*токсины бактерий, насекомых и животных*).

Представлены ядами змей, скорпионов, пчел. Они характеризуются относительно низкой молярной массой. Токсины растений и микроорганизмов - дифтерийный и холерный токсины, *рицин*, *абрин* и т.п.

#### 10. Антибиотики (*актиноксантин, неопластин и т.п.*).

### **Свойства белков**

Устойчивость белков в биологических жидкостях организма человека обуславливают два фактора: заряд и водная оболочка - для гидрофильных белков и только заряд - для гидрофобных белков.

Для каждого белка характерна по крайней мере одна трехмерная структура, в которой он стабилен и проявляет биологическую активность при физиологических условиях (рН, температура). Эта структура называется *нативной конформацией белка*.

Для белков характерны следующие основные физико-химические свойства: высокая вязкость растворов, незначительная диффузия, способность к набуханию в больших пределах, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, низкое осмотическое давление и высокое осмотическое давление, способность к поглощению УФ лучей при 280 нанометрах ( $10^{-9}$  м). Например, осмотическое давление крови обусловлено присутствием белков и равно 0,02-0,04 атм, т.е. 30 мм рт.ст. Осмотическое давление определяет распределение воды и минеральных веществ между кровью и тканями.

Белки как и аминокислоты амфотерны. Благодаря наличию свободных амино- и карбоксильных групп. В зависимости от содержания функциональных групп они имеют различных заряд в растворах, перемещаясь к катоду или аноду. На этом основана их очистка методом *электрофореза*.

Молекулы белков не в состоянии проходить через полупроницаемые искусственные мембраны (пергамент, коллодий, целлофан), а также через биомембраны.

Белки относят к высокомолекулярным соединениям, их молекулярная масса колеблется от 6000 (нижний предел) до 1000000 и выше.

При изменении внешних условий белки теряют нативную структуру.

*Денатурация* - изменение уникальной структуры белковой молекулы, приводящее к потере характерных свойств (растворимости, электрофоретической подвижности, биологической активности и т.д.)

Наиболее ярким признаком денатурации является резкое снижение биологической активности, при этом разрушаются в основном невалентные водородные и дисульфидные связи и не затрагиваются пептидные связи.

При непродолжительном действии возможен возврат биологической активности, т.е. *ренатурация белка* с полным восстановлением исходной структуры и нативных свойств.

Область рН, в которой белки являются электронейтральными, называется *изоэлектрической точкой*. Изоэлектрическая точка большинства белков лежит в пределах 5,5-7,0. В изоэлектрической точке белки наименее устойчивы и легко выпадают в осадок, обладая наименьшей растворимостью.

Устойчивость белковой молекулы определяется наличием зарядов в полипептидной цепи, а также образованием гидратной оболочки. Отсутствие заряда и снятие гидратной оболочки приводит к сближению белковых молекул, в результате чего они слипаются, увеличиваются в размерах и выпадают в осадок под действием собственной силы тяжести. Это явление называется *коагуляцией*.

Коагуляция является обратимой, если после снятия действия реагента белок возвращается в исходное состояние. Если же изменения необратимы, то и коагуляция называется *необратимой*.

Примерами обратимой коагуляции является *высаливание*, т.е. осаждение белков растворами нейтральных солей (хлорида натрия, сульфата аммония). Такие соли нейтрализуют электрический заряд белка, разрушают его гидратную оболочку и белок выпадает в осадок. При добавлении к такому белку воды он снова переходит в растворенное состояние. Процесс, обратный коагуляции, называется *пептизацией*.

Необратимую коагуляцию (денатурацию) вызывает температура, соли тяжелых металлов, концентрированные неорганические кислоты.

При растворении белков в воде образуются *коллоидные растворы*, которые обладают низким осмотическим давлением: они непрозрачны, способны рассеивать свет (*эффект Тиндаля*), опалесцировать (в проходящем свете - розовые, в отраженном - голубые).

Для белков характерен ряд цветных реакций: биуретовая, ксантопротеиновая, Сакагучи и т.п.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Опыт 1

*Растворимость в воде, органических растворителях.* В пробирку поместите 0,2 мл яичного белка и прилейте 1,3 мл воды (органического растворителя - этилового спирта, ацетона, петролейного эфира). Смесь перемешайте стеклянной палочкой. Для водного раствора укажите pH среды (универсальная индикаторная бумага). Результаты оформите в виде таблицы-4.

Таблица-4

Растворитель	Вода дистиллированная	Этиловый спирт	Ацетон	Этилацетат	Петролейный эфир
Растворимость					

## Опыт 2

**Осаждение белков при нагревании.** В 5 пробирок налейте по 1 см<sup>3</sup> раствора белка:

а) 1 пробирку нагрейте;

*Аналитический эффект: помутнение раствора (опалесценция)*

б) во 2 добавьте 1-2 капли 1% раствора CH<sub>3</sub>COOH и пробирку нагрейте;

*Аналитический эффект: помутнение раствора, а затем выпадение белого осадка. (Белок теряет заряд и находится в изоэлектрическом состоянии)*

в) в 3 добавьте 1-2 капли 10% раствора CH<sub>3</sub>COOH и пробирку нагрейте;

*Аналитический эффект: осадок не образуется. (Белок изменяет заряд на положительный).*

г) в 4 добавьте 1-2 капли 10% раствора CH<sub>3</sub>COOH, каплю насыщенного раствора NaCl и пробирку нагрейте;

*Аналитический эффект: помутнение раствора, а затем выпадение белого осадка. (Белок теряет заряд и находится в изоэлектрическом состоянии).*

д) в 5 добавьте 1-2 капли 10% раствора NaOH и пробирку нагрейте.

*Аналитический эффект: осадок не образуется. (Положительный заряд на белке усиливается). Результаты опыта оформите в виде таблицы-5.*

Таблица-5

№ пробирки	Среда	Изменения	Выводы
1	Нейтральная		
2	Слабокислая (раствор 1% CH <sub>3</sub> COOH)		
3	Кислая (раствор 10% CH <sub>3</sub> COOH)		
4	Кислая (раствор 10% CH <sub>3</sub> COOH +NaCl)		
5	Щелочная (10% раствор NaOH)		

### Опыт 3

#### Осаждение белков химическими агентами.

3.1 При добавлении небольших количеств солей тяжелых металлов к раствору белка наблюдается осаждение белков, связанное с образованием комплексных соединений. В избытке соли в силу адсорбции металлов и появлению заряда белка осадок растворяется. Это явление называется *адсорбционной пептизацией*.

а) к раствору белка добавьте 2-3 капли раствора нитрата серебра;

*Аналитический эффект: выпадение осадка.*

б) к 1 см<sup>3</sup> раствора белка добавьте 3 капли раствора сульфата меди.

Затем добавьте еще 8 капель раствора сульфата меди;

*Аналитический эффект: образование осадка, который растворяется в избытке осадителя.*

3.2 Минеральные кислоты вызывают дегидратацию белковых частиц и образуют комплексные соли с белками. Осадок белка растворяется в избытке кислоты, за исключением азотной кислоты. Это позволяет использовать азотную кислоту при клинических исследованиях для количественного определения белков.

а) наклоняют по стенке пробирки 10 капель азотной кислоты и 5 капель раствора белка (не перемешивать. Осторожно, кислота!)

*Аналитический эффект: на границе двух жидкостей образуется осадок в виде белого кольца. При встряхивании и добавлении избытка азотной кислоты осадок не растворяется.*

б) наклоняют по стенке пробирки 10 капель серной кислоты и 5 капель раствора белка (не перемешивать. Осторожно, кислота!)

*Аналитический эффект: на границе двух жидкостей образуется осадок в виде белого кольца. При встряхивании и добавлении избытка серной кислоты осадок растворяется.*

3.3 Как и неорганические, так и органические кислоты (сульфосалициловая, трихлоруксусная и др.), вызывая дегидратацию, образуя комплексные соединения, денатурируют белки.

*Сульфосалициловая кислота* используется для обнаружения малых количеств белков в биологических жидкостях. Она осаждает белки и пептиды.

*Трихлоруксусная кислота (ТХУ)* осаждает только белки и очень часто используется для отделения белков от низкомолекулярных азотсодержащих соединений (аминокислот и пептидов.)

а) в пробирку помещают 6 капель раствора белка и добавляют 2 капли раствора сульфосалициловой кислоты;

*Аналитический эффект: выпадение осадка.*

б) в пробирку помещают 6 капель раствора белка и добавляют 2 капли раствора трихлоруксусной кислоты.

*Аналитический эффект: выпадение осадка.*

3.4 Фенол и мочеви́на образуют комплексные соли с белками, вызывая образование осадка.

а) к 1 см<sup>3</sup> раствора белка добавьте 3 капли водного раствора фенола;

*Аналитический эффект: образование осадка.*

б) к 1 см<sup>3</sup> раствора белка добавьте несколько кристаллов мочевины;

*Аналитический эффект: образование осадка.*

3.5 Танин, пикриновая кислота, растворы диоксида ртути в иодиде калия, фосфорновольфрамовая и фосфорномолибденовая кислоты взаимодействуют с группой веществ, содержащих пиррольные, индольные, имидазольные гетероциклы, несущие положительный заряд в слабокислой среде. Наличие подобных группировок в белках приводит к образованию осадков, при этом растворы надо подкислить. Протамины и гистоны осаждаются в нейтральной среде.

а) в пробирку поместите 5 капель раствора белка и прибавьте 1-2 капли раствора танина и 1-2 капли уксусной кислоты (1%-ный);

*Аналитический эффект: образование серого осадка.*

#### **Опыт 4**

*Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка методом высаливания (3%-ный раствор яичного белка в 1%-ном растворе NaCl).*

4.1 К 1 мл яичного белка прилейте 9 мл дистиллированной воды.

*Аналитический эффект: помутнение раствора (выпадение глобулинов).*

4.2 а) к 1 мл яичного белка добавьте поваренную соль до насыщения (пока соль перестанет растворяться).

*Аналитический эффект: выпадение белого аморфного осадка глобулинов.*

б) через 10 минут (время полного осаждения осадка) осадок отфильтруйте. Пробирку с фильтратом прокипятите.

*Аналитический эффект: выпадение яичного альбумина.*

4.3 а) к 1 мл яичного белка добавьте равный объем насыщенного раствора сульфата аммония.

*Аналитический эффект: образование осадка глобулинов.*

б) Осадок отфильтруйте и к фильтрату добавьте порошок сульфата аммония до насыщения.

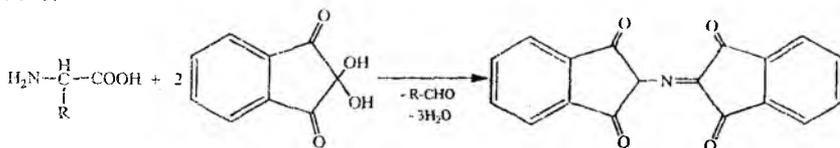
*Аналитический эффект: образование пены (яичный альбумин).*

Результаты опыта запишите в виде таблицы-б.



*Аналитический эффект: раствор приобретает синюю окраску.*

Эта реакция обусловлена наличием в составе белка аминокислоты, содержащей аминогруппу, которая реагирует с нингидрином по уравнению:



*аминокислота*

*нингидрин*

*пурпур Ружмана*

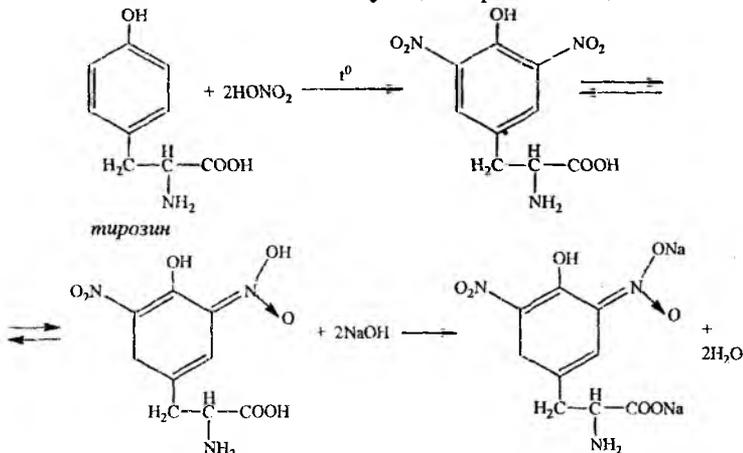
### **Опыт 7**

**Ксантопротеиновая реакция.** К 3 см<sup>3</sup> раствора белка осторожно добавьте 1 см<sup>3</sup> азотной кислоты (конц.). Затем нагрейте до кипения. После охлаждения добавьте по каплям концентрированный раствор щелочи.

*Аналитический эффект: образование оранжево-красного окрашивания.*

Ароматические аминокислоты (тирозин, триптофан, фенилаланин) под действием азотной кислоты нитруются с образованием желтого нитросоединения.

Реакция обусловлена образованием солей таутомерных ациформ нитроединений, образующихся после нитрования азотной кислотой ароматических аминокислот с последующей обработкой щелочью.



*Натриевая соль динитротирозина*

### Опыт 8

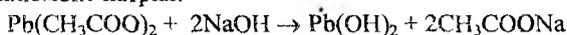
**Реакция с 5-оксиметилфурфуолом.** К 1 см<sup>3</sup> раствора белка прилейте 5 капель раствора сахарозы и осторожно добавьте 5 капель концентрированной серной кислоты.

*Аналитический эффект:* на границе двух слоев жидкостей появляется вишнево-красное окрашивание.

Окраска появляется вследствие реакции триптофана с оксиметилфурфуолом, образующимся при действии концентрированной серной кислоты на сахарозу.

### Опыт 9

**Реакция на серосодержащие аминокислоты.** 3 см<sup>3</sup> раствора белка прокипятите с 6 см<sup>3</sup> раствора едкого натра (обратите внимание на выделение аммиака). К 1 см<sup>3</sup> раствора ацетата свинца прилейте раствор едкого натра до полного растворения выпавшего осадка. При этом образуется пломбит натрия:



### Опыт 10

**Реакция Вуазена.** В пробирку внесите 2 см<sup>3</sup> раствора яичного белка и 1 каплю раствора формальдегида. К полученной смеси при охлаждении (лед) добавьте по каплям 6 см<sup>3</sup> серной кислоты (конц.). Через 10 мин внесите 10 капель раствора нитрита натрия.

*Аналитический эффект:* сине-фиолетовый цвет раствора.

Содержащийся в яичном белке триптофан, конденсируясь с формальдегидом, образует окрашенный продукт конденсации бис-2-триптофенилметан, который окисляется до бис-2-триптофенилкарбинола, образующего в кислой среде соль, окрашенную в фиолетовый цвет.

### Опыт 11

**Выделение казеина из молока.** В молоке содержится специфический белок казеин, содержащий фосфор. Содержание этого белка в молоке составляет 80% от общего числа белков. Казеин обладает кислотными свойствами и находится в молоке в виде растворимой кальциевой соли.

При подкислении белок выпадает в осадок в виде белых рыхлых хлопьев, которые легко отделяются при фильтровании.

### Ход работы

1. В стакан емкостью 50 мл приливают 3 мл молока, добавляют 7 мл дистиллированной воды и при интенсивном перемешивании вносят по каплям 1% раствор соляной кислоты (10-15 капель) до появления рыхлого осадка. Выдерживают смесь 5 мин, затем приливают 10 мл дистиллированной воды и выдерживают еще 5 мин. Жидкость над осадком осторожно сливают и вновь приливают 10 мл дистиллированной воды. Через 5 мин фильтруют смесь через бумажный фильтр.

2. Небольшое количество осадка с фильтра переносят в колбу, приливают 6 мл 10% раствора гидроксида натрия и кипятят на песчаной бане 1 час. Затем колбу охлаждают; приливают по каплям азотную кислоту (20-30 капель) до кислой реакции. При этом образуется осадок высокомолекулярных продуктов неполного гидролиза белка. Смесь фильтруют.

3. Фильтрат делят на 4 части: 1 - приливают раствор гидроксида натрия и 2-3 капли сульфата меди (биуретовая реакция); 2 - приливают 3-4 капли плюмбита натрия (см. опыт 9), 3-5 капель раствора нингидрина, 4-10 капель молибденовой жидкости и нагревают на спиртовке (для обнаружения фосфора в составе казеина). Полученные данные оформляют в виде таблицы-7.

Таблица-7

Реагент	Биуретовая реакция	Плюмбит натрия	Раствор нингидрина	Молибденовая жидкость
Аналитический эффект				

**Выводы:** кратко описывают условия выделения казеина и результаты качественных реакций продуктов гидролиза.

### Вопросы и задачи для самостоятельной работы и для контроля знаний

1. Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
2. Укажите элементный состав белков и пептидов.
3. Охарактеризуйте свойства пептидов.
4. Функции белков.
5. Классификация белков.
6. Понятие о коагуляции и денатурации. Причины данных явлений.

7. Растворимость белков.
8. Отношение белков к нагреванию в нейтральной, кислой и щелочных средах.
9. Качественные реакции на белки (реактивы, условия проведения, аналитический эффект).
10. Укажите общие цветные реакции на белки и аминокислоты
11. Охарактеризуйте принцип построения пептидной цепи.
12. Дайте определение первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры пептидов и белков. Какими видами взаимодействия стабилизируются  $\alpha$ -спиральная конформация и  $\beta$ -структура белковой цепи?
13. Определите структуру тетрапептида, если в продуктах его неполного гидролиза идентифицированы: аланин, глицин, лейцин, тирозин и дипептиды аланилтирозин, глицилаланин и тирозиллейцин.
14. Нейропептид головного мозга Met-энкефалин имеет аминокислотную последовательность: Tyr—Gly—Gly—Phe—Met. Приведите его строение и название. Напишите схему полного кислотного гидролиза этого пептида.
15. Природный дипептид карнозин содержится в мышцах человека и является  $\beta$ -аланилгистидином. Напишите его структурную формулу и схему реакции гидролиза в кислой среде.
16. Какие соединения образуются в результате ферментативного гидролиза тетрапептида Ala—Lys—Asp—Val при действии трипсиана, который расщепляет только пептидные связи, образованные карбоксильной группой лизина или аргинина. Напишите схему реакции гидролиза.
17. Методом ионообменной хроматографии были разделены  $\alpha$ -аминокислоты в следующих парах: аргинин и валин, глутаминовая кислота и гистидин, аспарагиновая кислота и аланин. Определите, какая аминокислота в каждой паре будет первой элюироваться при пропускании через хроматографическую колонку буферного раствора с pH=7,5.
18. Коричная (3-фенилпропеновая) кислота при взаимодействии с глицином образует метаболит, содержащий амидную группу. Напишите схему реакции и укажите, в каком из исходных соединений осуществляется нуклеофильное замещение.
19. В ходе биотрансформации никотиновой кислоты происходит ее взаимодействие с глицином. Напишите схему реакции образования соединения, содержащего амидную связь.
20. Какое соединение образуется при взаимодействии валина с формальдегидом? Напишите схему реакции и укажите, по какому механизму она протекает. Какое практическое значение имеет эта реакция?
21. Сколько дипептидов может быть получено из: а) трех аминокислот; б) пяти аминокислот?
22. Напишите структурные формулы двух изомерных дипептидов, состоящих из разных аминокислотных остатков и имеющих в молекуле шесть атомов углерода и три атома кислорода.
23. Напишите структурную формулу одного из природных трипептидов, в молекуле которого на пять атомов кислорода приходится два атома серы.
24. Какую массу дипептида состава  $C_4H_8O_3N_2$  теоретически можно получить из 15,0 г уксусной кислоты? Напишите схему синтеза.
25. Для полного гидролиза образца дипептида массой 24,0 г потребовалось 2,7 г воды. Установите структуру дипептида, если известно, что при гидролизе образовалась только одна аминокислота.

26. При кислотном гидролизе 33 г дипептида образовалось только одно вещество — хлороводородная соль одной из аминокислот. Масса этой соли равна 55,75 г. Установите строение дипептида.
27. Для полного гидролиза образца трипептида массой 27,9 г потребовалось 3,6 г воды. Установите структуру трипептида, если известно, что при гидролизе образовалась только одна аминокислота.
28. Оцените молекулярную массу белка инсулина, если известно, что в его состав входят шесть остатков цистеина, а массовая доля серы равна 3,3%.
29. Какая масса воды израсходуется при полном гидролизе 10,0 г инсулина (см. предыдущую задачу), если известно, что в состав этого белка входит 51 аминокислотный остаток?
30. Некоторый белок построен из девяти разных аминокислотных остатков. Сколько может существовать изомеров ему белков с тем же аминокислотным составом?
31. Один из простейших белков — окситоцин — состоит из девяти аминокислотных остатков, два из которых одинаковы. Сколько может существовать изомеров окситоцину белков с тем же аминокислотным составом?
32. При гидролизе нескольких дипептидов образовалась смесь глицина, фенилаланина, глутаминовой кислоты и лизина. Один из дипептидов разделили на две равные части. Одну часть обработали избытком раствора гидрокарбоната натрия и получили 3,36 л газа (н. у.). Вторая часть смогла прореагировать с 20 мл бромоводородной кислоты (концентрация 2,5 моль/л). Установите строение дипептида и его исходную массу.

### **Лабораторная работа №3**

#### **УГЛЕВОДЫ**

##### **Цель работы:**

1. Ознакомить студентов с методиками проведения качественных реакций на углеводы;
2. Закрепить представления об особенностях строения молекул углеводов;
3. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
4. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
5. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета по лабораторной работе.

К природным высокомолекулярным соединениям относятся углеводы, белки, нуклеиновые кислоты.

*Углеводы (сахара)* - обширная группа природных органических соединений, химическая структура которых часто отвечает общей формуле  $C_n(H_2O)_n$  т.е. углерод + вода.

Используемый термин возник более 100 лет назад, когда так называли природные соединения, отвечающие формуле  $(CH_2O)_n$ , т.е. гидраты углерода. Основоположником учения о химии углеводов является немецкий ученый Э.Фишер, первым установивший во второй половине XIX в. структуру нескольких сахаров. Большой вклад в развитии химии углеводов внесли ученые А.М. Бутлеров, А.А. Колли, Н.Н. Кочетков и др.

Углеводы включают соединения, начиная с низкомолекулярных, содержащих всего несколько атомов углерода, до веществ, молекулярная масса которых достигает нескольких миллионов.

### **Функции углеводов**

В биосфере углеводов больше, чем других органических соединений вместе взятых. В растительном мире на их долю приходится 80-90 % в расчете на сухое вещество, в животном мире около 2%. Однако значение углеводов велико для всех живых организмов. Функции углеводов разнообразны и важны.

*Энергетическая функция.* При окислении в процессе дыхания, углеводы выделяют заключенную в них энергию и обеспечивают значительные потребности организма. При окислении 1 г углеводов выделяется ~16,9 кДж энергии.

*Пластическая функция.* Углеводы (углерод) используются при синтезе нуклеиновых кислот, аминокислот, белков и т.п.

*Защитная функция.* Углеводы - основные компоненты оболочек растительных тканей, участвуют в построении наружного скелета насекомых и ракообразных, в образовании клеточных мембран и т.п.

*Опорная функция.* Целлюлоза и другие полисахариды оболочек растительных клеток образуют прочный остов растения, его механические и опорные ткани. В комплексе с белками входят в состав хрящевых тканей, выполняющих опорные функции у человека и животных.

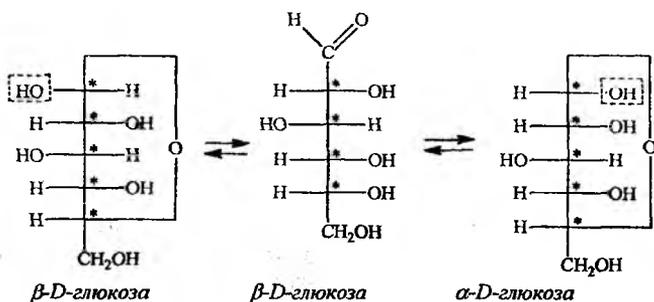
*Регуляторная функция.* Клетчатка, вызывая механическое раздражение стенок кишечника, способствует его перистальтике и улучшает пищеварение. Моносахариды играют существенную роль в регуляции осмотических процессов.

### **Моносахариды**

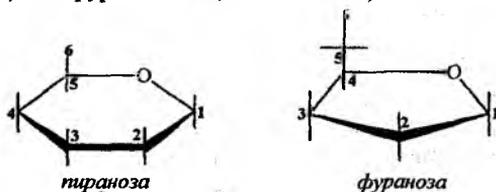
*Моносахариды (монозы, простые сахара)* содержат только одну структурную единицу и гидролизу не подвергаются.

По химическому строению моносахариды можно отнести к альдегидо- или кетоспиртам. Это твердые вещества, легко растворимые в воде и плохо растворимые в этиловом спирте и петролейном эфире. Водные растворы большинства моноз имеют нейтральный характер. Большинство из них обладает сладким вкусом. В свободном виде в природе встречается глюкоза, меньше фруктоза. Глюкоза является структурной единицей большинства углеводов.

Монозы могут существовать в открытой и циклической формах. Циклизация моноз происходит за счет пятого или четвертого атомов углерода: водород гидроксильной группы присоединяется к кислороду карбонильной группы, образуя новую функциональную группу - гликозидный (полуацетальный) гидроксил (в формулах взят в рамку):

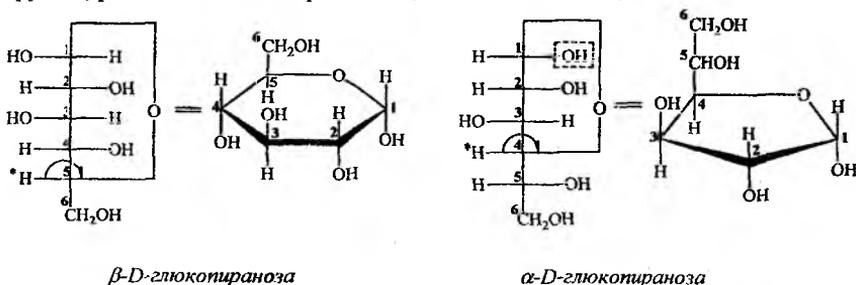


Оставшийся атом кислорода соединяется с атомом углерода альдегидной группы и входит в образующийся цикл: *пиранозный* (шестичленный) или *фуранозный* (пятичленный).

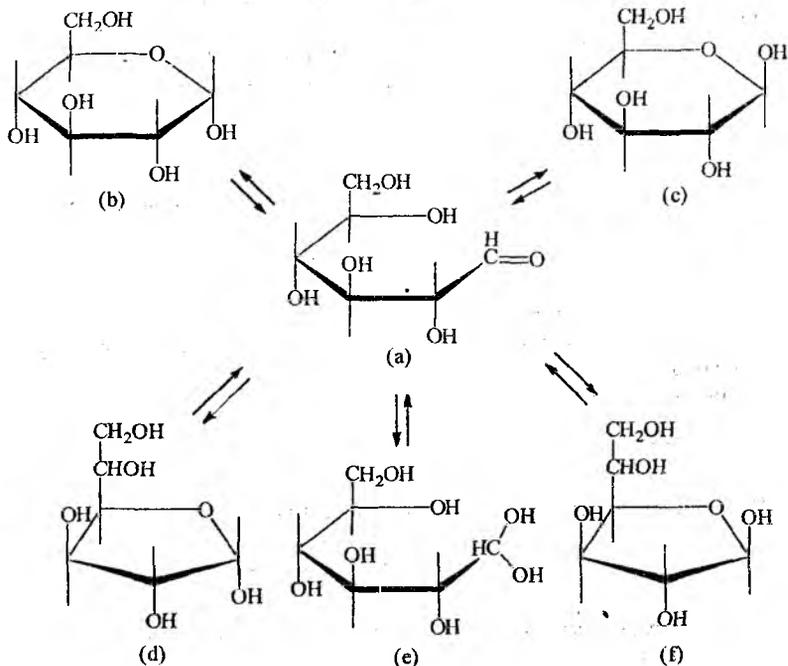


Образовавшиеся соединения, относятся к циклическим полуацеталам. Та циклическая форма, у которой полуацетальный гидроксил расположен по одну сторону с гидроксильной группой, определяющей принадлежность к D или L-ряду, называется  $\alpha$ -формой, если гидроксил находится в транс-положении к указанной группе, то такая форма называется  $\beta$ -формой.

Для написания формул моноз часто пользуются *формулами Хеурса*. Атом кислорода всегда располагается в правом верхнем углу. Углеродные атомы нумеруются, как показано на рисунке. Через них проводят вертикальные линии, на концах которых пишут функциональные группы: группы, расположенные слева размещают над плоскостью кольца, а группы, расположенные справа - под плоскостью кольца:



В кристаллическом состоянии монозы имеют циклическое строение, а в растворе под влиянием растворителя могут переходить в открытую форму. В растворе таутомерия происходит непрерывно и сохраняется подвижное равновесие.

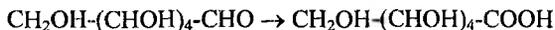


Таутомерия моноз в растворах: (а)-открытая (альдегидная) форма; (b)- $\alpha$ -D-пираноза; (c)- $\beta$ -D-пираноза; (d)- $\alpha$ -D-фураноза; (e)-гидратная форма; (f)- $\beta$ -D-фураноза.

### Химические свойства моноз

#### 1. Реакции окисления.

При осторожном окислении (взаимодействие с бромной водой) альдоз образуются *альдоновые кислоты*:



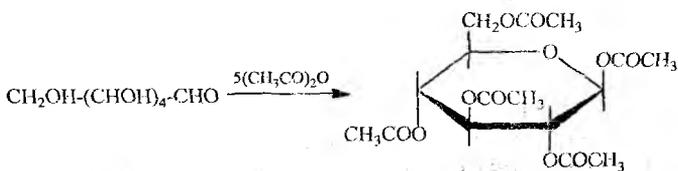
При окислении глюкозы образуется глюконовая кислота.

При действии более сильных окислителей (концентрированной азотной кислоты) образуются *двухосновные оксикислоты (сахарные) кислоты*:



Из глюкозы образуется *глюконовая кислота*.

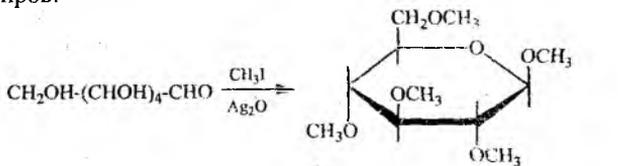




*β-D-глюкоза*

*пентаацетил-β-D-глюкопираноза*

При действии алкилирующих агентов (спиртов в присутствии хлороводорода или оксида серебра) образуются соединения по типу простых эфиров:

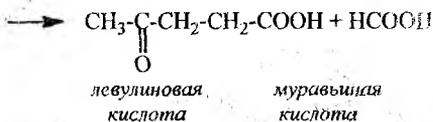
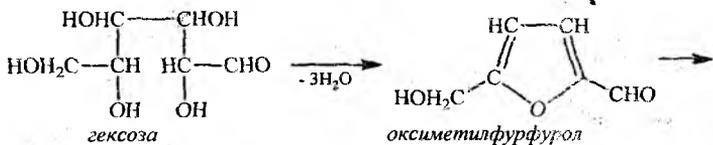
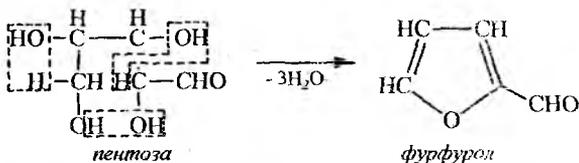


*α-β-D-глюкоза*

*пентаметил-β-D-глюкопираноза*

### 7. Действие кислот

Отношение пентоз и гексоз к кислотам различное. При нагревании с минеральными кислотами пентозы образуют фулфузол с отщеплением воды:



### Олигосахариды

**Олигосахариды классифицируют:**

1. по числу остатков моноз: дисахариды, трисахариды и т.п.;
2. по составу моносахаридных остатков:

- а) гомоолигосахариды состоят из остатков одного вида моноз;
- б) гетероолигосахариды содержат остатки разных моноз
- 3. в зависимости от порядка соединения мономеров:

- а) линейные
- б) разветвленные

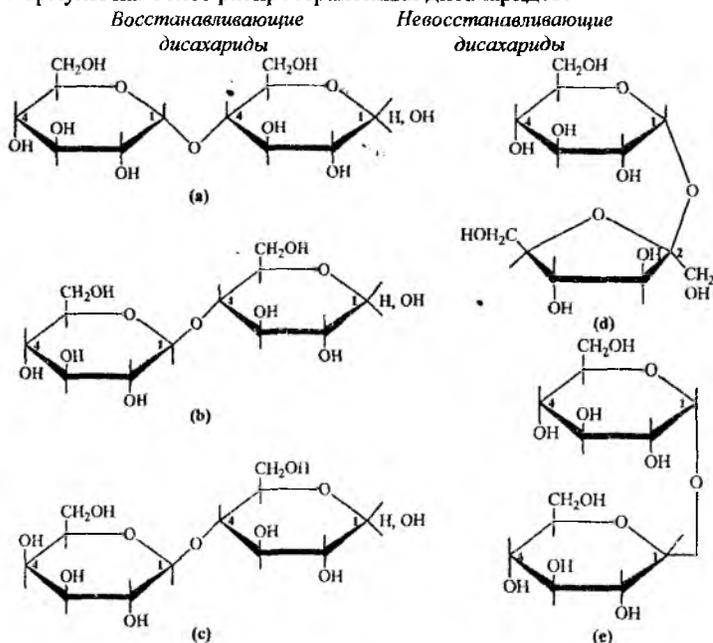
4. по восстановительной способности:

а) восстанавливающие: связь между остатками моноз осуществляется за счет спиртового и полуацетального гидроксильных, т.е. в молекуле содержатся полуацетальные гидроксильные, которые могут переходить в альдегидную форму и проявлять восстановительные свойства;

б) невосстанавливающие: связь между остатками моноз осуществляется только за счет полуацетальных гидроксильных, не способных переходить в альдегидную форму.

Наиболее широко распространены дисахариды: обычный свекловичный или тростниковый сахар - сахароза, солодовый сахар - мальтоза, молочный сахар - лактоза и целлобиоза (получается при неполном гидролизе крахмала).

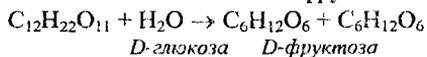
Формулы наиболее распространенных дисахаридов:



Наиболее распространенные дисахариды: (а)-мальтоза (1- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-4- $\alpha$ -D-глюкопираноза); (б)-целлобиоза (b-D-глюкопиранозил-b-D-глюкопираноза); (с)-лактоза (1-b-D-галактопиранозил-4-D-глюкопираноза); (d)-сахароза (1- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-2-b-D-фруктофураноза); (e)-трегалоза (1- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-1- $\alpha$ -D-глюкопираноза).

Все перечисленные дисахариды имеют общую формулу  $C_{12}H_{22}O_{11}$ .

Состав дисахаридов можно определить по продуктам гидролиза: сахароза состоит из остатков D-глюкозы и D-фруктозы:



Подобный процесс протекает в организме под влиянием фермента *сахаразы*, монозы легко проникают в кровоток.

### Полисахариды (гликаны)

Основная масса природных углеводов существует в виде полисахаридов. По функциональному значению можно выделить две группы:

1) выполняют структурную функцию (целлюлоза);  
 2) функции питания (гликоген) и выполняют роль депо питательных веществ. По строению полисахариды подразделяют:

- *гомополисахариды* состоят из одинаковых фрагментов моноз (крахмал);

- *гетерополисахариды* состоят из разных фрагментов моноз (гиалуроновая кислота содержит остатки аminosахаров и гексуроновых кислот).

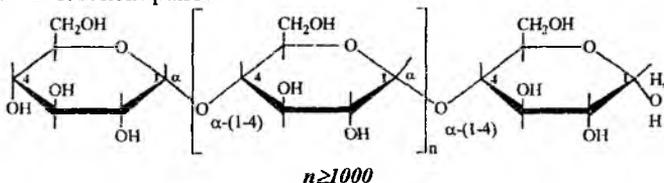
Названия гомополисахаридов образуются из названий моноз с заменой суффикса *оза* на суффикс *-ан* (глюкан, маннан, арабан и т.п.).

Разветвленный гетерополисахарид, в основной цепи которого содержатся остатки глюкозы, а в боковой - остатки маннозы, называют *манноглюканом*, а в случае обратного строения - *глюкоманнаном*.

#### Резервные полисахариды

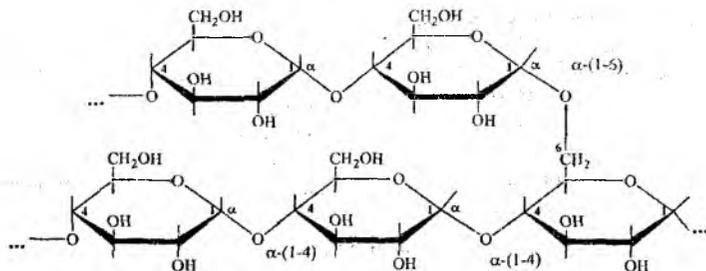
*Крахмал*  $(C_6H_{10}O_5)_n$  представляет собой смесь *амилозы* и *амилопектина*.

*Амилоза* - линейный полимер с  $\alpha$  (1→4) гликозидными связями между остатками D-глюкопиранозы:



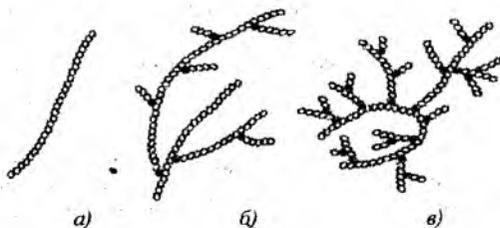
Амилоза имеет кристаллическое строение, может быть получена при обработке нативного крахмала горячей водой. При этом амилоза переходит в раствор, а амилопектин не растворяется. Образует с иодом синее окрашивание. Легко гидролизруется до глюкозы и мальтозы.

*Амилопектин* имеет сильно разветвленные цепи, содержащие около 4000 остатков глюкозы и 0,4 % фосфорной кислоты. Остатки глюкозы связаны 1→4 и 1→6-гликозидными связями:



С иодом образует фиолетовое окрашивание. Не восстанавливает оксиды металлов.

**Гликоген.** Животные запасают глюкозу в виде животного крахмала гликогена, откладывающегося в основном в печени и мышцах. Его молекулы сильно разветвлены, и молекулярная масса достигает от  $10^2$  до  $10^5$  kDa.

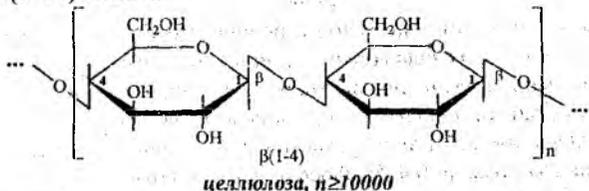


Структура молекул амилозы (а), амилопектина (б) и гликогена (в)  
 \* - Глюкозные остатки, соединенные  $\alpha$ -1,6-связями;  
 о - Глюкозные остатки, соединенные  $\alpha$ -1,4-связями

В желудочно-кишечном тракте гликоген и крахмал расщепляются  $\alpha$ -амилазами слюны и поджелудочной железы, гидролизующими  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-связи в расположенных снаружи ветвях гликогена и амилопектина до D-глюкозы.

### Структурные полисахариды

**Целлюлоза (клетчатка)** - наиболее распространенный в природе гомополисахарид, состоящий из остатков  $\beta$ -D-глюкозы, соединенных друг с другом  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-связью:



Цепочка целлюлозы имеет вид нити, спиралеобразно закрученной вокруг своей оси и удерживаемой в таком положении водородными связями остатков глюкозы. Отдельные нити соединяются межмолекулярными водородными связями в пучки, имеющие характер волокон. Это обеспечивает особые механические свойства целлюлозы - ее высокую прочность.

Клетчатка является главной составной частью оболочек растительных клеток, наиболее в чистом виде это хлопковое волокно (90%), древесина хвойных деревьев содержит около 50% целлюлозы.

Целлюлоза нерастворима в органических растворителях, в водных растворах щелочей и разбавленных минеральных кислотах. Она растворяется только в концентрированной соляной и фосфорных кислотах, 72%-ной серной кислоте, *реактиве Швейцера* (раствор соли двухвалентной меди в аммиаке) и в растворах некоторых четвертичных органических оснований.

Легко гидролизуется кислотами:

Целлюлоза → декстрины → целлобиоза → глюкоза.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы

1. Спиртовой раствор  $\alpha$ -нафтола
2. Этанол
3. Водный раствор крахмала (1-2%)
4. Водный раствор глюкозы (1-2%)
5. Серная кислота (конц.)
6. Соляная кислота (25-30%)
7. Раствор  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (1%)
8. Азотная кислота (конц.)
9. Раствор  $\text{NaOH}$  (10%)
10. Раствор сульфата меди (10%)
11. Водный раствор фруктозы (1-2%)
12. Раствор йода в  $\text{KI}$
13. Раствор нитрата серебра
14. Раствор  $\text{CuSO}_4$  (0,1%)
15. Раствор едкого натра (конц.)
16. Раствор  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
17. Раствор  $\text{NaNO}_2$
18. Раствор нингидрина (0,1%)
19. Реактив Фелинга (смесь растворов медного купороса, сегнетовой соли и едкого натра)
20. Реактив Барфедда (раствор ацетата меди и ацетата натрия в разбавленной уксусной кислоте)
21. Резорцин
22. Раствор сахарозы (10%)
23. Раствор формальдегида

24. Лакмус
25. Лактоза
26. Манноза
27. Галактоза
28. Сегнетовая соль
29. Тимол

### **Посуда и приборы**

1. Пробирка
2. Капельница
3. Держатель
4. Спиртовка
5. Водяная баня
6. Кристаллизатор со льдом

### **Проведение качественных реакций на углеводы**

#### **Опыт 1**

**Проба Подбедова-Молиши** (эта реакция является общей для углеводов).

К 1 см<sup>3</sup> раствора глюкозы (лактозы, фруктозы и др.) добавьте 1-2 капли 10% спиртового раствора  $\alpha$ -нафтола и 4-6 капель конц. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (работать очень осторожно).

**Аналитический эффект:** на границе раздела двух слоев образуется фиолетовое кольцо (если вместо  $\alpha$ -нафтола взять раствор тимола, то образуется красное кольцо).

Реакция основана на том, что при действии концентрированной серной кислоты из пентоз получается фурфурол, а из гексоз - 5-оксиметилфурфурол, которые при конденсации с нафтолом образуют окрашенное соединение.

#### **Опыт 2**

**Проба на образование альдегидных смол.** 5 см<sup>3</sup> раствора глюкозы (лактозы, фруктозы, маннозы) (1-2%) смешайте с 2 см<sup>3</sup> 10% раствора едкого натра и доведите до кипения, нагревая на спиртовке.

**Аналитический эффект:** содержимое пробирки желтеет или даже становится темно-бурым. Появляется запах карамели, особенно заметный при подкислении.

Реакция основана на общей склонности альдоз к образованию в щелочной среде продуктов конденсации (альдегидных смол).

#### **Опыт 3**

**Метод Вознесенского** (количественное определение углеводов). К 3 см<sup>3</sup> раствора глюкозы (лактозы, фруктозы, маннозы) добавьте 1 см<sup>3</sup> реактива Фелинга и нагревайте на водяной бане в течение 5-10 минут.

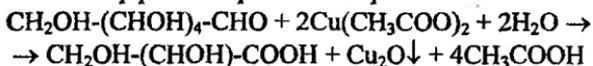
**Аналитический эффект:** образование красного осадка Cu<sub>2</sub>O.

Жидкость Фелинга готовят из медного купороса, сегнетовой соли и едкого натра.

#### **Опыт 4**

**Проба Барфедда.** Реактив Барфедда - это раствор ацетата меди и ацетата натрия в разбавленной уксусной кислоте. К 2 см<sup>3</sup> глюкозы (маннозы, лактозы, фруктозы) добавьте 2 см<sup>3</sup> реактива Барфедда и нагрейте до кипения.

*Аналитический эффект: образование красного осадка.*



Проба Барфедда отличается от других реакций восстановления тем, что рН среды в этой реакции близка к нейтральной. Восстанавливающие дисахариды в этих условиях не окисляются, поэтому эта реакция позволяет отличить моносахариды от дисахаридов.

#### **Опыт 5**

**Реакция Селиванова.** К 2 см<sup>3</sup> раствора монозы добавьте 2 см<sup>3</sup> соляной кислоты и несколько кристалликов резорцина. Нагрейте смесь.

*Аналитический эффект: появление интенсивного красного окрашивания.*

Реакция Селиванова позволяет отличить кетозы от альдоз. При кипячении с концентрированными минеральными кислотами монозы подвергаются дегидратации, образуя производные гетероциклического альдегида фурфурала: кетозы - *фурфураль*, гексозы - *оксиметилфурфураль*.

Полученное вещество образует окрашенный продукт конденсации с резорцином. Альдозы в этих условиях менее активны, чем кетозы, и требуют более продолжительного нагревания с кислотами.

#### **Опыт 6**

**Исследование свойств сахарозы.** Предварительно можно проделать с 5-10% растворами сахарозы реакции Фелинга, Подобедова-Молиша, Селиванова:

а) 3 см<sup>3</sup> раствора сахарозы нагрейте с двумя каплями 10 % раствора серной кислоты. После нагревания (в течении 5-10 мин.) смесь охладите и содержимое пробирки разделите на 2 части;

б) 1,5 см<sup>3</sup> полученного гидролизата раствора сахарозы нейтрализуйте разбавленным раствором щелочи и добавьте 0,5 см реактива Фелинга и нагрейте. Запишите результаты;

в)  $1,5 \text{ см}^3$  полученного гидролизата раствора сахарозы нейтрализуйте разбавленным раствором щелочи и добавьте  $1 \text{ см}^3$  реактива Барфедда. Отметьте изменение цвета смеси после нагревания пробирки на спиртовке.

### Опыт 7

*Исследование свойств крахмала.* а) небольшое количество крахмала растворить в теплой воде, отфильтровать;

б) к фильтрату, осадку опыта (а) и раствору крахмала добавьте 2-3 капли раствора йода в КJ. Аналитический эффект: окрашивание раствора в синий цвет для водного раствора крахмала. Реакция основана на образовании нестойкого адсорбционного соединения йода с амилозой, состав которой колеблется от  $n\text{I}_2 + 10n(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_x$  до  $n\text{I}_2 + 20n(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_x$ .

Полученный окрашенный раствор разделите на три части:

а) к одной части раствора добавьте 3-4 капли 10%-ного раствора едкого натра;

б) к другой части раствора добавьте  $5 \text{ см}^3$  этанола;

в) третью часть нагрейте с окрашенным раствором крахмала на водяной бане (5-10 мин).

*Аналитический эффект: обесцвечивание растворов.*

### Вопросы и задачи для самостоятельной работы и для контроля знаний

1. Укажите правила техники безопасности при выполнении опытов
2. Дайте определение и проведите классификацию углеводов.
3. Функции углеводов в организме.
4. Классификация моносахаридов.
5. Строение молекулы глюкозы (доказательства строения, открытая, циклическая, проекционная формулы и формула Хеуорса)
6. Химические свойства глюкозы (реакции окисления, алкилирования, адилирования, уменьшения и увеличения цепи)
7. Фруктоза: строение и свойства.
8. Сахароза: строение, свойства, гидролиз.
9. Крахмал: строение, амилоза, амилопектин, физические и химические свойства.
10. Целлюлоза: строение и свойства. Способы переработки.
11. Какие стереоизомеры образуются в результате реакции внутримолекулярного нуклеофильного присоединения (с участием ОН-группы при С-5) в молекуле D-галактозы? Приведите их строение.
12. Какие стереоизомеры образуются в результате реакции внутримолекулярного нуклеофильного присоединения с образованием фуранозного цикла в молекуле D-рибозы. Приведите их строение.
13. Приведите строение двух аномеров D-маннопиранозы. Напишите схему реакции их образования из открытой формы D-маннозы. Изобразите конформационное строение этих аномеров.
14. Приведите строение двух аномеров 2-дезокси-О-рибофуранозы. Напишите схему реакции их образования из оксо формы 2-дезокси-О-рибозы.
15. Напишите схему реакции аномеризации  $\beta$ -D-маннопиранозы. Изобразите конформационное строение аномеров.

16. Напишите схему реакции аномеризации  $\beta$ -D-фруктофуранозы.
17. Приведите строение энантиомеров 2-амино-2-дезоксид-D-глюкопиранозы.
18. Какими стереоизомерами по отношению друг к другу являются  $\alpha$ -D-глюкопираноза и  $\alpha$ -D-маннопираноза?
19. Какими стереоизомерами по отношению друг к другу являются  $\alpha$ -D-галактопираноза и  $\beta$ -D-глюкопираноза?
20. Приведите строение эпимера D-галактозы, отличающегося конфигурацией атома C-3. Назовите этот эпимер.
21. Приведите строение эпимера D-ксилозы, отличающегося конфигурацией атома C-2. Назовите этот эпимер.
22. Приведите строение эпимера D-глюкозы, отличающегося конфигурацией атома C-3. Назовите этот эпимер.
23. Приведите строение диастереомера D-глюкозы, отличающегося конфигурацией атомов C-3 и C-4. Как называется этот моносахарид?
24. Конфигурацией, каких хиральных атомов углерода различаются D-глюкоза и D-идоза? Какими стереоизомерами по отношению друг к другу являются эти моносахариды?
25. Напишите схемы реакций перехода  $\alpha$ -D-глюкопиранозы в  $\beta$ -D-глюкопиранозу.
26. Напишите схемы реакций, обуславливающих переход  $\beta$ -D-рибофуранозы в  $\alpha$ -D-рибофуранозу.
27. Напишите схему таутомерных превращений, происходящих при растворении в воде  $\beta$ -D-галактопиранозы (из циклических форм ограничьтесь пиранозными).
28. Напишите схему таутомерных превращений, происходящих при растворении в воде 2-амино-2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкопиранозы (из циклических форм ограничьтесь пиранозными).
29. Напишите схему реакции перехода в водном растворе 2-дезоксид- $\beta$ -D-рибофуранозы в таутомер, обладающий восстановительными свойствами.
30. Наличием, какого таутомера обусловлены восстановительные свойства раствора  $\alpha$ -D-ксилопиранозы? Напишите схему таутомерных превращений (из циклических форм ограничьтесь пиранозными формами).
32. Какие продукты образуются при взаимодействии  $\alpha$ -D-глюкопиранозы с метанолом в безводной кислой среде? Напишите схему реакции.
33. Какие продукты образуются при действии этанолом на  $\alpha$ -D-галактопиранозу в присутствии кислотного катализатора в безводной среде? Напишите схему реакции.
34. Напишите схему реакции взаимодействия  $\beta$ -D-галактопиранозы с метанолом в кислой среде. Почему реакция происходит в безводных условиях?
35. Напишите схему реакции получения этил- $\alpha$ -D-маннопираноза. Можно ли в качестве исходного соединения использовать  $\beta$ -D-маннопиранозу?
36. Напишите схему реакции получения гликозида при взаимодействии  $\alpha$ -D-маннопиранозы с этиламином.
37. Напишите схему реакции гидролиза этил- $\alpha$ -D-глюкопираноза в кислой среде. Объясните причину образования двух аномеров.
38. Напишите схему реакции гидролиза метил- $\alpha$ -D-галактопираноза. Объясните причину образования двух аномеров.

39. Какие дисахариды соответствуют данным, что они состоят из остатков D-глюкопиранозы, связанных 1→4-гликозидной связью? Приведите строение и их тривиальные названия.
40. Какие дисахариды соответствуют данным, что они состоят из остатков D-глюкозамина, находящихся в пиранозной форме и связанных 1→4-гликозидной связью? Приведите строение этих дисахаридов.
41. Какое строение имеют дисахариды, построенные из остатков D-глюкуроновой кислоты, связанных 1→4-гликозидной связью? Напишите формулы этих дисахаридов.
42. Приведите строение дисахаридов, состоящего из остатков D-глюкуроновой кислоты (невосстанавливающий остаток) и D-галактозамина (восстанавливающий остаток), связанных β1→3-гликозидной связью.
43. Приведите строение α-0-глюкопиранозил-(1→4)-β-0-глюкопиранозы и ее тривиальное название. Покажите способность этого дисахаридов к цикло-оксо-таутомерии.
44. Приведите строение α-0-глюкопиранозил-(1→4)-β-0-глюкопиранозы и тривиальное название этого дисахаридов. Может ли он вступать в реакцию серебряного зеркала?
45. Приведите строение β-0-галактопиранозил-(1→4)-β-0-глюкопиранозы и ее тривиальное название. Покажите способность этого дисахаридов к аномеризации.

### *Лабораторная работа №4* **ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ЛИПИДОВ (ЖИРОВ)**

#### *Цель работы:*

1. Ознакомить студентов с методами проведения качественных реакций на липиды;
2. Закрепить представления о структурах липидов;
3. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
4. Ознакомить со способами утилизации отработанных реактивов;
5. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета при выполнении лабораторных работ.

Липиды (от греч. *lipos* - жир) - низкомолекулярные органические соединения, практически нерастворимые в воде, которые могут быть извлечены из клеток неполярными органическими растворителями (хлороформ, бензол, петролейный эфир).

Отличительным свойством липидов является их гидрофобность (липофильность).

Липиды представляют собой разнородные химические соединения (схема1).

#### *1 Простые липиды:*

1. *Ацилглицеролы* (жиры, глицериды и т.п.);
2. *Воска.*

## II Сложные липиды:

### 1. Фосфолипиды

• глицерофосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтанолламин, фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол, фосфатидилглицерол, кардиолипин, плазмалоген);

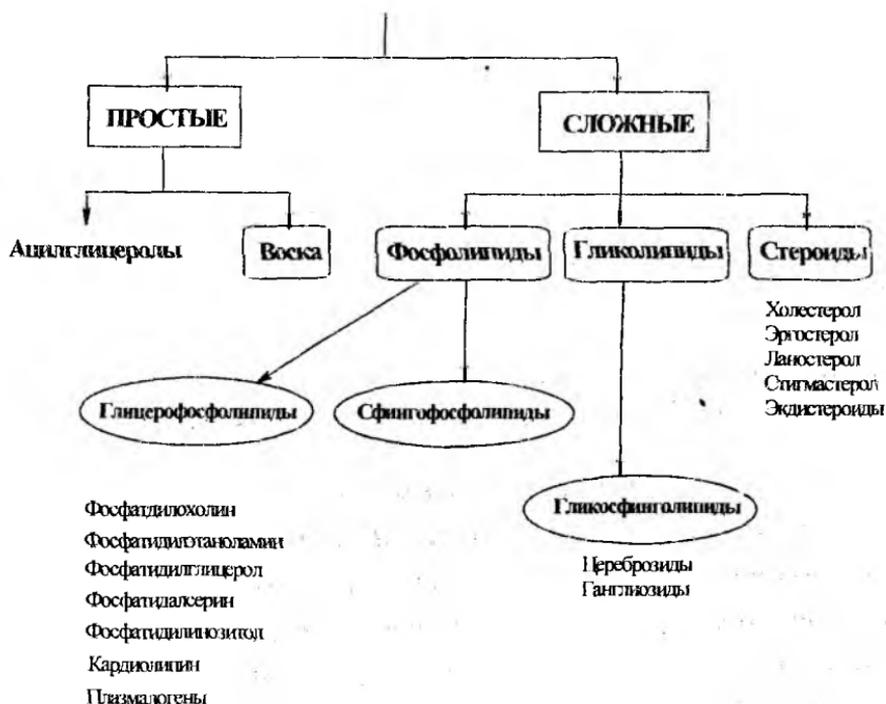
• сфингофосфолипиды (сфингомиелин);

2. *Стероиды* (холестерол, эргостерол, ланостерол, стигмастерол, экистероиды);

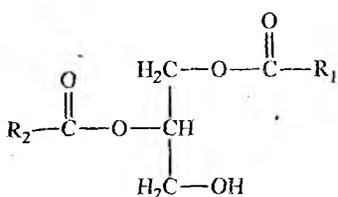
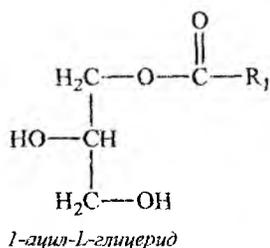
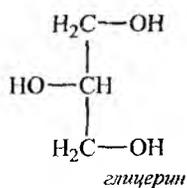
3. *Гликолипиды* (цереброзиды, ганглиозиды, сульфатиды).

Схема 1

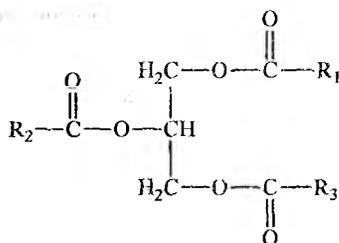
### Классификация липидов по строению ЛИПИДЫ



*Ацилглицеролы (нейтральные жиры, глицериды)* наиболее распространенная группа липидов. Эти соединения являются сложными эфирами глицерина (глицерола) и жирных кислот. Если в глицерине этерифицирована одна гидроксильная группа, то образуется *моноацилглицерол*, если две - *диацилглицерол*, три - *триацилглицерол*.



*1,2-диацил-L-глицерид*



*триацилглицерид*

В природе наиболее часто встречаются триацилглицериды. Поскольку в указанных соединениях не содержится ионных групп, то их относят к *нейтральным липидам*.

Если все три кислотных остатка одинаковы, то такие липиды называют простыми, если содержат разные остатки, то липид называют смешанным.

Жирные кислоты, входящие в состав таких липидов определяют их физико-химические свойства. Наиболее часто образуют жиры монокарбоновые кислоты, содержащие от 12 до 20 атомов углерода.

### *Насыщенные жирные кислоты*

<i>Лауриновая (C<sub>12</sub>)</i>	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{10}-\text{COOH}$
<i>Миристиновая (C<sub>14</sub>)</i>	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{COOH}$
<i>Пальмитиновая (C<sub>16</sub>)</i>	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{14}-\text{COOH}$
<i>Стеариновая (C<sub>18</sub>)</i>	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{16}-\text{COOH}$
<i>Арахиновая (C<sub>20</sub>)</i>	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOH}$
<i>Бегеновая (C<sub>22</sub>)</i>	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{20}-\text{COOH}$
<i>Лигноцериновая (C<sub>24</sub>)</i>	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{22}-\text{COOH}$

### Моноеновые жирные кислоты

Пальмитолеиновая (C <sub>16</sub> )	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Олеиновая (C <sub>18</sub> )	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$
Эруковая (C <sub>22</sub> )	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{COOH}$
Нервоновая (C <sub>24</sub> )	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{13}-\text{COOH}$

### Полиеновые жирные кислоты

Линолевая (C <sub>18</sub> )	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_2-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$ (с двумя двойными связями)
Линоленовая (C <sub>18</sub> )	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2)_6-\text{COOH}$ (с тремя двойными связями)
Арахидоновая (C <sub>20</sub> )	$\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_4-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$ (с четырьмя двойными связями)
Клуванодоновая (C <sub>22</sub> )	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2)_5-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ (с пятью двойными связями)

Большое число неполярных С-С и С-Н связей в углеводородной цепи придает неполярный характер всей молекуле. Неполярность высших жирных кислот является причиной плохой растворимости липидов в воде, а также придает гидрофобные свойства и обуславливает особую сборку липидов в биомембране.

Чем больше в составе жиров короткоцепочечных или ненасыщенных кислот, тем ниже температура плавления и выше растворимость. Животные жиры содержат значительное число насыщенных жирных кислот, поэтому они при н.у. являются твердыми. Растительные жиры, в состав которых входят ненасыщенные кислоты, являются жидкими и называются *маслами*.

В жире человека, плавящемся при 15<sup>0</sup>С, содержится около 70% ненасыщенных жирных кислот, поэтому жир находится в жидком состоянии при t=36,6<sup>0</sup>С.

Для характеристики жира используют некоторые константы характеризующие жиры.

*Кислотное число* - масса КОН (мг), необходимая для нейтрализации свободных жирных кислот в 1 г жира.

*Число омыления* - это масса КОН (мг), необходимая для гидролиза нейтральных липидов (омыления) и нейтрализации всех жирных кислот (в

том числе и свободных), содержащихся в 1 г жира. Чем выше число омыления, тем больше низкомолекулярных кислот входит в состав жира.

*Йодное число* - это масса иода (г), связываемая 100 г жира. Йодное число характеризует степень ненасыщенности, так как присоединение йода происходит по месту разрыва кратных связей в остатке жирной кислоты. Чем больше йодное число, тем выше ненасыщенность жира.

Липиды широко применяют в медицине и технике. Липиды - являются как лекарственными препаратами, так и их носителями (липосомы, фармакосомы, мицеллярные и др.). Из них получают основу для мазей, мыло (соли жирных кислот), масляные краски, олифу и т.п.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Реактивы*

1. Жиры (говяжий, свиной, бараний)
2. Масло (подсолнечное, касторовое, растительное)
3. Толуол
4. Ацетон
5. Петролейный эфир
6. Диэтиловый эфир
7. Гексан
8. Этиловый спирт
9. Серная кислота (конц.)
10. Соляная кислота (0,5н)
11. Соляная кислота (разб. 1:1)
12. Гидроксид калия (водный 0,1 н)
13. Гидроксид калия (спиртовый раствор 0,5н)
14. Раствор гидроксида натрия (разб.)
15. Раствор карбоната натрия 10%
16. Гидросульфат калия (безвод.)
17. Раствор нитрата серебра
18. Аммиак (водный раствор)
19. Раствор фуксинсернистой кислоты
20. Спиртовый раствор иода (0,2н)
21. Раствор тиосульфата натрия (0,1н)
22. Раствор крахмала 1 %
23. Бромная вода
24. Раствор гидроксида натрия 35 %

### *Посуда и приборы*

1. Пробирки
2. Колбочки для титрования
3. Держатель
4. Спиртовка
5. Водяная баня
6. Кристаллизатор со льдом
7. Стеклянная палочка
8. Микрошпатель
9. Часовое стекло
10. Бюретки

11. Аналитические весы
12. Чашечка для выпаривания

### **Опыт 1**

#### **Растворимость жиров и масел.**

а) в 5 пробирок поместите по небольшому кусочку твердого жира (свиного, говяжьего и т.п.) и прилейте по 1 мл: 1 - воды, 2 - этанола, 3 - толуола, 4 - петролейного эфира, 5 - ацетона. Если жир не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости жира на холоде и при нагревании.

б) в 5 пробирок поместите по 0,5 мл растительного масла (подсолнечного, оливкового, кукурузного и т.п.) и прилейте по 1 мл: 1 - воды, 2 - этанола, 3 - толуола, 4 - петролейного эфира, 5 - ацетона. Если масло не растворяется, пробирку поместите в водяную баню на 5 минут. Сделайте вывод о растворимости растительного масла на холоде и при нагревании.

### **Опыт 2**

#### **Гидролиз жиров и масел.**

а) В 2 пробирки поместите по небольшому кусочку жира и прилейте в 1 пробирку 1-2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую — 1-2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5-10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе жиров на холоду и при нагревании.

б) в 2 пробирки поместите по 0,5 мл растительного масла и прилейте в 1 пробирку 1-2 мл раствора щелочи (NaOH разб.), а во вторую — 1-2 мл соляной кислоты (1:1). Пробирки встряхните. Если изменений не наблюдается, поместите пробирки в водяную баню на 5-10 мин.

Сделайте вывод о гидролизе растительного масла на холоде и при нагревании.

### **Опыт 3**

**Выделение жира из молока.** К 6 мл цельного молока прибавляют 2 мл 10 %-ного раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , хорошо перемешивают и взбалтывают с 5 мл эфира. Эфирный слой помещают в чашечку для выпаривания на водяную баню (под тягой). После испарения эфира остается сливочное масло - молочный жир.

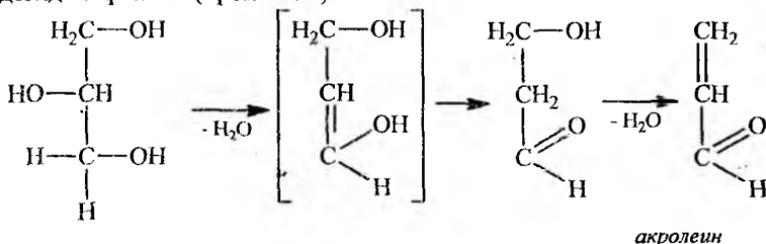
### **Опыт 4**

**Обнаружение глицерина в жирах (акролеиновая проба).** В пробирку вносят 2-3 капли масла (жира), 0,1-0,2 г безводного  $\text{KHSO}_4$  и нагревают на спиртовке (под тягой) до появления белых густых паров. В пары вносят

бумажку, смоченную аммиачным раствором нитрата серебра или раствором фуксинсернистой кислоты.

*Аналитический эффект:* Бумажка с раствором солей серебра темнеет, а с раствором фуксинсернистой кислоты становится ярко-розовой.

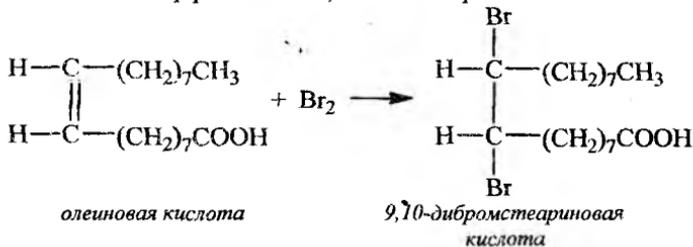
Акролеиновая проба проводится для обнаружения в липидах глицерина. При нагревании в присутствии водоотнимающих средств ( $\text{KHSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ , борная кислота) из глицерина образуется непредельный альдегид - акролеин (пропеналь).



### Опыт 5

**Определение ненасыщенности кислот в составе жира.** В пробирку поместите 2-3 капли масла (жира) и 8-10 капель бромной воды. Пробирку встряхните.

*Аналитический эффект:* Обесцвечивание бромной воды.



### Опыт 6

**Определение йодного числа.** В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают 3-4 капли масла (жира). Колбу повторно взвешивают на аналитических весах. По разности весов рассчитывают массу навески масла (жира). В колбу добавляют 25 мл спирта (при плохой растворимости слегка подогревают на водяной бане). Затем в колбу вносят 12,5 мл 0,2 н спиртового раствора иода (из бюретки), 100 мл воды и перемешивают 5 мин. Содержимое колбы титруют 0,1 н раствора тиосульфата натрия до появления слабо-желтого окрашивания.

Для более точного определения в колбу приливают 1 мл раствора крахмала и титрование заканчивают до исчезновения синего окрашивания.

Опыт повторяют - контроль, но без масла (жира). Расчет йодного числа проводят по формуле:

$$\text{Й.ч.} = (V_2 - V_1) \cdot 0,0127 \cdot 100/m$$

где  $V_2$ -объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование контроля;  $V_1$ -объем (мл) раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование пробы масла; 0,0127 - титр тиосульфата по йоду;  $m$  - навеска масла (г)

### Опыт 7

**Определение кислотного числа.** В предварительно взвешенную сухую колбу для титрования помещают примерно 2 мл масла (жира). Колбу повторно взвешивают на аналитических весах. По разности рассчитывают массу навески масла (жира) ~ 2-3 г. В колбочку добавляют 10-15 мл смеси спирта с эфиром (1:1), 1-2 капли фенолфталеина и титруют 0,1 н раствором КОН до появления слабо-розового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать в течение 0,5-1 мин.

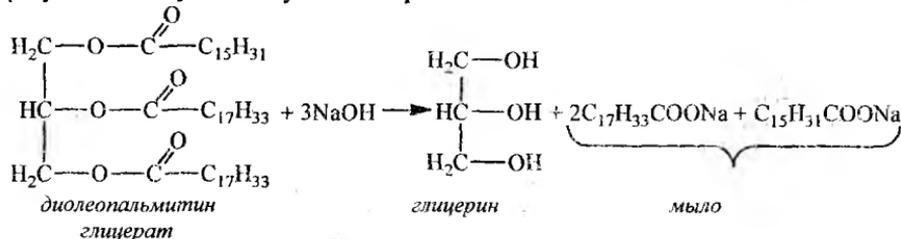
Кислотное число рассчитывают по формуле:

$$\text{К.ч.} = V \cdot T/m$$

где К.ч. - кислотное число;  $V$  - объем (мл) спиртового раствора КОН, пошедшего на титрование (мл);  $T$  - титр 0,1 н раствора КОН;  $m$  - масса навески масла (жира), г.

### Опыт 8

**Омыление жиров.** В фарфоровую чашечку поместить 0,5 мл касторового масла (жира) и 4 капли 35%-ного раствора гидроксида натрия. Тщательно размешайте смесь стеклянной палочкой до получения однородной эмульсии и поставьте на песчаную баню. Продолжайте тщательно размешивать смесь до получения однородной прозрачной слегка желтоватой жидкости. Затем добавьте 2 мл дистиллированной воды и вновь нагрейте, тщательно перемешивая до полного удаления воды. В результате получается кусочек твердого белого мыла.



### Опыт 9

**Определение числа омыления.** В 2 колбочки помещают: 1. 0,5 г жира (навеска на аналитических весах), 2. 0,5 мл воды. Затем в обе колбочки

добавляют по 15 мл 0,5 н спиртового раствора КОН. Колбочки закрывают пробками, соединенными с обратными холодильниками, и кипятят на водяной бане 30-40 минут.

После охлаждения в колбочки прибавляют по 15-20 мл воды, 3-4 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,5 н раствором соляной кислоты до исчезновения розового окрашивания. Расчет числа омыления проводят по формуле:

$$\text{Ч.о.} = (V_2 - V_1) \cdot 28/m$$

где Ч.о. - число омыления;  $V_2$  - объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование контроля;  $V_1$  - объем (мл) раствора соляной кислоты, израсходованного на титрование пробы масла;  $m$  - навеска масла (г); 28 - масса КОН, в 1 мл спиртового раствора.

#### Вопросы и задачи для самостоятельной работы и для контроля знаний

1. Расскажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
2. Дайте определение и проведите классификацию липидов.
3. Укажите функции липидов в организме.
4. Особенности высших жирных кислот, входящих в состав липидов человека.
5. Приведите примеры качественных реакций, доказывающих непредельный характер ВЖК.
6. Напишите структурные формулы представителей простых и сложных липидов: ТАГ, фосфолипидов, холестерина.
7. Какие реакции лежат в основе омыления жира?
8. Какие числа характеризуют состав и строение липидов?
9. Опишите общий принцип строения жиров (триацилглицеридов).
10. В чем состоит различие в строении твердых и жидких жиров?
11. Каким химическим превращениям подвергаются жиры при хранении и как это сказывается на качестве жиров?
12. Напишите уравнение реакции получения стеарата натрия из соответствующего триацилглицерина и укажите механизм этой реакции.
13. Напишите уравнение реакции получения твердого жира из 1,2-ди-линолеил-3-олеилглицерина.
14. Какие вещества называются мылами и на чем основано их моющее действие?
15. Рассчитайте объем водорода при нормальных условиях, необходимого для превращения 1 кг подсолнечного масла (йодное число 127) в смесь полностью насыщенных триацилглицеринов. Какими химическими реакциями можно проконтролировать полную гидрирования?
16. Из природных триацилглицеринов выделена маргариновая кислота  $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{O}_2$ . Есть ли связь между названием этой кислоты и пищевым продуктом маргарином? Напишите принципиальную схему реакции получения маргарина (обращаем внимание на то, что маргарин не является полностью насыщенным триацилглицерином).
17. Изобразите конформацию углеводородного радикала миристиновой кислоты  $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{COOH}$ , встречающейся в животных липидах.

18. Изобразите зигзагообразную конформацию углеводородного радикала лауриновой кислоты ( $C_{12}$ ). Чем объясняется энергетическая выгодность этой конформации?
19. Под действием оксидов азота олеиновая кислота ( $T_{пл.} 14^{\circ}C$ ) превращается в элаидиновую кислоту ( $T_{пл.} 52^{\circ}C$ ) с тем же строением, но имеющую транс-конфигурацию двойной связи. Напишите структурные формулы этих  $\Gamma$ -диастереомеров.
20. В виде какого  $\pi$ -диастереомера эруковая кислота  $C_{12}H_{23}COOH$  входит в состав мембранных липидов? Изобразите конформацию углеводородного радикала этой кислоты.
21. Изобразите конформационное строение арахидоновой кислоты  $C_{19}H_{31}COOH$ . Содержится ли в молекуле этой кислоты сопряженная система?
22. Арахидиновая кислота - насыщенный аналог арахидоновой кислоты. Изобразите конформацию углеводородного радикала арахидиновой кислоты ( $C_{20}$ ).
23. Объясните различие в температурах плавления арахидоновой кислоты ( $-49,5^{\circ}C$ ) и ее насыщенного аналога - арахидиновой кислоты ( $+76,5^{\circ}C$ ). Изобразите конформации их углеводородных радикалов.
24. Какие высшие жирные кислоты входят в состав 1-олеоил-2-пальмитоил-3-стеароилглицерина? Приведите строение названного триацилглицерина.
25. Обозначьте сложноэфирные группы и назовите кислоты, входящие в состав этого триацилглицерина.
26. Льняное масло содержит 44-61% линоленовой кислоты. Рассчитайте теоретическое йодное число для трилиноленоил глицерина.
27. Рассчитайте теоретическое йодное число для триолеоилглицерина. Какую консистенцию имеет этот триацилглицерин?
28. Напишите схему реакции кислотного гидролиза пальмитоилдистеароилглицерина. По какому механизму протекает эта реакция?
29. Напишите схему реакции гидролиза 1-пальмитоилдистеароилглицерина в среде гидроксида натрия. Назовите продукты реакции.
30. Напишите схему реакции гидрогенизации 1-линоленоил-2-линолеоил-3-олеоилглицерина. Какую консистенцию имеют исходный и конечный продукты?

### **Лабораторная работа №5** **ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ**

#### **Цель работы:**

1. Ознакомить студентов с методами проведения ферментативных реакций на примере каталазы, оксидоредуктазы, тирозиназы;
2. Исследовать влияние реакции среды (pH), концентрации фермента и субстрата, температуры на ферментативные реакции;
3. Закрепить представления об особенностях строения молекул ферментов;
4. Выработать навыки обращения с химической посудой, реактивами;
5. Привить навыки работы со справочной литературой и оформления отчета при выполнении лабораторных работ.

**Ферменты** - биологические катализаторы белковой природы. Термин фермент (от лат. *fermentum* - закваска) был предложен в начале XVII в. голландским ученым Ван Гельмонтом для веществ, влияющих на спиртовое брожение.

Ферменты и катализаторы неорганической природы, подчиняясь общим законам катализа, имеют сходные признаки:

- катализируют только энергетически возможные реакции;
- не изменяют направление реакции;
- не расходятся в процессе реакции;
- не участвуют в образовании продуктов реакции.

*Отличие ферментативного катализа от неорганического*

1. Ферменты действуют в мягких условиях организма (р,  $t^{\circ}$ , рН).
2. Белки-ферменты чувствительны к денатурирующим агентам.
3. Для действия ферментов характерна высокая эффективность.
4. Активность ферментов контролируется (генетически на уровне строения и различными биорегуляторами).
5. В организме, как правило, действуют полиферментные (т.е. поликаталитические) системы, в результате чего достигается многоэтапное направленное превращение вещества с допустимыми для организма уровнями перепада энергии.

6. Для действия ферментов характерна специфичность:

а) абсолютная - фермент катализирует превращение строго определенного вещества (уреаза расщепляет только мочевины на  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ );

б) относительная - фермент катализирует превращения одного типа связей в ряду близких по химическому строению веществ (например, липаза катализирует разрыв сложноэфирных связей независимо от типа радикала);

в) групповая относительная - то же, но для разрыва связи важны образующие ее атомные группировки.

7. Одним из важнейших свойств ферментов как биокатализаторов является их регулируемость. Через регуляцию ферментативного аппарата осуществляется скоординированность всех метаболических процессов во времени и пространстве, направленная на производство живой материи, поддержание постоянства внеклеточной среды, на приспособление к меняющимся условиям.

8. При ферментативных реакциях наблюдаются лишь незначительные побочные процессы, т.е. почти 100% выход.

**Строение ферментов.** По строению ферменты бывают простыми и сложными белками. Для сложных белков-ферментов используют следующие обозначения; *апофермент* - пептидная часть молекулы фермента; *холофермент* - прочный природный комплекс апофермента и небелковой части; *кофактор* - небелковая часть сложного белка-фермента;

*простатическая группа* - прочно связанный с апоферментом кофактор (металлы, гем и др.); *кофермент* - легко отделяемый от апофермента, например диализом; кофактор (витамины, нуклеотиды и др.) Апофермент всегда синтезируется в организме, кофакторы (витамины, металлы и др.) должны поступать с пищей.

Ферментативный катализ идет на поверхности фермента. Превращаемые вещества называются субстратами. Превращение субстрата происходит в области *активного центра*, который сформирован в третичной структуре большинства ферментов. У простых белково-ферментов активный центр образован сближенными в пространстве радикалами аминокислот первичной структуры. У сложных белково-ферментов здесь находятся кофакторы. В активном центре выделяют 2 части: *якорная* (радикалы аминокислот обеспечивают фиксацию субстрата) и *каталитическая* (радикалы аминокислот и (или) кофакторы обеспечивают катализ). У ряда регуляторных ферментов имеется еще один: центр - *аллостерический*. Присоединение к этому центру низкомолекулярных веществ (эфферкторов) индуцирует изменение третичной структуры фермента, в том числе и в области активного центра. Это и ведет к изменению каталитической активности фермента.

Белки-ферменты с четвертичной структурой могут катализировать одну и ту же реакцию, но несколько отличаться по строению (т.е. первичной структуре) субъединиц. Если это закреплено генетически - речь идет об изоферментах. Например, фермент лактатдегидрогеназа состоит из 4 субъединиц двух типов Н и М и существует 5 вариантах, т.е. изоферментов.

В составе как простого, так и сложного фермента выделяют субстратный, аллостерический и каталитический центры (субстратный и каталитический могут быть вместе).

**Каталитический центр** простого фермента представляет собой уникальное сочетание нескольких аминокислотных остатков, расположенных на разных участках полипептидной цепи. Образование каталитического центра происходит одновременно с формированием третичной структуры белковой молекулы фермента. Чаще всего в состав каталитического центра простого фермента входят остатки серина, цистеина, тирозина, гистидина, аргинина, аспарагиновой и глутаминовой кислоты.

**Субстратный центр** простого фермента - это участок белковой молекулы фермента, который отвечает за связывание субстрата. Субстратный центр образно называют "*якорной площадкой*", где субстрат прикрепляется к ферменту за счет различных взаимодействий между определенными боковыми радикалами аминокислотных остатков и соответствующими группами молекулы субстрата. Субстрат с ферментом связывается посредством ионных взаимодействий, водородных связей;

иногда субстрат и фермент связываются ковалентно. Гидрофобные взаимодействия также играют определенную роль при связывании субстрата с ферментом. В простых ферментах субстратный центр может совпадать с каталитическим; тогда говорят об *активном центре* фермента.

Ферменты обладают всеми свойствами белков, однако по сравнению с белками, выполняющими другие функции в клетке, ферменты имеют ряд специфических, присущих только им свойств.

**Зависимость активности ферментов от температуры.** Температура может влиять по-разному на активность фермента. При высоких значениях температуры может происходить денатурация белковой части фермента, что негативно сказывается на его активности. При определенных (оптимальных) значениях температура может влиять на скорость образования фермент-субстратного комплекса, вызывая увеличение скорости реакции. Температура, при которой каталитическая активность фермента максимальна, называется *температурным оптимумом* фермента. Различные клеточные ферменты имеют собственные температурные оптимумы, которые определяются экспериментально. Для ферментов животного происхождения температурный оптимум находится в интервале 40-50°C (рис. 1).

**Зависимость активности фермента от pH-среды.** Большинство ферментов проявляют максимальную активность при значениях pH, близких к нейтральным. Лишь отдельные ферменты "*работают*" в сильно кислой или сильно щелочной среде. Например, активность пепсина - фермента, гидролизующего белки в желудке, - максимальна при pH 1,5-2,5. В щелочной среде "*работают*" ферменты, локализованные в кишечнике. Изменение оптимального для данного фермента значения pH-среды может привести к изменению третичной структуры фермента, что скажется на его активности. С другой стороны, при изменении pH может измениться ионизация субстрата, что повлияет на образование фермент-субстратного комплекса. Влияние pH-среды на активность фермента показано на рис. 2.

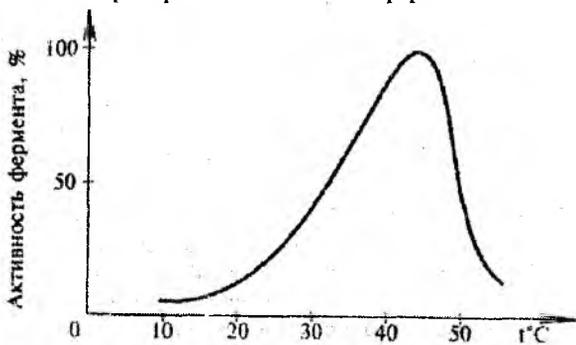


Рис. 1 Влияние температуры на активность фермента

**Специфичность действия ферментов** - одно из главных их свойств. Специфичность - это избирательность фермента по отношению к субстрату (или субстратам). Специфичность действия ферментов объясняется тем, что субстрат должен подходить к активному центру как "ключ к замку".

По гипотезе Д.Кошланда, молекула фермента не жесткая, а гибкая, эластичная, поэтому конформация фермента и его активного центра может изменяться в момент подхода и присоединении субстрата или других лигандов. В момент присоединения субстрат "вынуждает" активный центр фермента принять соответствующую форму. Это можно сравнить с "перчаткой" и "рукой".

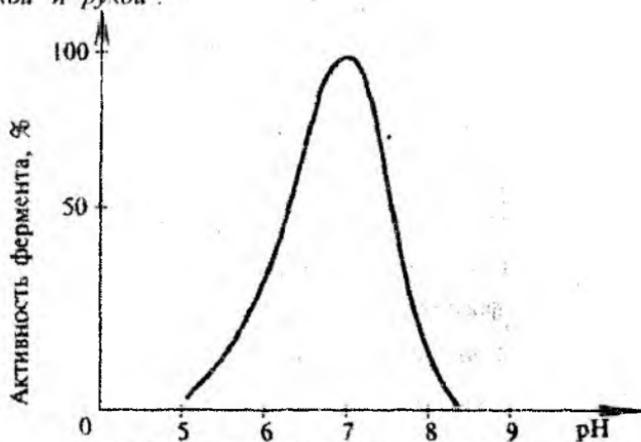


Рис. 2 Влияние pH-среды на активность фермента

Гипотеза "вынужденного соответствия" получила экспериментальное подтверждение. Эта гипотеза позволяет также объяснить причину превращения близких аналогов субстратов.

Катализируемая химическая реакция является тем признаком, по которому можно отличить один фермент от другого. Все известные ферменты подразделяют на шесть классов, охватывающих изученные в настоящее время ферментативные реакции (табл.).

Таблица

Класс ферментов	Тип реакции
<i>Оксидоредуктазы</i>	Окислительно-восстановительные реакции всех типов, лежащие на основе биологического окисления
<i>Трансферазы</i>	Перенос отдельных атомов или групп атомов с одной молекулы на другую (от донора к акцептору)
<i>Гидролазы</i>	Гидролитическое расщепление химических связей
<i>Лиазы</i>	Негидролитическое расщепление химических связей с образованием в молекуле двойных связей или негидролитическое расщепление двойных связей в результате присоединения различных групп по месту её разрыва
<i>Изомеразы</i>	Взаимопревращения различных изомеров (цис-транс изомеризация, перемещение двойных связей и фосфатных групп по углеродной цепи)
<i>Лигазы</i> ( <i>синтазы</i> )	Образование связей при взаимодействии двух или более соединений с использованием энергии распада аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ)

### Ингибирование ферментов

Скорость ферментативных реакций может быть частично снижена или полностью заблокирована определенными веществами, так называемыми ингибиторами ферментов. Некоторые ингибиторы ферментов являются для организма животных и человека эффективными лекарственными веществами, другие - смертельными ядами.

#### Обратимые ингибиторы

Различают три типа обратимого ингибирования ферментов; конкурентное, неконкурентное и бесконкурентное,

Конкурентным называют ингибитор, обратимо взаимодействующий с активным центром фермента. Как правило, конкурентные ингибиторы по структуре похожи на субстрат и могут вытесняться из фермент-ингибиторного комплекса избытком субстрата. Взаимодействие с конкурентным ингибитором не приводит к денатурации или инактивации фермента, поэтому при замене ингибитора на субстрат скорость

ферментативной реакции снижается на определенный период времени, затем восстанавливается (рис.3).

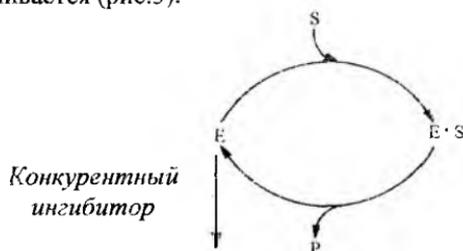
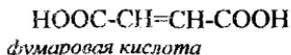
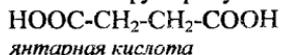


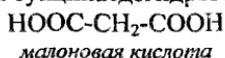
Рис. 3 Схема действия конкурентного ингибитора

При взаимодействии фермента с конкурентным ингибитором изменяется значение  $K_m$  (константа Михаэлиса для исследуемой пары фермент-субстрат) соответствующей ферментативной реакции.

Сходство субстрата и конкурентного ингибитора достаточно для взаимодействия и образования фермент-ингибиторного комплекса, но недостаточно для ферментативной реакции. В качестве примера можно привести действие малоновой кислоты на реакцию, которая катализируется сукцинатдегидрогеназой и связана с превращением янтарной кислоты в фумаровую.

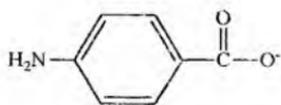


Добавление малоновой кислоты к реакционной смеси снижает или полностью останавливает ферментативную реакцию, так как она является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы.

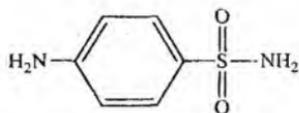


Сходства малоновой кислоты с янтарной достаточно для образования комплекса с ферментом, однако распада этого комплекса не происходит. При увеличении концентрации янтарной кислоты она вытесняет малоновую кислоту из комплекса, в результате активность сукцинатдегидрогеназы восстанавливается.

Многие лекарственные вещества ингибируют ферменты человека и животных по конкурентному типу. Примером могут служить сульфамидные препараты, по структуре сходные с п-аминобензойной кислотой (ПАБК). Это соединение в микробных клетках является интермедиантом фолиевой кислоты - важного компонента нуклеинового обмена. При введении сульфамидных препаратов в организм происходит ингибирование ферментов метаболизма ПАБК, что приводит к снижению синтеза нуклеиновых кислот и гибели микроорганизма.



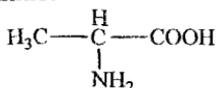
*p*-аминобензоат



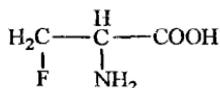
сульфаниламид

В данном случае сульфаниламид является конкурентным ингибитором фермента синтеза фолиевой кислоты.

В структуру пептогликана клеточной стенки бактерий включен D-аланин, отсутствующий в организме животных и человека. Для синтеза клеточной стенки бактерии при помощи фермента аланин-рацемазы превращают животный L-аланин в D-форму. Аланин-рацемаза, характерна для бактерий и не обнаружена у млекопитающих. Следовательно, она представляет хорошую мишень для ингибирования лекарственными препаратами. Замена одного из протонов метильной группы на фтор дает фтораланин, с которым связывается аланин-рацемаза, что приводит к ее ингибированию.



*L*-аланин



$\beta$ -фтораланин

Таким образом, можно конструировать лекарственные вещества, ингибирующие ферменты по конкурентному типу. Чтобы быть эффективным, ингибитор должен иметь высокое сродство к ферменту. В противном случае необходимо назначать большие дозы лекарственных препаратов, чтобы активно конкурировать с эндогенным субстратом за активный центр фермента.

Неконкурентные ингибиторы взаимодействуют с ферментами не в области активного центра, а на каком-то от него удалении, причем никаким избытком субстрата из комплекса не удаляются. При взаимодействии ингибитора с ферментом происходит изменение его конформации с последующей частичной дезинтеграцией активного центра. При взаимодействии фермента с неконкурентным ингибитором изменяется  $V_{\max}$  ферментативной реакции.

Бесконкурентное ингибирование имеет место, когда ингибитор взаимодействует с ферментом только в составе фермент-субстратного комплекса, препятствуя его распаду. Примером необратимого действия ингибиторов на ферменты могут служить фосфорорганические вещества, применяемые в качестве инсектицидов.

#### Ход работы

**Ферменты** - биологические катализаторы белковой природы. Доказательством белковой природы ферментов служит ряд их физико-химических свойств: образование коллоидных растворов, амфотерные

свойства, денатурация при действии солей тяжелых металлов, сильных кислот, щелочей с потерей каталитических свойств.

Характерными свойствами ферментов являются наибольшая активность при определенных значениях температуры (37-40<sup>0</sup>С), рН среды, высокая специфичность действия. На активность фермента оказывает большое влияние и концентрация субстрата: при малых концентрациях реакция протекает с незначительной скоростью, с увеличением его количества реакция ускоряется и при определенной концентрации становится постоянной (насыщение фермента субстратом). Дальнейшее увеличение концентрации субстрата приводит к замедлению реакции. При оптимальной концентрации вещества скорость реакции прямо пропорциональна концентрации фермента в растворе.

На активность ферментов оказывают влияние и химические соединения. Вещества, повышающие активность ферментов, называют активаторами, а понижающие активность - ингибиторами.

Определение скоростей ферментативных реакций и исследование влияния на них различных факторов составляют содержание ферментативной кинетики. Кинетические исследования широко используются для определения сродства субстратов и ингибиторов к ферментам, для установления механизма их действия. К числу главных факторов, влияющих на скорость ферментативных реакций, относятся: концентрации фермента и субстрата, присутствие ингибиторов или активаторов, значение рН, температура среды.

Один из наиболее важных факторов - концентрация субстрата. Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата выражается уравнением Михаэлиса:

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

где  $V$  - скорость ферментативной реакции;  $V_{\max}$  - предельное постоянное значение скорости для данной реакции;  $[S]$  - концентрация субстрата;  $K_m$  - константа Михаэлиса для исследуемой пары фермент-субстрат.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Опыт 1.*

**Обнаружение каталазы в пищевых продуктах.** В две пробирки наливают по 5 капель перекиси водорода. В первую пробирку добавляют 5 капель сырого молока, во вторую — 5 капель кипяченого. В первой пробирке наблюдают выделение газа, который испытывают глеющей лучинкой. Вместо молока можно взять кусочки сырого и вареного мяса или сырого и вареного картофеля.

### *Опыт 2.*

**Обнаружение оксидоредуктазы в молоке.** В первую пробирку наливают 5 капель свежего молока, во вторую — столько же кипяченого. Затем в обе пробирки добавляют по 3 капли формальдегида и по 3 капли 0,1%-го спиртового раствора метиленовой сини. Обе пробирки нагревают на водяной бане при 70°C. Наблюдают обесцвечивание раствора метиленовой сини только в одной из пробирок, в отчете укажите в какой и объясните причину.

### *Опыт 3.*

**Обнаружение тирозиназы в картофеле.** Для получения ферментного препарата тирозиназы сырой картофель очищают от кожуры, верхние слои клубня в количестве 2,0–4,0 г нарезают на кусочки и в ступке растирают с 10 мл дистиллированной воды, фильтруют через два слоя марли. В две пробирки отмеривают по 1 мл полученного фильтрата. Содержимое одной пробирки кипятят 1–2 мин. и охлаждают водопроводной водой. В обе пробирки добавляют по 1 мл 0,1%-го раствора тирозина, содержимое пробирок перемешивают и помещают на водяную баню при 37–40°C. Периодически пробирки энергично встряхивают для лучшего соприкосновения с воздухом. Постепенно в одной пробирке под действием тирозиназы раствор темнеет за счет образования продуктов окисления типа меланинов черного цвета. В контрольной пробирке, в которой фермент инактивирован нагреванием, цвет жидкости не изменяется.

### *Опыт 4.*

**Ферментативный гидролиз крахмала.** В две пробирки наливают по 10 капель 1%-го раствора крахмала. В одну из них вносят 4 капли воды (контроль), а во вторую — 4 капли раствора слюны, разведенной в 5 раз. Перемешивают и ставят в термостат на 15 минут при 37°C. Затем из первой пробирки отбирают 4 капли исследуемого вещества и добавляют 1 каплю 1%-го раствора  $I_2$  в KI. Отмечают результат. Аналогичную

процедуру выполняют с содержимым второй пробирки и результаты опыта заносят в таблицу.

#### **Опыт 5.**

**Ферментативный гидролиз белков.** В контрольную пробирку к 1 мл 10%-го раствора белка приливают 1 мл дистиллированной воды. В опытную пробирку к 1 мл раствора белка приливают 1 мл раствора фермента. Ставят обе пробирки на 20–30 минут в теплую воду при температуре 30–37°C (идет процесс переваривания). Затем в обе пробирки добавляют по 2 мл насыщенного раствора сульфата аммония и по несколько кристаллов этой же соли. В первой пробирке наблюдается обильное выпадение осадка (белка). Во второй пробирке – осадок или вообще не образуется, или выпадает в незначительном количестве, так как белок гидролизовался (переварился).

#### **Опыт 6.**

**Влияние температуры на активность ферментов.** В две пробирки наливают по 10 капель 1%-го раствора крахмала. Затем в одну добавляют 5 капель раствора слюны, разведенной в 5 раз, а в другую – такое же количество предварительно прокипяченной в течение 10 минут слюны (амилаза инактивирована). Пробирки встряхивают и ставят в термостат при 37°C на 15 минут. После этого с содержимым каждой пробирки продельвают реакцию с  $I_2$  и реакцию Троммера.

#### **Опыт 7.**

**Влияние pH среды на активность фермента.** В восемь пробирок наливают по 1 мл дистиллированной воды, а затем в пробирку 1 вносят 1 мл 0,2%-го раствора HCl, перемешивают и отбирают из нее 1 мл смеси, которую переносят в пробирку 2. Перемешивают и отбирают 1 мл, переносят в пробирку 3 и т.д. Из пробирки 8 отбирают 1 мл и выливают. Таким образом, получают различные разведения HCl, которые соответствуют различным значениям pH среды. После этого в каждую пробирку добавляют по 2 мл 1%-го раствора крахмала и по 1 мл раствора слюны, разведенной 1:10. Пробирки встряхивают и ставят в термостат на 15 мин. при 37°C, затем охлаждают и добавляют во все пробирки по 1 капле 1%-го раствора  $I_2$  в KI. Отмечают, что полный гидролиз крахмала произошел в пробирках 5 и 6, где pH=6,8–7,2, т. е. оптимально для действия амилазы.

#### **Опыт 8.**

**Влияние активаторов и ингибиторов на активность ферментов.** В первую пробирку вносят 1 каплю 3%-го раствора NaCl, во вторую пробирку – 1 каплю 1%-го раствора  $CuSO_4$ , а в третью – 1 каплю воды. Затем во все пробирки добавляют по 10 капель слюны в разведении 1:5.

Перемешивают и вносят в каждую пробирку по 5 капель 1%-ного раствора крахмала и оставляют на 15–20 мин при 30°C. После этого вносят во все пробирки по 1 капле 1%-го раствора  $I_2$  в KI. По результатам наблюдений делают выводы об активирующей или ингибирующей способности исследуемых солей.

#### Вопросы и задачи для самостоятельной работы и для контроля знаний

1. Правила техники безопасности при выполнении работы.
2. Понятие о ферментах.
3. Классификация ферментов.
4. Строение фермента.
5. Как можно обнаружить присутствие фермента в исследуемом материале?
6. Перечислите основные факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции.
7. Чем обусловлена специфичность ферментов?
8. Понятие об ингибиторах и активаторах.
9. Обратимое и необратимое ингибирование.
10. Методы исследования свойств сахаразы.
11. Методы исследования свойств амилазы.
12. Методы проведения биохимической реакции.
13. Особенность действия фосфорорганических соединений на фермент холинэстеразу.
14. Уравнение реакции гидролиза: сахарозы, крахмала, бутирилхолинйодида.
15. Напишите схему реакции трансаминирования тирозина и  $\alpha$ -оксоглутаровой кислоты. Опишите химическую основу действия кофермента пиридоксальфосфата в ходе этой реакции.
16. По какому механизму взаимодействуют  $\alpha$ -аминокислота и пиридоксальфосфат, а также  $\alpha$ -оксокислота и пиридоксаминфосфат в реакции трансаминирования? Напишите схему реакции в одном из направлений.
17. Приведите строение *альдимина*, в результате реакции гидролиза которого были получены пиридоксаминфосфат и пировиноградная кислота.
18. Из какого субстрата путем декарбоксилирования образуется в организме нейромедиатор серотонин (5-гидрокситриптамин)? Напишите схему реакции с участием пиридоксальфосфата.
19. Напишите схему реакции окисления этанола в уксусный альдегид с участием кофермента НАД\*.
20. Напишите схему реакции восстановления уксусного альдегида в этанол с участием кофермента НАДН.
21. Напишите схему реакции превращения пировиноградной кислоты в молочную с участием кофермента НАДН.
22. Какое соединение получается в результате реакции окисления молочной кислоты с участием кофермента НАД\*? Напишите схему реакции.
23. Напишите схему превращения цистина в цистин с участием кофермента НАД\*. Какое соединение в этой реакции окисляется, а какое - восстанавливается?
24. В организме осуществляется превращение 3-оксобутановой кислоты в 3-гидроксипропановую. В какой форме - НАД\* или НАДН - участвует в этой реакции кофермент?

25. Напишите схему реакции взаимодействия глицина с АТФ. Назовите продукты реакции.
26. Напишите схему реакции образования ацетиладенилата
27. Напишите схему реакции взаимодействия изолейцина с АТФ. Почему полученное соединение более активно в последующей реакции с тРНК, чем изолейцин?
28. В организме образованию ацил-КоА предшествует стадия активации жирной кислоты с помощью АТФ. Напишите схему реакции взаимодействия пальмитиновой кислоты с АТФ. Как называется вновь образующаяся связь?
29. В биосинтезе гликогена принимает участие активная форма глюкозы. Напишите схему реакции взаимодействия 1-фосфата D-глюкопиранозы с уридинтрифосфатом, если известно, что в результате реакции выделяется дифосфат.
30. Одной из стадий гликолиза является реакция взаимодействия глюкозы с АТФ, в результате чего образуются 6-фосфат D-глюкозы и АДФ. Напишите схему этой реакции. Как называется вновь образованная связь?

### *Лабораторная работа №6*

## **ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕОПРОТЕИНОВ В ГИДРОЛИЗАТЕ ДРОЖЖЕЙ**

### *Цель работы:*

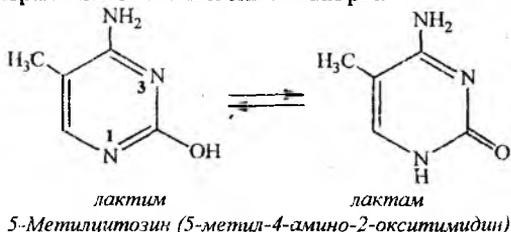
1. Провести кислотный гидролиз пекарских дрожжей;
2. Изучить некоторые продукты гидролиза дрожжей;
3. Привить навыки работы с химической посудой, реагентами;
4. Закрепить полученные знания по строению нуклеиновых кислот;
5. Ознакомить с качественными реакциями, подтверждающими состав продуктов гидролиза;
6. Привить навыки работы с литературой и умения формулировать выводы.

### *Реактивы и посуда:*

1. Пекарские дрожжи
2. Серная кислота (10 % водный раствор).
3. Гидроксид натрия (10 % водный раствор).
4. Гидроксид натрия (30 % водный раствор).
5. Сульфат меди (1 % водный раствор).
6. Сульфат меди (7 % водный раствор).
7. Аммиак (концентрированный раствор).
8. Нитрат серебра (1 % водный раствор).
9. Молибденовая жидкость.
10. Колба.
11. Обратный холодильник.
12. Песчаная баня.
13. Воронка.
14. Бумажный фильтр.
15. Пробирки.
16. Весы.
17. Пипетка мерная на 1 мл.

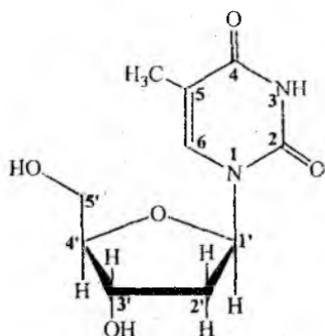
**Нуклеиновые кислоты.** Нуклеиновые кислоты могут быть разделены на два класса: рибонуклеиновые кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК). И те, и другие являются линейными полимерами нуклеотидов, состоящих из пуриновых или пиримидиновых оснований (*нуклеиновых оснований*), углевода и фосфата.

**Нуклеиновые основания.** Для всех нуклеиновых оснований, характерны лактим-лактазная таутомерия и преобладание лактамной формы при нейтральных и кислых значениях pH:

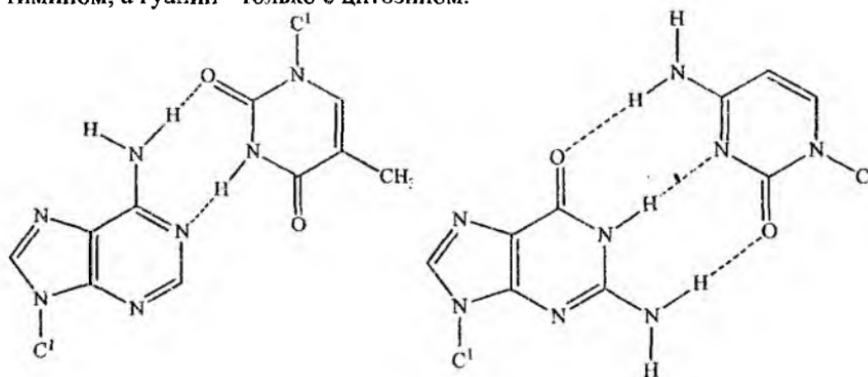


**Нуклеозиды.** Нуклеозидами называются компоненты нуклеиновых кислот, относящиеся по своей природе к N-гликозидам. Агликонами этих гликозидов являются пять основных нуклеиновых оснований: аденин, гуанин, тимин, урацил и цитозин. В качестве моносахаридного остатка в состав нуклеозидов (*аденозина, гуанозина, тимидина, уридина и цитидина*) входят остатки только одной пентозы - рибозы, либо в её неизменённом виде (в РНК), либо без гидроксильной группы при C<sup>2</sup> (2-дезоксирибоза в ДНК). При этом тимидин встречается в основном только в составе ДНК; название "*тимидин*" относится к β-(N-тиминил)-D-2-дезоксирибофуранозиду. Если рассматривается гликозид, состоящий из тимина и рибозы (такой нуклеозид встречается в составе транспортной РНК), его называют "*тиминрибонуклеозид*" или "*рибозотимин*". Названия "*аденозин, гуанозин, уридин и цитидин*" относятся только к рибозидам; для обозначения 2-дезоксирибозидов перед каждым названием вводят приставку "*дезокси*" (*дезоксиаденозин, дезоксигуанозин, дезоксиуридин и дезокситимидин*). При записях структур ДНК и РНК нуклеозиды обозначают латинской буквой, соответствующей первой букве их названия: *аденозин-А, гуанозин-Г, тимидин-Т, уридин-У* и *цитидин-С*.

В нуклеозидах β-гликозидная связь всегда образована с участием атома N<sup>1</sup> пиримидиновых или N<sup>9</sup> пуриновых оснований, причём в образовании такой связи может принимать участие только лактамная форма нуклеиновых оснований. Нумерация атомов в нуклеозидах для остатков нуклеиновых оснований и остатков пентоз производится по-разному: остатки нуклеозидов нумеруют в соответствии с правилами нумерации пуринов или пиримидинов, а атомы пентоз обозначают в соответствии с правилами нумерации моноз, но цифрой со штрихом:



Особенностью ДНК является эквивалентность количеств пуриновых оснований количествам пиримидиновых оснований, т.е. отношения аденин:тимин, гуанин:цитозин (+ метилцитозин, если он имеется) всегда равны единице. Это соотношение объясняется тем, что пространственная структура ДНК создаётся за счёт образования водородных связей между остатками нуклеиновых оснований, причём аденин связывается, только с тимином, а гуанин - только с цитозином:



Водородные связи в паре оснований А - Т

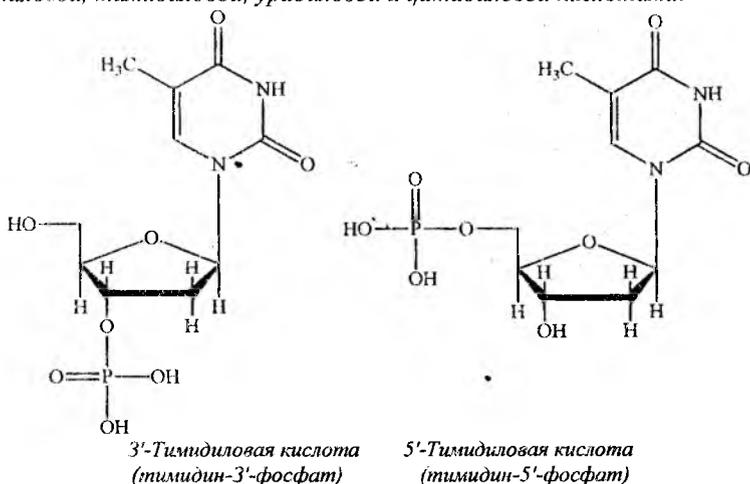
Водородные связи в паре оснований G - C

Наличие водородных связей подтверждено данными кислотно-щелочного титрования ДНК и рентгеноструктурными исследованиями; последние показали множественность таких водородных связей. Парные основания получили название *комплементарных*. Комплементарность нуклеиновых оснований лежит в основе корреляции между структурой и функцией нуклеиновых кислот.

Вторым не менее важным фактором стабилизации пространственной структуры ДНК является штабелеобразная укладка (*stacking, стэкинг*)

планарных квазиароматических пиримидиновых и пуриновых оснований, расположенных в молекуле ДНК одно над другим, которая приводит к возникновению цементирующих каркас молекулы гидрофоб-гидрофобных взаимодействий.

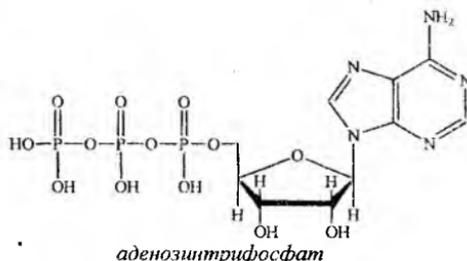
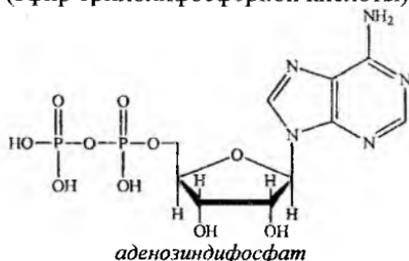
**Нуклеотиды.** Нуклеотиды представляют собой те самые мономерные звенья, соединение которых в полимерную цепь приводит к молекулам нуклеиновой кислоты. При химическом или ферментативном гидролизе нуклеотидов образуются нуклеозиды и ортофосфорная кислота, из чего следует, что нуклеотиды являются эфирами нуклеозидов и фосфорной кислоты. Фосфорная кислота присоединена к одной из гидроксильных групп углеводного остатка; при этом монозамещённая фосфорная кислота сохраняет свои кислотные свойства, поэтому нуклеотиды являются сильными кислотами и называются, соответственно, *адениловой, гуаниловой, тимидиловой, уридиловой и цитидиловой кислотами*:



Обычно используются названия нуклеотидов, построенные по схеме «нуклеозид-№-фосфат», где «№» означает номер атома С в остатке пентозы, несущего фосфатную группу (аденозин-3'-фосфат, дезоксиаденозин-3'-фосфат и т.п.). Фосфорилирование сахарного остатка возможно только по положениям С<sup>3'</sup> и С<sup>5'</sup>, так как атомы С<sup>1'</sup> и С<sup>4'</sup> включены в фуранозный цикл; хотя атом С<sup>2'</sup> у дезоксирибозы не имеет гидроксильной группы, дезоксирибоза образует нуклеотиды так же, как и рибоза, имеющая группу ОН при С<sup>2'</sup>, поэтому размещение фосфатной группы у атома С<sup>2'</sup> маловероятно. Оба типа фосфатов были выделены после гидролиза ДНК; поскольку большинство нуклеотидов являются моноэфирами, их называют *моонуклеотидами*. При щелочном гидролизе нуклеиновых кислот возможна изомеризация, сопряжённая с

перемещением остатка фосфорной кислоты, поэтому при таком гидролизе получаются все изомерные мононуклеотиды; ферментативный гидролиз и ДНК, и РНК приводит только к 3'- и 5'-фосфатам.

Все клетки содержат свободную форму адениловой кислоты - *аденозин-5'-фосфат*, а также производные с полифосфатным остатком, которые образуются в организме при фосфорилировании - *аденозин-5'-дифосфат* (эфир пирофосфорной кислоты) и *аденозин-5'-трифосфат* (эфир триполифосфорной кислоты):



Широко распространены 5'-моно-, 5'-ди- и 5'-трифосфаты и других нуклеозидов; для облегчения использования названий этих соединений применяется специальная система обозначений, в которых употребляются сокращённые наименования нуклеозидов и обозначения MP, DP и TP для моно-, ди- и трифосфата, соответственно. Для дезокси-нуклеотидов перед обозначением нуклеотида ставится буква d:

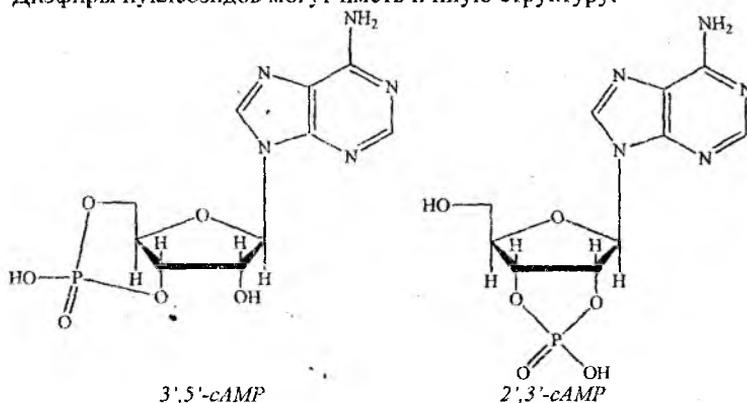
- аденозинмонофосфат (адениловая кислота) AMP
- аденозиндифосфат ADP
- аденозинтрифосфат ATP
- дезоксиаденозинмонофосфат dAMP и т.п.

Первым выделенным (ещё в 1847 году) мононуклеотидом была инозиновая кислота (9-β-5'-фосфо-D-рибозилгипоксантин); это соединение явилось результатом дезаминирования AMP в процессе выделения. Позднее она была найдена в тканях, а также в некоторых нуклеиновых кислотах; доказано, что инозиновая кислота представляет собой первый пуриновый нуклеотид, образующийся в ходе биосинтеза AMP и GMP.



Моно- и дифосфаты являются кислыми соединениями, и их кислотная природа предопределяет использование ионообменной хроматографии для их выделения и разделения. Адсорбция смеси фосфатов на аниообменной смоле с последующей элюцией их возрастающей концентрацией кислоты или соли является стандартным приёмом для выделения и анализа нуклеотидов. Особенно удобны для этих целей модифицированные целлюлозы и декстраны, обеспечивающие наибольшую селективность. Нуклеотиды обладают сильным поглощением в ультрафиолетовой части спектра за счёт гетероциклических соединений, благодаря чему могут быть легко обнаружены в элюате и количественно оценены.

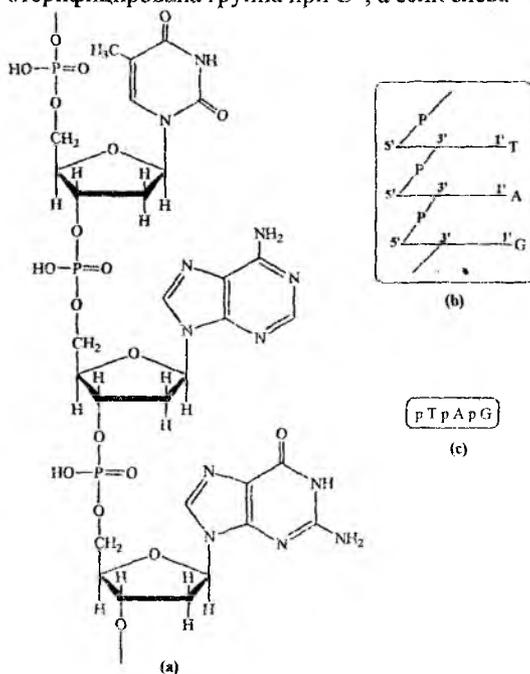
Диэфиры нуклеозидов могут иметь и иную структуру:



Остаток ортофосфорной кислоты способен этерифицировать одновременно два спиртовых гидроксила пентозного остатка давая циклические диэфиры, содержащие один атом фосфора на один нуклеотид - аденозин-3',5'-циклофосфат (цикло-АМР сАМР) и гуанозин-3',5'-циклофосфат (цикло-GMP, сGMP). Известны также циклические 2',3'-монофосфаты, среди которых особенно важное физиологическое значение имеет аденозин-2',3'-монофосфат.

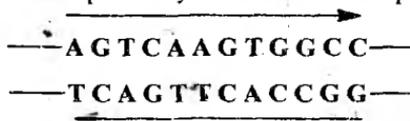
**Нуклеиновые кислоты.** Нуклеиновые кислоты представляют собой полинуклеотиды, в которых отдельные нуклеотиды связаны фосфодиэфирными мостиками, образующимися в результате этерификации гидроксильной группы при  $C^3'$  одного полинуклеотида остатком фосфорной кислоты при  $C^5'$  другого нуклеотида. Фосфодиэфирная связь характерна и для РНК, и для ДНК, так как в её образовании не участвует атом  $C^2'$ , замещение которого отличает РНК и ДНК друг от друга. Доказательства наличия фосфодиэфирных мостиков получены при изучении результатов ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот. Последовательный гидролиз нуклеиновых кислот

панкреатической дезоксирибонуклеазой и фосфодиэстеразой змеиного яда приводит к образованию нуклеозид-5'-фосфатов. При гидролизе нуклеиновых кислот панкреатической дезоксирибонуклеазой в комбинации с фосфодиэстеразой селезёнки получаются нуклеозид-3'-фосфаты. Изображение структуры нуклеиновых кислот привычными структурными формулами оказывается слишком громоздким, поэтому для описания последовательностей нуклеиновых кислот можно использовать более краткие записи. В первом варианте остатки пентоз изображаются горизонтальными линиями, на которых указаны условные положения всех атомов углерода пентозы, участвующих в образовании молекулы (1', 3' и 5'). На конце черты возле атома C<sup>1'</sup> указывают обозначение нуклеинового основания (на приведённой схеме тимин, аденин и гуанин), а атомы C<sup>3'</sup> и C<sup>5'</sup> соединяют через атом P. Второй вариант обозначения - буквенная система, в которой используются буквенные обозначения нуклеиновых оснований (A, G, T, U, C), а фосфатная группа обозначается буквой "p". Если она находится справа от обозначения нуклеинового основания, это означает, что этерифицирована группа при C<sup>3'</sup>, а если слева - при C<sup>5'</sup>.



Списание нуклеотидной последовательности нуклеиновой кислоты так р жает её первичную структуру. Расположение длинной линейной

полинуклеотидной цепи в пространстве отражается в её *вторичной структуре*. Вторичные структуры ДНК и РНК различны. Согласно модели Уотсона и Крика, в молекулах ДНК полинуклеотидная цепь спирализована в правую спираль с периодом идентичности 3,4 нм и расстоянием между плоскостями оснований 0,34 нм. Две цепи сплетены друг с другом в закрученную вокруг одной оси *двойную спираль* так, что на каждый виток спирали приходится 10 пар оснований; диаметр спирали равен 2,0 нм. Обе цепи удерживаются друг около друга за счёт водородных связей между парами А-Т (аденином и тиминном) и G-С (гуанином и цитозином), находящимися внутри двойной спирали. Расстояния между гликозидными связями, соединяющими парные основания с сахарофосфатным остатком, одинаковы для каждой пары и равны 1,085 нм. Эти связи симметрично ориентированы относительно, оси второго порядка, расположенной определённым образом по отношению к плоскости, в которой расположены плоские остатки парных нуклеиновых оснований. Комплементарность нуклеиновых оснований приводит к комплементарности цепей, т.е. образование двойной спирали становится возможным только тогда, когда каждому основанию в одной цепи противостоит комплементарное ему основание во второй цепи:



Направление цепей в двойной спирали по отношению к межнуклеотидным связям (фосфодиэфирным мостикам) взаимно противоположно, т.е. цепи антипараллельны. Если например, на приведённой выше формуле в верхней цепи фосфодиэфирные связи между А и G и далее принадлежат к типу 5'→3' то в нижней цепи связи между основаниями Т и С, комплементарными основаниям А и G, принадлежат к типу 3'→5'. Описанное выше строение ДНК установлено для так называемой *β-формы* ДНК, степень кристалличности которой была определена при влажности образца около 90%. Считается, что такая форма характерна для ДНК, находящейся в растворе и *in vivo*. При снижении влажности препарата до 70% *β-форма* переходит в более высококристаллическую *α-форму*, в которой пары оснований повёрнуты на 20° от плоскости, перпендикулярной оси спирали; на один оборот спирали (период идентичности 2,8 нм) приходится 11 остатков нуклеотидов; ширина двойной правосторонней спирали составляет 2,2 нм. Переход от *β-формы* к *α-форме* укорачивает цепь примерно на 25%. Ещё одна вторичная структура, в которой может существовать ДНК, называется *С-формой*; в ней шаг спирали составляет 3,3 нм, а на каждом витке спирали располагается 9 пар оснований.

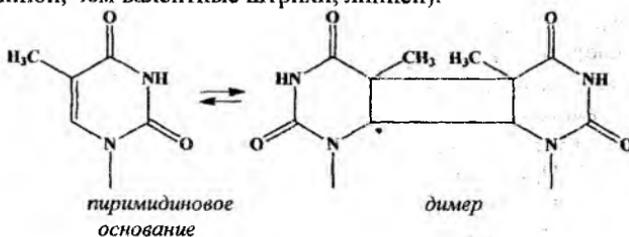
*Вторичная структура РНК* изучена менее подробно, чем структура ДНК. Большинство видов клеток содержат три принципиально различных типа РНК. Они различаются последовательностью нуклеотидных звеньев, длиной цепи и пространственной организацией. Основная масса РНК клетки представлена *рибосомальной РНК* (рРНК), представляющей собой ковалентно связанные линейные одноцепочечные молекулы. Рибосомальные РНК отличаются у различных видов по длине цепи и первичной последовательности, но общие принципы построения макромолекулы у них одинаковы. Второй тип РНК - *транспортные РНК* (тРНК); эти кислоты составляют 10-15% от общей массы клеточных РНК и содержатся в цитоплазме клетки. В клетке млекопитающих может содержаться до 100 млн молекул тРНК примерно пятидесяти различных типов; длина каждой из них составляет от 73 до 85 нуклеотидных звеньев. Третий тип РНК — *информационная РНК* (или *матричная РНК*, мРНК), которая переносит информацию к месту синтеза белков. мРНК составляет только 3-5% от общего количества РНК в клетке, содержит примерно 1000 нуклеотидов, гетерогенна по размеру и очень быстро распадается в организме (период полураспада от 1 мин у бактерий до 0,5 дня в опухолевых клетках человека). Помимо перечисленных типов РНК во всех клетках животных существует много малых РНК, функциональные роли которых ещё не до конца выяснены.

Однонитевые макромолекулы всех типов РНК свёрнуты в клубки, отдельные участки которых могут быть спирализованы в двойную спираль за счёт спаривания азотистых оснований в этих участках. Чем больше ионная сила раствора, в котором находится РНК, тем больше доля спирализованных участков. В образовании таких спирализованных структур, чередующихся с аморфными участками, принимают участие от 40 до 70 % всех нуклеотидов РНК. Наибольший процент спирализации обнаружен у тРНК. При нагревании растворов РНК наблюдается переход "*спираль - клубок*" (так называемое молекулярное плавление). Особенностью молекул РНК является наличие в её цепях "необычных нуклеотидов": псевдоуридина и дигидроуридина, метилированных адениловой, гуаниловой и цитидиловой кислот и др.

Вторичная структура и ДНК, и РНК в значительной степени определяется водородными связями между парами комплементарных азотистых оснований, поэтому любые воздействия, способные разрушать водородные связи, могут менять пространственную организацию нуклеиновых кислот. Полный или частичный разрыв водородных связей, ведущий к раскручиванию полинуклеотидных цепей нуклеиновой кислоты и их последующему разделению, называется *денатурацией*. Поскольку пара G-C несколько прочнее пары A-T и образует более компактную структуру, нуклеиновые кислоты с более высоким содержанием G-C менее чувствительны к денатурации, которая происходит под действием тепла,

при изменении рН (до 2-3 или до 12), понижении диэлектрической проницаемости среды, в присутствии спиртов, высоких концентраций мочевины, амидов и т.п. При контакте с положительно заряженными молекулами происходит внедрение катионов между стопками пар оснований за счёт взаимодействия квазиароматических электронных облаков азотистых оснований с вакантными орбиталями катионов; в результате наблюдается раскручивание (*интеркаляция*) двойной спирали или суперспирали (суперскрученной конформации, которую принимают замкнутые в кольцо двухспиральные ДНК). Кроме того, такие соединения, как амиды (формамид, мочевина), увеличивая сольватацию ароматических ядер азотистых оснований молекулами воды, также способствуют разрыву водородных связей между основаниями. Денатурация нуклеиновых кислот может быть обратимым процессом; скорость ренатурации тем больше, чем меньше степень денатурации. Например, при полной денатурации ДНК нагреванием две комплементарные нити реассоциируют очень медленно (происходит так называемый "*отжиг ДНК*") и только при медленном охлаждении раствора ДНК. При быстром охлаждении степень ренатурации невелика.

Нарушение вторичной структуры ДНК возникает и под действием ультрафиолетовой радиации, которая вызывает образование ковалентных связей между двумя пиримидиновыми основаниями, находящимися в одной и той же цепи (в приводимой далее формуле эти связи показаны более длинной, чем валентные штрихи, линией).



Образование таких димеров подавляет функционирование ДНК. Восстановить функции ДНК в живых клетках удастся только под действием специальных репарационных ферментов.

Для качественного анализа химического состава нуклеопротеидов может быть использован гидролизат дрожжей как объект, богатый нуклеопротеидами. При частичном гидролизе нуклеопротеиды распадаются на белок (протамины или гистоны) и нуклеиновые кислоты. При полном гидролизе нуклеопротеинов могут быть обнаружены: полипептиды (*биуретовая реакция*), пуриновые основания дают специфическую реакцию образования осадка солей серебра; фосфорную кислоту обнаруживают молибдатом аммония, рибозу или дезоксирибозу - по

реакции "серебряного серебра", с реактивом Фелинга или пробой Троммера.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### **Опыт 1**

**Проведение гидролиза.** В колбу помещают 0,5 г пекарских дрожжей, приливают 4 мл 10% раствора серной кислоты и кипятят на песчаной бане 1 час. Колбу охлаждают, и содержимое фильтруют через складчатый фильтр. Фильтрат делят на 4 части.

### **Опыт 2**

**Биуретовая реакция.** К 0,5 мл гидролизата добавляют 10 капель раствора гидроксида натрия (10%) до щелочной реакции среды и 2 капли раствора сульфата меди.

*Аналитический эффект: смесь окрашивается в фиолетовый цвет.*

### **Опыт 3**

**Серебряная проба на пуриновые основания.** К 1 мл гидролизата прибавляют 1 каплю раствора аммиака и 5 капель раствора нитрата серебра.

*Аналитический эффект: через 3-5 минут образуется бурый рыхлый осадок серебряных солей пуриновых оснований (аденина и гуанина).*

### **Опыт 4**

**Проба Троммера на рибозу и дезоксирибозу.** К 0,5 мл гидролизата добавляют 10 капель раствора гидроксида натрия (30%) и 2-3 капли раствора сульфата меди (7%). Смесь перемешивают и нагревают.

*Аналитический эффект: через 3-5 минут образуется желтый или оранжевый осадок соединений меди (I).*

### **Опыт 5**

**Реакция на фосфорную кислоту.** К 20 мл молибденовой жидкости добавляют 3-4 капли гидролизата и кипятят на спиртовке.

*Аналитический эффект: через 3-5 минут смесь приобретает лимонно-желтый цвет или выпадает лимонно-желтый осадок. Полученные результаты оформляют в виде таблицы.*

Таблица

Реагент	Биуретовая реакция	Серебряная проба	Проба Троммера	Молибденовая жидкость
Аналитич. эффект				

**Выводы:** кратко описывают условия кислотного гидролиза дрожжей и результаты качественных реакций продуктов гидролиза.

#### Вопросы и задачи для самостоятельной работы и для контроля знаний

1. Расскажите правила техники безопасности при выполнении опытов.
2. Строение нуклеопротеидов.
3. Продукты гидролиза нуклеиновых кислот.
4. Функции нуклеиновых кислот.
5. Классификация нуклеиновых кислот.
6. Структуры ДНК и РНК.
7. Процессы транскрипции, трансляции, репликации.
8. Правила Чархгаффа.
9. Сходства и различия в строении ДНК и РНК.
10. Перечислите цветные реакции на продукты гидролиза нуклеиновых кислот.
11. Укажите условия выделения казеина из молока.
12. Напишите схему таутомерных превращений тимина. Какой из таутомеров преобладает в равновесной смеси?
13. Напишите таутомерные формы гуанина и укажите более устойчивую из них.
14. Напишите схему лактим-лактаминной таутомерии цитозина. Какая из таутомерных форм преобладает и почему?
15. Приведите строение тимидина. В какой таутомерной форме входит в его состав нуклеиновое основание?
16. Приведите строение дезоксицитидина. Какую конфигурацию имеет аномальный атом углерода в углеводном остатке?
17. Приведите строение аденозина. Укажите N-гликозидную связь. Будет ли гидролизоваться N-гликозидная связь в кислой среде?
18. Какое отличие в составе таутомеров наблюдается у минорного нуклеинового основания I-N-метилгуанина по сравнению с гуанином?
19. Какое основание комплементарно по отношению к тимину? Приведите строение этой комплементарной пары и обозначьте водородные связи.
20. Приведите строение комплементарных пар нуклеиновых оснований, входящих в состав ДНК. Между какими атомами возникают водородные связи?
21. Составьте из перечисленных гетероциклических соединений комплементарные пары: гуанин, цитозин, пиримидин, аденин, пиридин, гуанин. Напишите структурные формулы оснований, входящих в состав комплементарных пар и укажите водородные связи.
22. Какая из двух комплементарных пар - UA или TA — входит в состав ДНК? Приведите строение выбранной пары и обозначьте водородные связи.

23. Какое основание получится в результате реакции взаимодействия гуанина с азотистой кислотой? Напишите схему реакции. С каким основанием образует комплементарную пару получившееся соединение?
24. Какое основание получается при взаимодействии аденина с азотистой кислотой? Напишите схему реакции. Для полученного соединения покажите комплементарное взаимодействие с соответствующим основанием.
25. Какие продукты образуются при: а) частичном; б) полном гидролизе нуклеиновых кислот?
26. Какой из нуклеозидов имеет наименьшее число атомов кислорода в молекуле? Напишите его структурную формулу.
27. Какой из нуклеотидов имеет наибольшее число атомов кислорода в молекуле? Напишите его структурную формулу.
28. Установите структуру нуклеотида, имеющего молекулярную формулу  $C_{10}H_{14}N_5O_6P$ .
29. Установите структуру нуклеотида, имеющего молекулярную формулу  $C_9H_{14}N_3O_8P$ .
30. В одной из цепей ДНК аденина 29% (мольная доля), гуанина 26%, тимина 21%. Определите мольное содержание оснований в комплементарной цепи.
31. Органическое основание X образуется при гидролизе некоторых нуклеотидов. При полном сгорании 1,68 г этого основания образовалась газовая смесь, которую пропустили через трубку с негашеной известью (оксидом кальция). Масса трубки увеличилась на 3,18 г. Содержимое трубки промыли большим количеством воды. Масса нерастворившегося остатка составила 6,00 г. Установите структурную формулу вещества X и приведите два уравнения реакций, характеризующих его химические свойства.
32. При обработке продуктов гидролиза 4,83 г дезоксирибонуклеотида, содержащего 8,70% азота по массе, избытком известковой воды выпало 2,325 г осадка. Установите структурную формулу дезоксирибонуклеотида и напишите уравнения реакций.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алейникова Т.Л. и др. Руководство к практическим занятиям по биоорганической химии / Под ред. Е.С.Северина. М.: Медицина, 2000. С. 126
2. Пустовалова Л.М. Практические работы по биоорганической химии. Ростов н/Д: Феникс, 2004. С. 319.
3. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биоорганической химии / Под ред. А.Я. Николаева. М.: Высшая школа, 1988, С. 239.
4. Основы биоорганической химии / Под ред. А.А. Анисимова. М.: Высшая школа, 1986. С. 551.
5. Николаев А.Я. Биологическая химия. М.: Медицинское информационное агентство, 2004. С. 565.
6. Комов В.П., Шведова В.Н. Биохимия. М.: Дрофа, 2004. С. 637.
7. Кухта В.К. и др. Основы биоорганической химии. М.: Медицина, 1999. С. 416.
8. Биохимия. Тесты и задачи / Под ред. Е.С. Северина. М.: Веди, 2005. С. 366.
9. Володина Г.Б., Якушина И.В. Лабораторный практикум по органической химии: Учеб. пособие. Тамбов.: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2004. С. 80.

Подписано к печати 25.07.2011. Объем 5,25 п.л.  
Формат 60x84 1/16. Тираж 100 экз. Заказ 342.  
Отпечатано в типографии Национального университета  
Узбекистана им. М.Улутбека

Таблица-1. Результаты эксперимента

№	Аминокислота	Внешний вид	Растворимость в воде рН	Растворимость в органических растворителях	Отношение к кислоте	Отношение к щелочи	Отношение к нагреванию	Примечание
1								
2								
3								
4								

#### СОКРАЩЕНИЯ

АДФ	- аденозиндифосфат
АМФ	- аденозинмонофосфат
АТФ	- аденозинтрифосфат
АХАТ	- ацилхолестеролацилтрансфераза
ГАМК	- γ-аминомасляная кислота
ГМГ-	- 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А
ГМФ	- гуанозинмонофосфат
ГТФ	- гуанозинтрифосфат
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ДОФА	- диоксифенилаланин
КоА	- кофермент (коэнзим) А
ЛПВП	- липопротеины высокой плотности
ЛПНП	- липопротеины низкой плотности
ЛПОНП	- липопротеины очень низкой плотности
ЛППП	- липопротеины промежуточной плотности
ЛХАТ	- лецитинхолестеролацилтрансфераза
мРНК	- матричная РНК
мяРНП	- малые ядерные рибонуклеопротеины
РНК	- рибонуклеиновая кислота
рРНК	- рибосомная РНК
тРНК	- транспортная РНК
ТДФ	- тиаминдифосфат
УДФ	- уридиндифосфат
УТФ	- уридинтрифосфат
ФИФ2	- фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат
цАМФ	- циклический аденозинмонофосфат

ЦУК	- щавелевоуксусная кислота (оксалоацетат)
FAD	- окисленный флавинадениндинуклеотид
FADH <sub>2</sub>	- восстановленный флавинадениндинуклеотид
FMN	- окисленный флавиномононуклеотид
FMNH <sub>2</sub>	- восстановленный флавиномононуклеотид
Hb	- гемоглобин
HbA	- нормальный гемоглобин взрослого человека
HbF	- фетальный гемоглобин
Hb(O <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	- оксигемоглобин

### Лабораторная работа №1

## ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ АМИНОКИСЛОТ

### Цель работы:

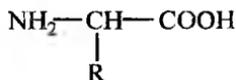
1. Изучить некоторые физические и химические свойства аминокислот;
2. Привить навыки работы с химической посудой;
3. Закрепить полученные знания и навыки на конкретных примерах исследования свойств глицина, аланина;
4. Ознакомить с побочными процессами, проходящими при проведении качественных реакций;
5. Привить навыки работы с литературой и умение формулировать выводы.

Общее число встречающихся в природе аминокислот достигает 300, однако некоторые из них обнаружены лишь в определенном сообществе или даже в одном организме.

Поэтому аминокислоты живых организмов можно разделить на *протеиногенные* (кодируются генетическим кодом) и *непротеиногенные* (не кодируются генетическим кодом). Протеиногенных аминокислот 20; 19 из них являются  $\alpha$ -аминокислотами.

*Аминокислоты* можно рассматривать как производные карбоновых кислот, в которых один из атомов водорода замещен на группу NH<sub>2</sub>.

$\alpha$ -аминокислоты содержат аминогруппу у ближайшего к карбоксильной группе атома углерода. Общая формула  $\alpha$ -аминокислот:



Названия аминокислот образуются по международной номенклатуре (*амино + углеводород + овая кислота*), но чаще используют тривиальные названия.