

УТВЕРЖДЕНЫ
Советом факультета
химии, биологии и
биотехнологии
Председатель совета
факультета



Ф.А. Агаева

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ
ПО ТЕМЕ «БЕЛКИ»**

**для студентов - бакалавров, обучающихся по направлениям подготовки
04.03.01 –Химия, 44.03.05 – Педагогическое образование (с двумя профилями
подготовки)**

Профили Химия, Биология

УДК 542
ББК 28.707.2
М

Методические указания к лабораторному практикуму по теме «Белки» предназначены для студентов - бакалавров, обучающихся по направлениям подготовки 04.03.01 –Химия, 44.03.05 – Педагогическое образование (с двумя профилями подготовки) Профили Химия, Биология и рекомендованы для использования в учебном процессе советом факультета химии, биологии и биотехнологии (протокол № 12 от «30» июня 2019 г.)

Председатель _____ Агаева Ф.А.

Составители: канд. хим. наук, доц. Н.А. Саламова,
канд. хим. наук, доц. А.А. Арутюнянц

Научный редактор: канд. хим. наук, доц. И. М. Бигаева

Рецензент: докт. хим. наук, проф. Н.Ф. Бирагова
(ФГБОУ ВО «СКГМИ (ГТУ)»)

Лабораторная работа. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ

Цель лабораторной работы – определить химическую природу белков.

Задачи:

1. Ознакомиться с методами выделения и фракционирования белков
2. Определить изоэлектрическую точку белка
3. Провести высаливание белка

Белки, или протеины, – это высокомолекулярные полимеры биогенного происхождения, состоящие из аминокислот, соединенных пептидными связями. Биологические функции белков: структурная, энергетическая, каталитическая, транспортная, сократительная, регуляторная, а также защитная. Простые белки состоят только из остатков аминокислот.

Их делят на 6 групп:

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

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

Аминокислотный состав белков определяют путем их кислотного гидролиза с последующим разделением образовавшихся свободных аминокислот при помощи ионообменной хроматографии.

Аминокислоты в молекуле белка соединены между собой пептидными связями (–CO–NH–), образуя полипептидные цепи. Пептидная связь возникает между

карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой, что сопровождается выделением молекулы воды.

Вторичная структура возникает за счет образования водородных связей между группами N–H и O=C данной полипептидной цепи, что приводит к упорядоченному расположению гибкой полипептидной цепи в виде спиральной или складчатой структуры.

Третичная структура

возникает в результате взаимодействия между боковыми цепями аминокислотных остатков полипептидных цепей. К таким взаимодействиям относятся водородные, дисульфидные и ионные связи, ван-дер-ваальсовы и гидрофобные силы. В результате таких взаимодействий полипептидная цепь сворачивается очень сложным, но вместе с тем определенным образом, приобретая характерную пространственную конфигурацию. Межмолекулярные взаимодействия между отдельными полипептидными цепями, обладающими вторичной и третичной структурой, могут приводить к образованию агрегатов, то есть к возникновению *четвертичной структуры* белка. Структура белковой молекулы очень лабильна и легко разрушается под влиянием различных физических и химических воздействий, в результате чего изменяются ее биологические и физико-химические свойства.

Для формирования свойственных белкам структур требуется, как правило, не менее 50 аминокислотных остатков, поэтому нижней границей молекулярной массы (ММ) белков считается 5 кДа. Белки с меньшей ММ, состоящие из двух и более аминокислотных остатков и не имеющие упорядоченной пространственной структуры, называются пептидами. *Пептиды* – низкомолекулярные вещества, которые состоят из аминокислот, соединенных пептидными связями и содержатся в составе биологических тканей наряду с белками. Многие пептиды обладают специфическим действием и высокой биологической активностью. К ним относятся рилизинг-факторы гипоталамуса, эндорфины и энкефалины коры головного мозга, гормоны задней доли гипофиза – окситоцин и вазопрессин, карнозин мышечной ткани, группа регуляторных пептидов желудочно-кишечного тракта – секретины и гастрины, антибиотик грамицидин, токсин грибов фаллоидин, активатор тиоловых ферментов глутатион и многие другие. ММ большинства белков составляет от нескольких десятков до сотен кДа. Белки, различающиеся ММ и, соответственно, размерами молекул, разделяют методом гельфильтрации (метод молекулярных сит).

В водной среде белки образуют растворы, обладающие свойствами и коллоидных, и истинных растворов. Вследствие высокой ММ и большого размера частиц они проявляют свойства коллоидных растворов: белки не проходят через полупроницаемые

мембраны. В водной среде белки образуют растворы, обладающие свойствами и коллоидных, и истинных растворов. Вследствие высокой ММ и большого размера частиц они проявляют свойства коллоидных растворов: белки не проходят через полупроницаемые мембраны (на этом основан метод очистки белков от низкомолекулярных примесей, который называется диализом) и рассеивают свет (эффект Тиндаля). Растворы белков обладают также свойствами истинных растворов, так как образуются и существуют без внесения дополнительной энергии. Растворимость большинства белков в воде обусловлена наличием на их поверхности гидрофильных групп (гидроксильных, сульфгидрильных, амидных), принадлежащих полярным аминокислотам (серин, цистеин, аспарагин, глутамин и др.) и способных связывать воду.

Неполярные аминокислоты, обладающие гидрофобными боковыми радикалами (аланин, валин, лейцин, фенилаланин и др.), снижают растворимость белка в воде.

Второй фактор, влияющий на количество связанной с белками воды (гидратная оболочка) и устойчивость белков в водных растворах, – заряд белковых молекул. Суммарный заряд белка определяется соотношением отрицательно и положительно заряженных аминокислот на поверхности белковых молекул, а также величиной рН раствора. Отрицательный заряд могут приобретать в нейтральной и щелочной среде глутаминовая и аспарагиновая кислоты, в боковых радикалах которых содержатся свободные карбоксильные группы. Лизин, аргинин и гистидин в нейтральной и кислой среде заряжаются положительно благодаря наличию в их боковых радикалах, соответственно, аминогруппы, гуанидиновой группы и имидазольного кольца. Значение рН, при котором суммарный заряд белка является минимально возможным (нулевым), называется изоэлектрической точкой (ИЭТ, pI). В изоэлектрической точке молекула белка электронейтральна (изоэлектрическое состояние), вследствие чего водный раствор белка при рН, равном pI , наименее устойчив и белок легче выпадает в осадок. Это явление применяется для определения изоэлектрической точки белка. Благодаря наличию заряда белки подвижны в электрическом поле. Метод исследования белков, основанный на различной скорости движения белковых частиц, различающихся величиной заряда при определенном значении рН, называется *электрофорезом*.

Одно из фундаментальных свойств белка – способность к денатурации. Денатурация – это нарушение нативной (природной) структуры, вызываемое действием физических и химических факторов и приводящее к изменению физико-химических свойств белка и утрате его биологических функций (структурной, транспортной, каталитической и др.). Первичная структура денатурированных белков не изменяется, но пептидные связи становятся более доступными действию протеолитических ферментов. В

сложных белках при денатурации ослабляются связи с простетическими группами. Денатурированные белки хуже растворяются в воде, чем нативные. Из растворов белки могут осаждаться при нагревании, действии солей, кислот, спиртов и т. д. Водоотнимающие средства (соли аммония, щелочных и щелочноземельных металлов, спирт, ацетон) вызывают обратимую денатурацию белков и применяются для выделения и фракционирования белков методом *высаливания*. После очистки от осаждающих агентов и растворения в воде такие белки вновь приобретают присущие им нативные свойства. Температура выше 50 °С, минеральные и органические кислоты, а также соли тяжелых металлов и другие агенты, вызывающие ковалентную модификацию аминокислотных остатков, необратимо *денатурируют* белки. Необратимая денатурация применяется для дезинфекции, инактивации белков (в частности, обладающих токсическими, ферментными или ингибиторными свойствами), качественного обнаружения белков в растворах и их депротеинизации, т. е. получения безбелковых растворов.

Реакции осаждения белков

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

Реакции осаждения белков можно разделить на две группы:

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

Эффективно осаждает белки трихлоруксусная кислота, поэтому ее наиболее часто применяют для удаления белка из белковых растворов. Осаждение белков спиртом Спирт (а также ацетон и другие органические растворители) дегидрирует белки. В результате происходит агрегация белковых частиц и их осаждение. Если в растворе белка присутствуют соли (NaCl и др.), осадок образуется быстрее вследствие снятия заряда с коллоидных частиц. Реакция осаждения белков спиртом, проводимая на холоде и при непродолжительном его контакте с белком, обратима.

ХОД РАБОТЫ. В пробирку наливают около 2 мл раствора яичного белка, добавляют несколько кристалликов NaCl и по каплям – этиловый спирт до выпадения хлопьев белка. После осаждения хлопьев надосадочную жидкость сливают, к осадку доливают воду, наблюдая растворение белка.

Осаждение белков солями тяжелых металлов

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

ХОД РАБОТЫ. В пробирку наливают около 2 мл раствора яичного белка и прибавляют медленно по каплям раствор соли тяжелого металла (1 %-й раствор сульфата меди или 5 %-й раствор ацетата свинца). Наблюдают коагуляцию белка. Выпавшие хлопья белка при добавлении воды не растворяются. Избыток же сульфата меди и ацетата свинца ведет к растворению (пептизации) первоначально образовавшегося осадка, что объясняется адсорбцией на белковых частицах ионов металла и их перезарядкой.

Осаждение белков при нагревании

Нагревание раствора белка вызывает его необратимое осаждение. При нагревании белки денатурируют. Денатурация сопровождается изменением нативной конформации белковых молекул.

ХОД РАБОТЫ. В две пробирки наливают по 2–3 см³ раствора яичного белка; в одну из них добавляют одну каплю 1 %-го раствора уксусной кислоты. Нагревают содержимое обеих пробирок. Осадок белка появляется в пробирках еще до того, как содержимое закипит. При этом в пробирке с уксусной кислотой осадок выпадает скорее и полнее вследствие того, что в результате подкисления рН раствора приблизился к изоэлектрической точке.

Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Концентрированные минеральные кислоты (кроме фосфорной кислоты) вызывают необратимое осаждение белков из растворов. Осаждение белка объясняется явлениями дегидратации частиц, уменьшения заряда, разрушения электростатических связей и т. д. Избыток минеральных кислот (за исключением азотной) растворяет выпавший осадок белков вследствие их гидролиза. Выполнение реакции. В три пробирки осторожно наливают по 0,5 мл концентрированной кислоты: в первую – серную, во вторую – соляную и в третью – азотную. Во всех пробирках осторожно наклоняют на кислоту по 1 мл раствора яичного белка. На границе двух жидкостей появляется осадок белка в виде небольшого белого кольца. Каждую пробирку осторожно встряхивают. В первой и второй пробирках осадок растворяется; в третьей – с азотной кислотой – осадок при

встряхивании не исчезает. Реакция используется для качественного определения белка в биологических средах.

Осаждение белков органическими кислотами

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

ХОД РАБОТЫ. В пробирку наливают 2–3 мл раствора белка и добавляют несколько капель 5 %-го раствора трихлоруксусной кислоты. Наблюдают выпадение осадка белка.

Осаждение белков реактивами на алкалоиды

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

ХОД РАБОТЫ. В три пробирки наливают по 2 мл раствора белка и подкисляют их двумя–тремя каплями 1 %-го раствора уксусной кислоты. Затем в одну пробирку вносят 5–6 капель насыщенного раствора пикриновой кислоты, в другую – две–три капли 10 %-го раствора танина, в третью – три капли 5 %-го раствора железосинеродистого калия, взбалтывая после добавления каждой капли. Во всех пробирках выпадает осадок белка.

Определение изоэлектрической точки белка

Принцип метода. Белки, являясь амфотерными электролитами, могут содержать как положительно, так и отрицательно заряженные группы. При определенном значении рН среды можно добиться такого соотношения ионизированных групп, при котором водный раствор белка наименее устойчив и белковые частицы выпадают в осадок. Испытывая поведение белка в растворах с различными значениями рН, находят значение рН среды, соответствующее *изоэлектрической точке белка* (рI).

Материалы и реактивы.

Для варианта А: 0,4 %-й раствор казеина (растворяют 0,2 г казеина при небольшом нагревании на водяной бане в 5 мл 0,1 н. раствора ацетата натрия и доводят полученный раствор до объема 50 мл раствором ацетата натрия той же концентрации).

Для варианта В: 1 %-й раствор желатина.

Для обоих вариантов заранее готовят ацетатные буферные растворы с рН 3,6; 4,0; 4,7; 5,2; 5,8, используя 0,1 н. и 1 н. растворы уксусной кислоты, 0,1 н. раствор ацетата натрия, этиловый спирт.

Посуда, приборы: Штатив с пробирками, пипетки емкостью 1 и 5 мл.

ХОД РАБОТ

Вариант А. В пять пробирок вносят по 5 мл ацетатного буферного раствора с различными значениями рН. Затем в каждую из пробирок прибавляют по 1 мл раствора казеина и наблюдают за степенью помутнения раствора, которое обозначают одним или несколькими знаками (+). Отсутствие осадка обозначают знаком минус. Там, где помутнение максимально, рН раствора соответствует изоэлектрической точке казеина. Найденное значение заносят в таблицу

Раствор казеина в ацетатном буферном растворе	рН раствора в пробирках				
	3,6	4,0	4,7	5,2	5,8
Помутнение					

Вариант В. В каждой из шести пронумерованных пробирок создают разную реакцию среды, добавляя 0,1 н. или 1 н. раствор ацетата натрия в соотношениях, указанных в таблице

№ пробирки	рН смеси	Раствор CH_3COOH , см ³		0,1 н. раствора CH_3COONa , см ³	Вода дистиллированная, см ³	Степень помутнения
		0,1 н.	1 н.			
1	5,6	0,125	–	1	1,875	
2	5,3	0,25	–	1	1,75	
3	5,0	0,5	–	1	1,50	
4	4,7	1,0	–	1	1,0	
5	4,4	2,0	–	1	–	
6	4,1	–	0,4	1	1,6	

Затем в каждую пробирку наливают по 1 мл 1 %-го раствора желатина и взбалтывают. В четвертую пробирку, при перемешивании медленно с помощью пипетки вносят этиловый спирт до появления едва заметной мути, отсчитывают объем спирта и такое же количество его прибавляют в другие пробирки. Затем все пробирки оставляют на

30 мин, после чего отмечают пробирку с максимальным помутнением; pH раствора в этой пробирке соответствует pI белка.

Высаливание белков

Высаливание – это широко используемый способ выделения белков из различных биологических объектов, основанный на осаждении белков водоотнимающими средствами. Применяется при получении ферментов, а также для фракционного разделения белков

Альбумины и глобулины являются наиболее распространенными в природе белками. Они содержатся в крови человека, молоке, белке куриного яйца, мышечной ткани, растениях и т. д. В тканях и биологических жидкостях альбумины и глобулины обычно встречаются вместе. Их выделение и разделение основано на различной растворимости в воде и солевых растворах. Так, глобулины выпадают в осадок в полунасыщенном растворе сульфата аммония, а альбумины – в насыщенном растворе. Это объясняется тем, что у глобулинов более высокая молекулярная масса и они менее гидратированы, чем альбумины.

Материалы для исследования и реактивы. Молочная сыворотка, яичный белок, обезжиренный мясной фарш, насыщенный раствор сульфата аммония, сульфат аммония кристаллический; 10 %-й раствор гидроксида натрия; 10 %-й раствор хлорида натрия; 1 %-й раствор сульфата меди.

Посуда, приборы. Штатив с пробирками, воронка, бумажный фильтр.

ХОД РАБОТЫ

Вариант А. В пробирку наливают 2–3 мл молочной сыворотки или раствора яичного белка, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Наблюдают выпадение белого хлопьевидного осадка глобулинов. Мутную жидкость по истечении 5–7 мин фильтруют через сухой складчатый фильтр. К прозрачному фильтрату при перемешивании добавляют избыток сульфата аммония (в порошке) до прекращения его растворения. Появляется муть или хлопья выпадающих в осадок альбуминов. Раствор фильтруют, отбирают 2–3 мл фильтрата и проводят биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белков в фильтрате и полноту осаждения. Осадок альбуминов вместе с фильтратом переносят в пробирку и растворяют в 4–5 мл воды, взбалтывая содержимое пробирки. Раствор альбуминов отфильтровывают и проводят с ним биуретовую реакцию.

Вариант В. Обезжиренный мясной фарш в количестве 40–50 г смешивают с 80–100 мл 10 %-го раствора хлорида натрия и оставляют стоять 15–20 мин при частом перемешивании. Отфильтровывают через складчатый бумажный фильтр или через

двойной слой марли окрашенную в красный цвет жидкость. В растворе главным образом содержатся растворимые белки ткани – мышечные альбумины и глобулины. Отбирают в пробирку 2–3 мл белкового раствора, добавляют равный объем насыщенного раствора сульфата аммония. Наблюдают выпадение белого хлопьевидного осадка глобулинов. Мутную жидкость после 5–7 мин отстаивания фильтруют через сухой складчатый фильтр. К фильтрату добавляют при перемешивании избыток сульфата аммония (в порошке) до прекращения его растворения. Появляется муть или хлопья выпадающих в осадок альбуминов. Раствор фильтруют, берут 2–3 мл фильтрата и проводят биуретовую реакцию. Отрицательная реакция указывает на отсутствие белков в фильтрате и полноту осаждения. Осадок альбуминов вместе с оставшимся фильтратом переносят в пробирку и растворяют в 4–5 мл воды, взбалтывая содержимое пробирки. Раствор альбуминов отфильтровывают и проводят с ним биуретовую реакцию

Лабораторная работа Методы качественного исследования простых белков

Цель лабораторной работы – определить химическую природу белков.

Задачи:

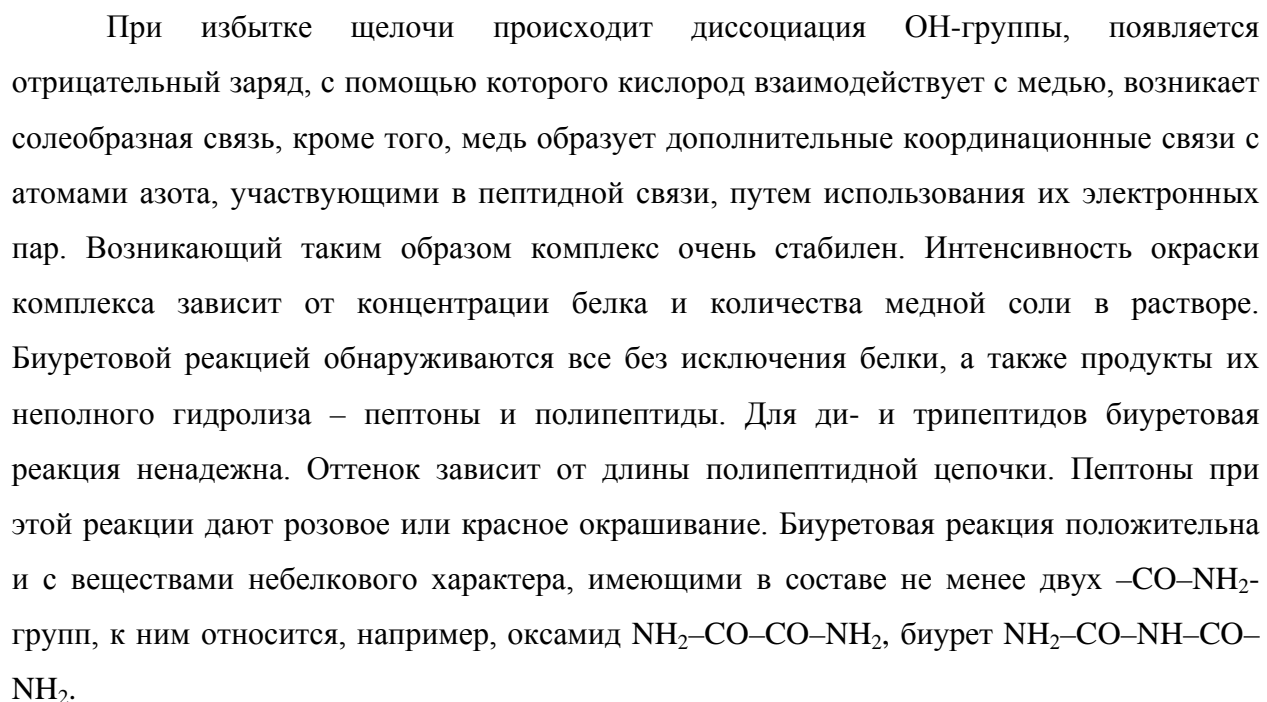
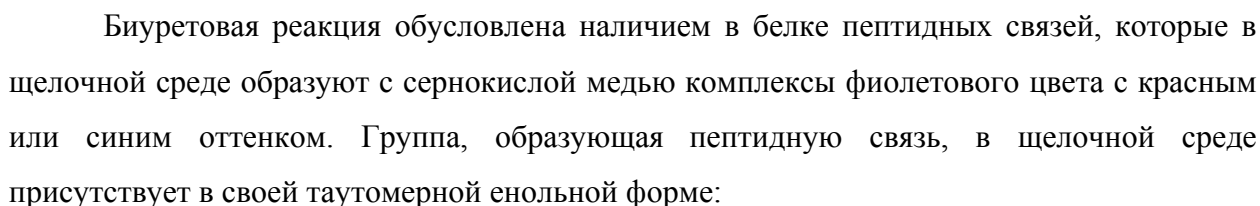
1. Провести реакцию на обнаружение пептидной связи.
2. Доказать, что в состав белков входят α -аминокислоты.
3. Найти в составе белков ароматические и серусодержащие аминокислоты.
4. Определить состав сложных белков.

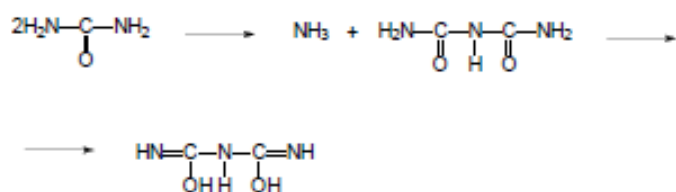
Работа 1. Химическая природа белка (цветные реакции)

Присутствие белка в растворах можно обнаружить с помощью цветных реакций, обусловленных наличием в белке аминокислот, их специфических групп и пептидных связей. Существуют универсальные цветные реакции – на все белки (биуретовая и нингидриновая) и специфические – на определенные аминокислоты (ксантопротеиновая, Миллона, Фоля и др.).

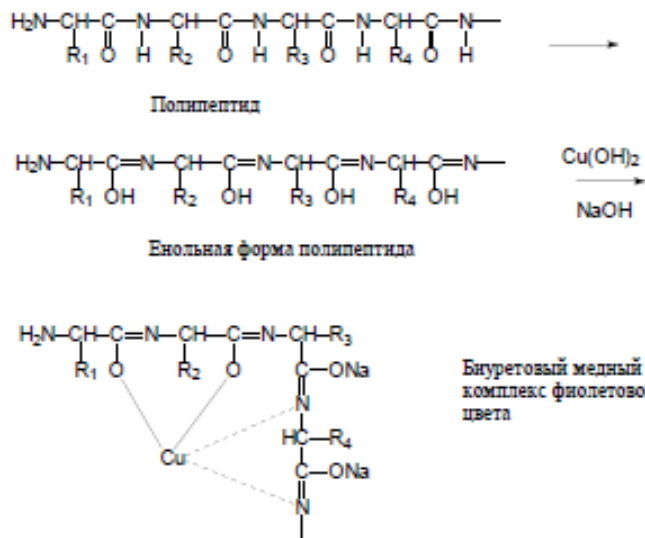
Работа 2. Биуретовая реакция на пептидную связь (Пиотровского)

Реакция основана на образовании внутриккомплексного соединения ионов меди с двумя пептидными связями. В щелочной среде раствор белка при добавлении раствора сульфата меди окрашивается в розово-фиолетовый цвет. Реакция называется биуретовой, так как она характерна и для биурета, состоящего из двух молекул мочевины $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$.





Биуретовая реакция протекает следующим образом:



Исследуемый материал: раствор яичного белка; 1 % раствор желатина.

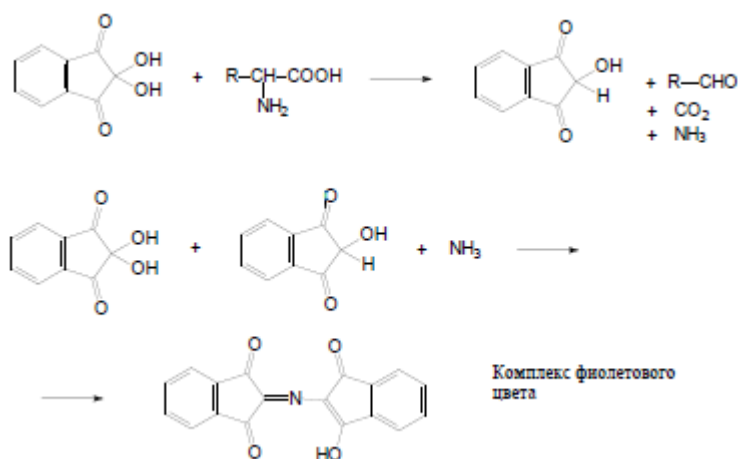
Реактивы: 10 % раствор NaOH, 1 % раствор CuSO₄.

Оборудование: пробирки, капельницы.

ХОД РАБОТЫ. К 5 каплям водного раствора белка добавляют 3 капли 10 % раствора NaOH и 1 каплю 1 % раствора CuSO₄ и перемешивают. Содержимое пробирки приобретает сине-фиолетовый цвет. Нельзя добавлять избыток CuSO₄, так как синий осадок маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса.

Работа 3. Нингидриновая реакция на α-аминокислоты.

Белки, полипептиды и свободные α-аминокислоты дают синее или фиолетовое окрашивание с нингидрином. При нагревании белка с водным раствором нингидрина аминокислоты окисляются и распадаются, образуя CO₂, NH₃ и соответствующий альдегид. Нингидрин, являясь сильным окислителем, вызывает окислительное дезаминирование α-аминокислоты, приводящее к образованию аммиака, двуокиси углерода, соответствующего альдегида и восстановленной формы нингидрина. Нингидрин восстанавливается и связывается со второй молекулой нингидрина посредством молекулы аммиака, образуя продукты конденсации, окрашенные в синий, фиолетовый, красный, а в случае пролина – в желтый цвет.



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

Реактивы: нингидрин, 1 % водный раствор.

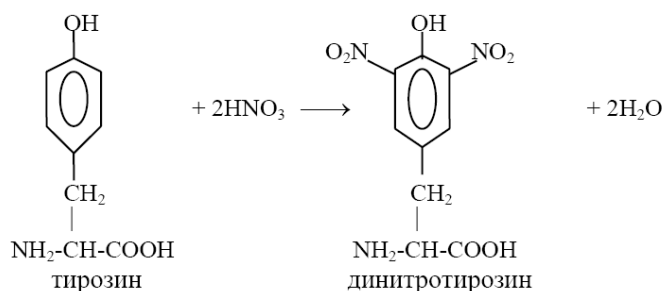
Оборудование: пробирки, капельницы.

ХОД РАБОТЫ. К 5 каплям раствора белка приливают 5 капель 0,1 % водного раствора нингидрина и кипятят 1-2 минуты. Появляется розово- фиолетовое окрашивание. С течением времени раствор синее. Данная реакция не является специфичной, так как ее дают некоторые амины и амиды кислот.

Работа 4. Ксантопротеиновая реакция на циклические аминокислоты

(Мульдера)

Ксантопротеиновая реакция открывает наличие в белках циклических аминокислот - триптофана, фенилаланина, тирозина, содержащих в своем составе бензольное ядро. Большинство белков при нагревании с концентрированной азотной кислотой дает желтое окрашивание, переходящее в оранжевое при подщелачивании. Реакция обусловлена нитрованием бензольного кольца этих аминокислот с образованием нитросоединений желтого цвета. При подщелачивании возникает хиноидная структура, окрашенная в оранжевый цвет.



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

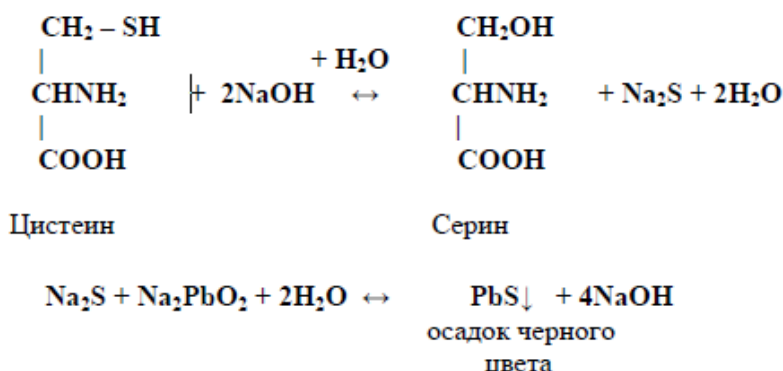
Реактивы: концентрированная HNO_3 , 10 % раствор NaOH .

Оборудование: пробирки, капельницы.

ХОД РАБОТЫ. К 5 каплям раствора белка добавляют 3 капли концентрированной HNO_3 и осторожно кипятят. Вначале появляется осадок свернувшегося белка (под влиянием кислоты), который при нагревании окрашивается в желтый цвет. После охлаждения в пробирку наливают по каплям 10 % раствор NaOH до появления оранжевого окрашивания вследствие образования натриевой соли динитротирозина.

Работа 5. Реакция Фоля на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу (цистеин, цистин)

Реакция Фоля указывает на присутствие в белке аминокислот цистина и цистеина, содержащих слабосвязанную серу. В метионине сера имеет прочное соединение, поэтому эту реакцию не дает. Реакция состоит в том, что при кипячении белка со щелочью цистеин или цистин легко отщепляет серу в виде сернистого натрия, который с плюмбитом дает черный или бурый осадок сернистого свинца. Интенсивность окраски зависит от количества в белке аминокислот цистина и цистеина и от концентрации белка в растворе. Реакция протекает по следующим уравнениям:



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

Реактивы: 30 % раствор NaOH , 5 % раствор $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$.

Оборудование: пробирки, капельницы.

ХОД РАБОТЫ. В одну пробирку наливают раствор яичного белка, в другую – раствор желатина. В каждую пробирку добавляют по 5 капель раствора 30% NaOH и по 1 капле 5 % раствора $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$. При интенсивном кипячении жидкость в пробирке с яичным белком темнеет, образуя черный осадок сернистого свинца. В пробирке с желатиной черного осадка не образуется, так как желатина почти не содержит серосодержащих аминокислот.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и выводы. Результаты работы оформить в виде

таблицы.

Цветные реакции на белки				
Название реакции	Исследуемый материал	Употребляемые реактивы	Наблюдаемая окраска	Чем обусловлена реакция?

Работа 6. Хромопротеины

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

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

Геминовая проба Тейхмана

При нагревании высушенной крови с ледяной уксусной кислотой кровяной пигмент распадается на глобин и гематин. Гематин при действии хлористого водорода, возникающего при взаимодействии хлористого натрия (имеющегося в крови или добавленного) и уксусной кислоты, переходит в хлорпроизводное – гемин, который выкристаллизовывается при остывании. Пробой Тейхмана пользуются в судебно-медицинской экспертизе для доказательства наличия кровяных пятен. Гемин отличается от гема наличием трехвалентного железа, соединенного с атомом хлора.

Исследуемый материал: кровь.

Реактивы: ледяная CH_3COOH , насыщенный раствор NaCl .

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

ХОД РАБОТЫ. Каплю свежей крови помещают на предметное стекло и дают ей высохнуть, держа стекло высоко над пламенем горелки во избежание нагревания выше 60°C (не кипятить, контролировать нагрев прикосновением стекла к тыльной поверхности кисти руки). К подсушенной крови добавляют 1–2 капли концентрированной уксусной кислоты, тщательно перемешивают стеклянной палочкой, накрывают покровным стеклом

и осторожно нагревают до начала кипения кислоты. При этом предметное стекло следует держать высоко над пламенем горелки, чтобы избежать выкипания жидкости. Затем препарат охлаждают и рассматривают под микроскопом образовавшиеся при разрушении гемоглобина кристаллы солянокислого гемина, имеющие форму ромбоидальных палочек. Если обнаружить кристаллы не удастся, то приподнимают покровное стекло, добавляют 2–3 капли концентрированной уксусной кислоты, нагревают и после охлаждения вновь исследуют под микроскопом.

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

Работа 7. Фосфопротеины

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

Исследуемый материал: казеин.

Реактивы: CH_3COOH , 1 % раствор CuSO_4 , 10 % раствор NaOH , 10 % раствор HNO_3 , фенолфталеин, молибденовый реактив.

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

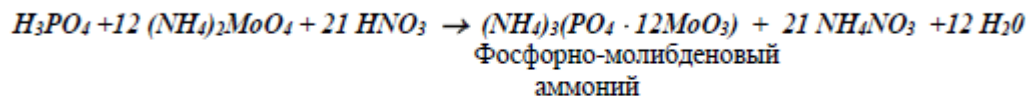
ХОД РАБОТЫ.

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

2. Обнаружение белка. Белок обнаруживают биуретовой реакцией. В пробирку к 3 каплям гидролизата добавляют 1 каплю 1 % раствора сернокислой меди. Появляется розо-фиолетовое окрашивание.

3. Обнаружение фосфата. Оставшийся гидролизат подкисляют несколькими каплями 10 % раствора азотной кислоты в присутствии 1–2 капель фенолфталеина до обесцвечивания и отфильтровывают в сухую пробирку. К 5 каплям фильтрата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят несколько минут. Жидкость окрашивается в

желтый цвет, а затем при охлаждении выпадает желтый осадок фосфорно-молибденового аммония, указывающий на присутствие фосфата в гидролизате.



Работа 8. Гликопротеиды. Открытие углеводного компонента в яичном белке

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

Исследуемый материал: яичный белок.

Реактивы: концентрированная H_2SO_4 , 1 % раствор тимола, концентрированная CH_3COOH .

Оборудование: пробирки, капельницы.

ХОД РАБОТЫ. При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз – оксиметилфурфурол. Они дают с тимолом или α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты продукты конденсации красного цвета. К 10 каплям профильтрованного гидролизата добавляют 2–3 капли 1 % раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно наслаивают 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфурола с тимолом.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и выводы. Результаты работ по сложным белкам оформить в таблицу.

Качественные реакции на открытие составных частей сложных белков

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

РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ СМЕСЕЙ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ.

Белки как вещества высокомолекулярные образуют коллоидные растворы. Растворимость

белков в воде определяется наличием гидрофильных групп (несущих заряд или незаряженных) в аминокислотах, входящих в состав белка. Имеют также значение наличие у молекул одноименного суммарного заряда и форма молекул (отношение длинной и короткой осей). Воздействия, влияющие на гидратацию, заряд или форму белковых молекул, изменяют и ее растворимость.

Высаливание белков

Высаливание - обратимая реакция осаждения белков из растворов с помощью больших концентраций нейтральных солей (NaCl)

При высаливании происходит дегидратация макромолекул белка и устранение заряда. На процесс высаливания влияет ряд факторов: гидрофильность белка, его относительная молекулярная масса, заряд, в связи с чем для высаливания различных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей. Альбумины осаждаются в насыщенном растворе, а глобулины - в полунасыщенном, так как у них относительная масса больше, чем у глобулинов.

Высаливание белков является обратимой реакцией, так как осадок белка может вновь растворяться после уменьшения концентрации солей путем диализа или разведения водой.

РЕАКЦИИ ОСАЖДЕНИЯ БЕЛКОВ.

Денатурация белков (необратимое осаждение) сводится к разрушению структуры белка и потере им биологических свойств. При необратимых реакциях осаждения белки претерпевают глубокие изменения и не могут быть растворены в первоначальном растворителе. К необратимым реакциям относятся осаждение белка солями тяжелых металлов, минеральными и органическими кислотами, алкалоидными реактивами и осаждение при кипячении.

Осаждение белков спиртом, ацетоном.

Осаждение белков солями тяжелых металлов

Белки легко осаждаются солями металлов (свинца, меди, серебра, ртути и др.), образуя с ними прочные солеобразные и комплексные соединения. В отличие от высаливания солями щелочных и щелочноземельных металлов для осаждения солями тяжелых металлов требуются небольшие концентрации последних. В случае применения уксуснокислого свинца и CuSO_4 избыток солей вызывает растворение образованного ими осадка. Такое растворение вызывается адсорбцией избытка ионов металла и перезарядкой белкового комплекса, вследствие чего в раствор переходит комплекс измененного белка с металлом. Благодаря тому же механизму добавление достаточного количества хлористого натрия вызывает растворение ртутного соединения белка. Белковые осадки, полученные действием солей тяжелых металлов, однако, нерастворимы в первоначальном растворителе, т.е. в воде или слабых растворах солей.

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

ими пользуются не только для выделения белков из раствора, но и для освобождения жидкостей от белков.

Осаждение белков минеральными кислотами.

Концентрированные минеральные кислоты вызывают необратимое осаждение белков из растворов. Это осаждение объясняется как явлением дегидратации белковых частиц, так и рядом других причин (например, образование комплексных солей белка с кислотами и др.). Избыток минеральной кислоты, **за исключением** азотной, растворяет выпавший осадок белка.

Осаждение белков алкалоидными реактивами

Растворы белков могут образовывать осадки при добавлении так называемых алкалоидных реактивов. К последним относятся таннин, пикриновая кислота, некоторые другие вещества. Эта способность белков к осаждению алкалоидными реактивами объясняется наличием сходных азотистых группировок как в белках, так и в алкалоидах. Механизм осаждения алкалоидными реактивами заключается в образовании нерастворимых солеобразных соединений с азотистыми основными группами. В этом соединении белок является катионом, алкалоидный реактив - анионом. Вследствие этого осаждение белков алкалоидными реактивами необходимо проводить в кислой среде (частицы белка перезаряжаются и переходят в состояние катионов). В щелочной среде осадки растворяются. Протамины и гистоны осаждаются в нейтральной среде.

Осаждение белков органическими кислотами

Белки из растворов могут осаждаться органическими кислотами. Однако разные органические кислоты неодинаково действуют на белок. ТХУ, сульфосалициловая кислота являются очень чувствительными и специфическими реактивами на белок, широко применяются с этой целью. Осаждение белков с помощью трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в конечной концентрации 2,5-5% часто применяется для полного удаления белка из биологических жидкостей (например, из сыворотки крови), т.к. ТХУ осаждает только белки, а продукты их распада остаются при этом в растворе. Это особенно важно, когда нужно определить отдельно содержание азота белка и азота более низкомолекулярных продуктов: аминокислот, мочевины и др. - так называемый "небелковый азот". В этом случае, если после осаждения белков требуется из фильтрата удалить ТХУ, то это достигается его кипячением, в результате чего ТХУ разлагается на хлороформ и угольный ангидрид, которые улетучиваются.

Осаждение белков при нагревании.

Почти все белки свертываются при нагревании. Температура свертывания различна для разных белков, и если одни белки коагулируют уже при 50-55°C, то некоторые из них выдерживают даже продолжительное кипячение. При свертывании белки денатурируют и переходят в нерастворимое состояние.

Механизм тепловой денатурации связан с перестройкой структуры белковой молекулы, в результате чего белок теряет свои нативные свойства и растворимость. Реакция денатурации протекает постепенно и ускоряется с повышением температуры, поэтому слишком кратковременное нагревание может и не привести к свертыванию. Присутствие солей и концентрация водородных ионов играют важную роль в свертывании белков при нагревании. Наиболее полная и быстрая коагуляция имеет место в изоэлектрической точке, т.е. при таком рН, когда коллоидные частицы белка теряют свой электрический заряд и становятся наименее устойчивыми в растворе. Для большинства белков изоэлектрическая точка соответствует слабокислой реакции (рН около 5). В сильно кислых растворах мицеллы перезаряжаются и несут положительный заряд, что повышает их устойчивость. Подобно этому в щелочных растворах стабильность белкового коллоида обусловлена отрицательным зарядом частицы. Поэтому в сильнокислых растворах белки при нагревании могут коагулировать лишь при добавлении достаточного количества какой-либо нейтральной соли.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТОЧКИ БЕЛКА.

Белки следует рассматривать как вещества, содержащие большое количество кислотных и основных групп. Кислотные группы белка происходят главным образом за счет карбоксильных групп дикарбоновых кислот. Кислую реакцию дают также фенольные, гидроксильные и сульфгидрильные группы. Щелочные, или основные, группы белка обязаны аминным, гуанидиновым и имидным группам аминокислот. На кислотно-щелочные свойства белка влияет также характер соединения остатков концевых аминокислот в белковой молекуле. Обладая одновременно кислотными и основными свойствами, белки образуют биполярные ионы.

В щелочных растворах белок играет роль аниона. При потере протона из группы NH_3^+ , например, при действии NaOH , образуется натриевая соль белка (протеинат натрия).

В кислых растворах, наоборот, белок играет роль катиона, например, с соляной кислотой получается хлористоводородная соль (протеинхлорид).

Таким образом, фактором, определяющим поведение белка как аниона или катиона, является концентрация водородных ионов. Ее повышение (кислая среда) уменьшает кислотную диссоциацию белка и переводит его в катион, понижение концентрации водородных ионов, наоборот, подавляет щелочную диссоциацию и переводит белковые частицы в анионы. Однако при определенном значении **рН** (неодинаковым для различных белков) кислотная диссоциация белковой части становится равной щелочной - число положительных зарядов амфотерного иона.

сравнивается с числом отрицательных зарядов и заряд в целом может стать близким или практически равным нулю. В этих условиях белок находится в изоэлектрическом состоянии и в электрическом поле не будет обнаруживать передвижения ни к катоду, ни к аноду. рН раствора, при которой белок находится в изоэлектрическом состоянии, называется изоэлектрической точкой белка. В этой точке белок находится почти целиком в виде амфотерных ионов, несущих равные положительный и отрицательный заряды, тогда как при других концентрациях водородных ионов у белка имеется преимущественно положительный или отрицательный заряд. Растворы белков в изоэлектрической точке наименее устойчивы. В этом случае отталкивание одноименно заряженных частиц, повышающее устойчивость раствора, прекращается и в качестве стабилизирующего фактора действует лишь гидратная (водная) оболочка белка. Для большинства белков изоэлектрическая точка близка к нейтральной среде, но немного сдвинута в кислую сторону. Это объясняется тем, что кислотные свойства у них преобладают над щелочными

и в нейтральной среде они реагируют как слабые кислоты. Молекула таких белков содержит больше свободных карбоксильных групп, чем амидных, а при гидролизе дает преобладание дикарбоновых и других кисло-реагирующих групп над теми, у которых преобладают основные свойства. Некоторые белки, наоборот, относительно богаче аминными группами и в своем составе содержат больше остатков диаминокислот. В нейтральном растворе они ведут себя как слабые основания. Такие белки (например, гистоны и протамины) имеют изоэлектрическую точку при слабощелочной среде реакции.

Определение изоэлектрической точки удобно произвести на примере желатина.

№ пробирок	кол-во 0,2М р-ра Na_2HPO_4 (мл.)	кол-во 0,1М р-ра лимонной к-ты (мл.)	рН смеси	добавление 1% р-ра яичного альбумина	добавлено спирта этилового	степень мутности
1	0.25	0,75	3,2	0,5	2	-
2	0,34	0,66	3,7	0,5	2	-
3	0.41	0,59	4,2	0,5	2	+
4	0.48	0,52	4,7	0,5	2	+ -
5	0.54	0,46	5,2	0,5	2	+++
6	0.66	0,34	5,7	0,5	2	++ -

Контрольные вопросы

1. Что такое белок?
2. Как связаны между собой аминокислоты в молекуле белка? Напишите трипептид из различных аминокислот. С помощью какой реакции можно их открыть?
3. Напишите аминокислоты, имеющие в своем составе бензольное кольцо. С помощью какой реакции их можно открыть?
4. Напишите аминокислоты, содержащие серу, с помощью какой реакции их можно открыть?
5. Что открывает нингидриновая реакция?
6. Значение цветных реакций на белки.
7. Классификация аминокислот. Строение (формулы) и номенклатура аминокислот.

Лабораторная работа. Физико-химические свойства нуклеотидов

Нуклеиновые кислоты — высокомолекулярные соединения, построенные из большого количества мономеров, соединенных друг с другом фосфодиэфирной

связью. Мононуклеотиды состоят из пуринового или пиримидинового основания, углеводного компонента (рибозы или дезоксирибозы) и фосфорной кислоты. Нуклеиновые кислоты обладают кислотными свойствами вследствие диссоциации имеющихся у них остатков фосфорной кислоты. Различные нуклеиновые кислоты характеризуются входящими в их состав пуриновыми и пиримидиновыми основаниями и пентозами. Дезоксирибонуклеиновая (ДНК) кислота представляет собой полимер, состоящий из мономеров – дезоксирибонуклеозидмонофосфатов. Рибонуклеиновая кислота является полимером, состоящим из рибонуклеозидмонофосфатов.

Цель лабораторной работы – определить структурные компоненты нуклеотидов.

Задачи:

1. Провести кислотный гидролиз нуклеотидов
2. Определить состав нуклеотидов с помощью качественных реакций.

Работа 1. Кислотный гидролиз нуклеиновых кислот

Для изучения состава нуклеиновых кислот проводят кислотный гидролиз дрожжей в присутствии серной кислоты. При продолжительном гидролизе нуклеиновые кислоты распадаются на мононуклеотиды, которые в свою очередь гидролизуются на пуриновые или пиримидиновые основания, пентозу и фосфорную кислоту.

Исследуемый материал: дрожжи.

Реактивы: 10 % раствор H_2SO_4 , концентрированный NH_3 , 1 % раствор $AgNO_3$, молибденовый реактив, концентрированная H_2SO_4 , тимол.

Оборудование: круглодонная колба с воздушным холодильником, воронка с фильтром, мерный цилиндр, пробирки.

ХОД РАБОТЫ. Помещают 1 г пекарских дрожжей в круглодонную колбу на 100 мл, добавляют 20 мл 10 % раствора серной кислоты и 20 мл дистиллированной воды. Колбу закрывают пробкой с длинной стеклянной трубкой и кипятят под тягой в течение часа на асбестовой сетке при слабом нагревании. Через час после начала кипения нагревание жидкости прекращают, дают ей остыть, переносят в цилиндр, доводят водой до первоначального объема и фильтруют. С фильтратом проводят качественные реакции на составные части нуклеиновых кислот.

Работа 2. Серебряная проба на пуриновые основания

ХОД РАБОТЫ. Нейтрализуют 10 капель гидролизата 1 каплей концентрированного аммиака и добавляют 5 капель 1 % раствора азотнокислого серебра. Через 3–5 мин выпадает небольшой бурый осадок серебряных производных пуриновых оснований.

Работа 3. Качественная реакция Молиша на пентозную группировку

ХОД РАБОТЫ. При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз – оксиметилфурфурол. Они дают с тимолом или α -нафтолом в присутствии концентрированной серной кислоты продукты конденсации красного цвета. К 10 каплям профильтрованного гидролизата добавляют 2–3 капли 1 % раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно наслаивают 20 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется красное окрашивание вследствие образования продукта конденсации фурфуrolа с тимолом.

Работа 4. Молибденовая проба на фосфорную кислоту

ХОД РАБОТЫ. К 3–5 каплям гидролизата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят несколько минут. Жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении образуется желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорно-молибденовокислого аммония.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и выводы.

Контрольные вопросы

1. Что такое нуклеиновая кислота и каково ее строение?
2. Что такое ДНК и РНК? Виды РНК.
3. Каков принцип выделения из ткани ДНК и ее обнаружения?
4. Качественные реакции на составные части нуклеиновых кислот.
5. Что представляют собой мононуклеотиды? Каковы продукты их гидролиза?
Написать реакцию гидролиза мононуклеотида(формулами).
6. Как соединяются между собой мононуклеотиды в молекуле нуклеиновых кислот? Напишите формулу динуклеотида.

Лабораторная работа. Физико-химические свойства углеводов.

Углеводами называют полиоксиальдегиды и полиоксикетоны с общей формулой $(C_nH_{2n}O)_n$, а также производные этих соединений. В организме человека и животных углеводы выполняют разнообразные функции. Они служат источником энергии, являются пластическим материалом для построения клеток, а также используются в качестве исходных продуктов для синтеза липидов, белков и нуклеиновых кислот. Углеводы

классифицируются на моносахариды, олигосахариды и полисахариды. Моносахариды, или простые сахара, состоят из одной полиоксиальдегидной или полиоксикетонной единицы. Олигосахариды содержат в своем составе 2–10 остатков моносахаридов, связанных между собой гликозидными связями. Полисахариды содержат более 10 остатков моносахаридов и подразделяются на гомополисахариды и гетерополисахариды.

Цель лабораторной работы – изучить основные свойства углеводов

Задачи:

1. Провести реакции на открытие в растворе углеводов, фруктозы и крахмала.
2. Определить, какие углеводы обладают восстанавливающими свойствами.
3. Провести гидролиз крахмала.

Работа 1. Реакция Подобедова-Молиша

Чувствительными реакциями на углеводы являются реакции с α -нафтолом и тимолом.

Реактивы: раствор сахарозы, α -нафтол, тимол, концентрированная H_2SO_4 .

Оборудование: пробирки, капельницы, пипетки.

ХОД РАБОТЫ.

В 2 пробирки наливают по 0,5 мл раствора сахарозы. В первую пробирку добавляют 1–2 капли раствора α -нафтола, во вторую – 1–2 капли раствора тимола. В обе пробирки осторожно настилают концентрированную серную кислоту. Серная кислота опускается на дно пробирки и на границе двух жидкостей образуется в случае с α -нафтолом фиолетовое кольцо, в случае с тимолом – красноватое. Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, образующиеся из углеводов под действием серной кислоты, конденсируясь с двумя молями сульфированного α -нафтола или тимола дают хромогены, которые окисляются серной кислотой в окрашенное хиноидное соединение.

Подобные реакции дают все углеводы (кроме глюкозамина).

Работа 2. Открытие фруктозы (реакция Селиванова)

Реактивы: раствор фруктозы, раствор глюкозы, реактив Селиванова.

Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

ХОД РАБОТЫ.

В первую пробирку вносят 0,5 мл раствора фруктозы, во вторую пробирку – 0,5 мл раствора глюкозы. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл реактива Селиванова. Осторожно нагревают на спиртовке. В пробирке с фруктозой постепенно появляется красное окрашивание. На первой стадии образуется оксиметилфурфурол, который во второй стадии, конденсируясь с резорцином, дает красное окрашивание.

Работа 3. Реакция крахмала и гликогена с йодом

Реактивы: раствор крахмала, раствор Люголя, 10 % раствор NaOH, этиловый спирт.

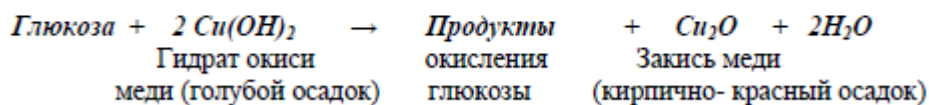
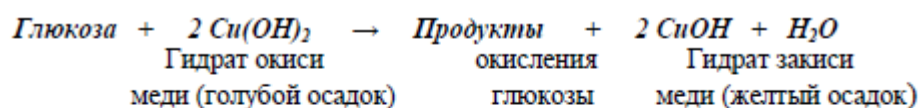
Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

ХОД РАБОТЫ.

К 2 мл раствора крахмала прибавляют 1–2 капли раствора Люголя. Раствор окрашивается в синий цвет. Содержимое пробирки делят на 3 части: к первой части прибавляют 1 мл раствора NaOH, ко второй – 2 мл этилового спирта, третью часть нагревают. Во всех случаях окраска исчезает, но в третьей пробе окраска вновь появляется при охлаждении. Реакция основана на образовании нестойкого адсорбционного соединения иода с амилозой.

Работа 4. Реакция Троммера

Углеводы, в составе которых имеются свободные карбонильные группы, дают ряд реакций, основывающихся на окисляемости этой группы. В основе реакции Троммера лежит окислительно-восстановительный процесс: в щелочной среде при нагревании альдегидная группа сахара окисляется, а гидрат окиси меди (осадок голубого или синего цвета) восстанавливается в гидрат закиси меди (кирпично-красный осадок). Углевод при этом дает различные продукты окисления, так как при окислении в щелочной среде моносахариды претерпевают глубокие изменения с расщеплением углеродной цепи. Среди продуктов окисления не удается выделить кислоту с тем же числом атомов углерода, как у исходного сахара (в отличие от окисления обычных альдегидов). Сахара, не имеющие свободной альдегидной группы, пробу Троммера не дают. Окислительно-восстановительную реакцию можно представить в виде следующей схемы:



Реактивы: 0,5 %-ные растворы глюкозы, фруктозы, сахарозы, мальтозы и крахмала; 2 н раствор NaOH; 0,2 н раствор CuSO₄.

Оборудование: пробирки, пипетки, спиртовка.

ХОД РАБОТЫ.

В пробирку наливают раствора глюкозы и 6-8 капель NaOH. Затем по каплям добавляют раствор CuSO₄ до образования нерастворимого голубого осадка. Осторожно нагревают пробирку на спиртовке. Голубой, не растворимый в воде осадок гидрата окиси

меди (II), постепенно переходит в желтый, а затем в красный осадок закиси меди (I). Это указывает на положительную реакцию Троммера. Аналогичный опыт проводят с сахарозой, мальтозой, фруктозой и крахмалом. Делают заключение о восстанавливающих свойствах этих углеводов. Избыток медной соли маскирует реакцию, так как гидроокись меди (II) при нагревании теряет воду и дает черный оксид меди (II).

Работа 5. Кислотный гидролиз крахмала

Реактивы: 0,1 %-ный раствор крахмала; 2 н раствор H_2SO_4 ; раствор Люголя; 2 н раствор CuSO_4 ; 2 н раствор NaOH .

Оборудование: колбочка, пробирки, пипетки, спиртовка.

ХОД РАБОТЫ. В колбочку помещают 5 мл раствора крахмала 3 мл раствора серной кислоты. Нагреть на спиртовке в течение 5 мин, отбирая пипеткой каждую мин по 0,5 мл гидролизата и добавляя в них по 1 капле раствора Люголя. Обратить внимание на изменение окраски гидролизата с йодом в ходе гидролиза. С оставшимся гидролизатом проделать реакцию Троммера. По результатам реакции сделать вывод о строении крахмала.

Работа 6. Выделение гликогена из печени

Исследуемый материал: печень крысы.

Реактивы: 5 %-ный раствор ТХУ; дистиллированная вода; раствор Люголя.

Оборудование: ступка, пестик, фильтры, пробирки, пипетки.

ХОД РАБОТЫ. 0,5 г печени крысы помещают в ступку, добавляют 3 мл раствора ТХУ и растирают пестиком 10 мин. Затем к экстракту добавляют 5 мл дистиллированной воды, суспензию перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, смоченный водой. С фильтратом проделывают реакцию с раствором Люголя. Сделать соответствующий вывод.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и выводы.

Контрольные вопросы

1. Что называют углеводами?
2. Классификация углеводов.
3. Напишите структурные формулы глюкозы и фруктозы (линейные и циклические) и отметьте асимметричные атомы.
4. Напишите структурные формулы альдотриозы и кетотриозы. Имеют ли они стереоизомеры? Если имеют, напишите их структурные формулы.
5. Какие углеводы относятся к восстанавливающим?
6. Принципы методов обнаружения: а) глюкозы? б) фруктозы? в) сахарозы?

7. В чем сходство и различие в строении крахмала и гликогена?

Лабораторная работа. Физико-химические свойства липидов

Липиды – органические соединения, нерастворимые в воде, но растворимые в органических растворителях. К липидам относятся нейтральные жиры и жироподобные вещества (липоиды). Липиды экстрагируют из тканей при помощи органических растворителей (хлороформ, спирт, эфир и пр.). По своей химической природе липиды чаще всего являются сложными эфирами жирных кислот и многоатомных спиртов. Биологическая роль липидов многообразна, но в основном они выполняют структурную функцию (входят в состав мембран) и энергетическую (при окислении липидов освобождается большое количество энергии).

Классификация липидов.

1. Простые липиды:

- а) нейтральные жиры (глицериды, глицеролы);
- б) воска.

2. Сложные липиды:

- а) фосфолипиды;
- б) гликолипиды.

3. Липоиды:

- а) стеринны и стероиды;
- б) каротиноиды;
- в) терпеноиды.

Цель лабораторной работы – изучить некоторые свойства липидов.

Задачи:

1. Определить кислотное число растительного масла
2. Определить число омыления растительного масла
3. Провести качественные реакции на открытие в растворе желчных кислот

Работа 1. Определение кислотного числа

Кислотное число характеризует кислотность жира и измеряется оно количеством миллиграммов гидроксида калия, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира. Кислотное число наряду с другими физико-химическими показателями характеризует качество масла. Например, если масло получено из зрелых семян, то свободных жирных кислот в нем мало, в масле же незрелых семян содержание свободных жирных кислот значительно. При хранении масла

наблюдается гидролиз глицеридов. Который приводит к накоплению свободных жирных кислот, то есть к нарастанию кислотности. Повышенная кислотность масла указывает на снижение его качества.

Метод определения кислотного числа основан на том, что свободные жирные кислоты, имеющиеся в масле, оттитровывают 0,1 н раствором КОН. Обычно титрование проводят гидроксидом калия, а не гидроксидом натрия, так как образующиеся калиевые мыла лучше растворимы в условиях опыта.

Реактивы: масло растительное или жир животный; этиловый спирт; 0,1 н раствор КОН в этиловом спирте; фенолфталеин.

Оборудование: весы, колба коническая, цилиндр мерный, пипетки, бюретка.

ХОД РАБОТЫ. Для определения кислотного числа навеску жира (масла) в 2 г помещают в коническую колбу и растворяют в 10 мл нейтральной смеси спирта и эфира (1:1). После растворения жира в колбу вносят 1-2 капли раствора фенолфталеина и титруют 0,1 н спиртовым раствором гидроксида калия до слабо-розового окрашивания. Окраска после взбалтывания не должна исчезать 1 мин.

Кислотное число определяют по формуле:

$$\text{Кислотное число} = V \cdot T / a,$$

где V – количество (в мл) 0,1 н раствора КОН, израсходованное на титрование взятой навески жира; T – титр 0,1 н раствора КОН (в мг); a – навеска жира (в г).

Работа 2. Определение числа омыления

Числом омыления называется количество миллиграммов КОН, необходимое для нейтрализации как свободных, так и связанных жирных кислот, содержащихся в 1 г масла. Содержание свободных жирных кислот в масле характеризуется кислотным числом, а содержание связанных в виде эфиров кислот – эфирным числом, то есть количеством миллиграммов КОН, необходимого для нейтрализации освобождающихся при омылении эфирных связей жирных кислот на 1 г масла.

Экспериментально эфирное число определяется по разности между числом омыления и кислотным числом.

Реактивы: 0,5 н спиртовой раствор КОН; 0,5 н HCl; фенолфталеин.

Оборудование: весы, баня водяная, колбы конические, пробирки с обратным холодильником, пипетки, бюретка.

ХОД РАБОТЫ. В пробирку вносят 0,5 г жира, а в другую – 0,5 мл воды затем в обе пробирки добавляют по 5 мл 0,5 н спиртового раствора КОН. Пробирки закрывают пробками с обратными воздушными холодильниками и нагревают на кипящей водяной

бане 30 мин при периодическом встряхивании. По окончании омыления содержимое пробирок выливают в колбы, добавляют по 5 мл воды, 3–4 капли фенолфталеина и титруют 0,5 н раствором HCl до исчезновения розовой окраски (определяют количество несвязавшейся щелочи). Исходя из того, что 1 мл 0,5 н раствора KOH соответствует 28 мг его, расчет числа омыления ведут по формуле:

$$\text{Число омыления} = (V_1 - V_2) \cdot 28 / a,$$

где V1 – количество (в мл) 0,5 н. раствора HCl, затраченное на титрование контроля (колба с водой), V2 – количество (в мл) 0,5 н. раствора HCl, затраченное на титрование опыта (колба с жиром), а – навеска жира (в г).

Работа 3. Обнаружение желчных кислот в моче (проба Петенкофера)

Проба основана на образовании окрашенного продукта при взаимодействии желчных кислот и оксиметилфурфурола, который образуется из сахарозы при действии концентрированной серной кислоты.

Исследуемый материал: моча.

Реактивы: концентрированная серная кислота, 5 %-ный раствор сахарозы.

Оборудование: пробирки, пипетки.

ХОД РАБОТЫ. В пробирку налить 5 мл мочи, добавить 10 капель раствора сахарозы и осторожно, по стенке пробирки, добавить 10 капель концентрированной серной кислоты. Не взбалтывать! Оставить на 10-15 мин пробирку в штативе. При наличии в моче желчных кислот на границе жидкостей образуется красно-фиолетовое кольцо.

Работа 4. Качественные реакции на обнаружение витамина Е

Взаимодействие α-токоферола с концентрированной азотной кислотой приводит к окрашиванию реакционной смеси в красный цвет. Это обусловлено тем, что продукт окисления α-токоферол имеет хиноидную структуру. При взаимодействии с хлорным железом (III) α-токоферол окисляется до α-токоферилхинона – соединения, окрашенного в красный цвет.

Реактивы: спиртовой раствор α-токоферола, концентрированная HNO₃, 1 %-ный раствор FeCl₃.

Оборудование: пробирки, пипетки.

ХОД РАБОТЫ.

Реакция с азотной кислотой. В сухую пробирку вносят 5 капель спиртового раствора витамина Е и добавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты. Пробирку интенсивно встряхивают и наблюдают постепенное появление красного окрашивания.

Реакция с хлорным железом. В сухую пробирку вносят 0,5 мл спиртового раствора витамина Е, затем 0,5 мл раствора хлорного железа и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдают появление красного окрашивания.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачи, ход выполнения работы, результаты и выводы.

Контрольные вопросы

1. Классификация липидов.
2. Что такое число омыления и как оно определяется?
3. Что такое кислотное число, как оно определяется и что характеризует?
4. Принцип метода определения желчных кислот.
5. Принцип метода определения витамина Е

Лабораторная работа. Аналитическое занятие

Цель лабораторной работы – развитие логического мышления.

Задача – определить вещество в растворе.

Каждый студент индивидуально получает по 2 пробирки с неизвестными растворами и с помощью качественных реакций, описанных в предыдущих работах, определяет вещества, находящиеся в растворах.

Исследуемый материал: в растворах может присутствовать одно из перечисленных ниже веществ:

1. Глюкоза
2. Фруктоза
3. Сахароза
4. Крахмал
5. Гликоген
6. Яичный альбумин
7. Желатин
8. Гликопротеин
9. Фосфопротеин
10. Нуклеопротеин
11. Желчные кислоты

Реактивы: α -нафтол, тимол, концентрированная H_2SO_4 , 30 % раствор $NaOH$, 5 % раствор $(CH_3COO)_2Pb$, 2 н раствор $NaOH$; 0,2 н раствор $CuSO_4$; 5 %-ный раствор ТХУ;

раствор Люголя; 5 %-ный раствор сахарозы, реактив Селиванова, молибденовый реактив, 1 % раствор AgNO_3 .

Оборудование: пробирки, капельницы, спиртовки, пипетки.

Требования к оформлению лабораторной работы. В отчете указать цель, задачу, ход выполнения работы, результаты и вывод.

Литература

а) основная литература:

1. Антина Е.В., Химия биологически активных веществ и жизненных процессов : учебное пособие / Антина Е.В. - Иваново : Иван. гос. хим.-технол. ун-т., 2015. - 303 с. - ISBN -- - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : http://www.studentlibrary.ru/book/ghtu_023.html
2. Коваленко Л.В., Биохимические основы химии биологически активных веществ : учебное пособие / Коваленко Л. В. - 3-е изд. (эл.). - М. : БИНОМ, 2015. - 232 с. (Учебник для высшей школы) - ISBN 978-5-9963-2625-9 - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента": [сайт]. -URL: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785996326259.html>
3. Ершов, Ю. А. Биохимия : учебник и практикум для академического бакалавриата / Ю. А. Ершов, Н. И. Зайцева ; под редакцией С. И. Щукина. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2019. — 323 с. — (Бакалавр. Академический курс). — ISBN 978-5-534-07505-2. — Текст : электронный // ЭБС Юрайт [сайт]. — URL: <https://urait.ru/bcode/433688>
4. Биохимия, под ред. Е.С.Северина. Гриф УМО, 2015.
5. Биологическая химия. Ситуационные задачи и тесты, учебное пособие, под ред. А.Е.Губаревой, 2016.

б) дополнительная литература

6. Тебиев А.К. Биологическая химия в вопросах и ответах, учебно-методическое пособие, 2010.
7. Под ред. Е.С.Северина и А.Я.Николаева Биохимия (краткий курс с упражнениями и задачами). М. 2002
8. Николаев А. Я. Биологическая химия: учебное пособие для студентов медицинских вузов, - М., 2004.
9. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. М. 2004
10. Филиппович Ю. Б. Биохимические основы жизнедеятельности человека М.: «ВЛАДОС». 2005. 404 с.