

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Южно-Уральский государственный университет  
Кафедра «Пищевые и биотехнологии»

*Рукопись*

## **БИОХИМИЯ**

Методические указания к лабораторным работам  
*для студентов направлений 19.03.01, 19.03.02, 19.03.03.*

Челябинск  
Издательский центр ЮУрГУ  
2024

## **ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В БИОХИМИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ**

Запрещается вход в лабораторию в верхней одежде. Работа в биохимической лаборатории допускается только в специальном халате, так как вероятна возможность загрязнения, порчи одежды при попадании на нее едких реактивов.

Для обеспечения безопасности труда в биохимической лаборатории необходимо руководствоваться следующими правилами:

- во время работы в лаборатории следует соблюдать правила техники безопасности;
- для ознакомления с правилами безопасного проведения работ организуется регулярное проведение инструктажа студентов по технике безопасности, сведения о проведении которого заносятся в специальный журнал;
- во время работы необходимо соблюдать правила личной гигиены;
- утилизация отходов должна проводиться в специальные контейнеры для сбора мусора и производственных отходов;
- употреблять пищу и напитки в лаборатории категорически запрещается.
- при работе с химическими веществами нельзя пробовать их на вкус.
- при приготовлении растворов кислот надо наливать кислоту в воду, а не наоборот.
- все опыты с концентрированными кислотами, щелочами, газообразными веществами, органическими растворителями следует производить в вытяжном шкафу.
- при попадании на кожу кислоты с высокой концентрацией ее необходимо смыть водой и после этого обработать слабым раствором гидрокарбоната натрия.
- при попадании на кожу щелочи с высокой концентрацией ее нужно смыть водой, а затем слабым раствором уксусной кислоты.
- при сильных ожогах кожу необходимо смочить крепким раствором перманганата калия.
- пробирки с жидкостью при нагревании надо держать наклонно в сторону от себя и от соседа.
- нельзя набирать реактивы в пипетку ртом, следует пользоваться грушей.
- запрещается работать с огнеопасными веществами в одиночку и оставлять без присмотра включенные электроприборы.
- запрещается нагревать воду и растворы в закрытых сосудах.

# ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №1.

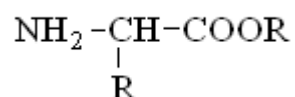
## КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА АМИНОКИСЛОТЫ И БЕЛКИ

### *Общие сведения*

Белки представляют собой высокомолекулярные полимерные органические соединения, структурными единицами которых являются  $\alpha$ -аминокислоты.

Гетерофункциональные соединения, молекулы которых содержат одновременно амино- и карбоксильную группы называются аминокислотами. Общее число, встречающихся в природе аминокислот, достигает 100. При этом в организме человека найдено около 70 аминокислот, из которых 20 входят в состав белка. Они относятся к  $\alpha$ -аминокислотам и называются протеиногенными (табл. 1).

Общая формула аминокислот



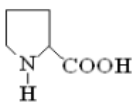

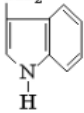

Аминокислоты в молекуле белка соединены между собой пептидными связями ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ), образуя полипептидные цепи. Пептидная связь возникает между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой другой, что сопровождается выделением молекулы воды.

Классификация аминокислот основывается на химической структуре группы R: алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин); гидроксилсодержащие (серин, треонин); серосодержащие (цистеин, метионин); ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан); кислые и амиды (аспарагиновая кислота и аспарагин, глутаминовая кислота и глутамин); основные (аргинин, лизин); иминокислоты (пролин). Другие типы классификации аминокислот: на основе полярности R-групп (полярные, неполярные); на основе ионных свойств R-групп (кислые, основные, нейтральные); на основе питательной ценности для человека: незаменимые – не могут синтезироваться в организме человека (треонин, метионин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин, триптофан) и заменимые – могут синтезироваться в организме.

Аминокислоты могут участвовать во многих реакциях с участием  $\alpha$ -аминогрупп,  $\alpha$ -карбоксильных групп, а также функциональных групп боковых цепей.

В белках различают несколько уровней структурной организации.

Таблица 1. Протеиногенные α-аминокислоты

Название	Формула	Название	Формула
глицин	$\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$	серин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2\text{-OH}$
аланин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_3$	аспаргиновая кислота	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2\text{-COOH}$
валин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH-CH}_3$   $\text{CH}_3$	глутаминовая кислота	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2$   $\text{CH}_2\text{-COOH}$
лейцин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2$   $\text{CH-CH}_3$   $\text{CH}_3$	аспаргин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2$   $\text{C=O}$   $\text{NH}_2$
Изолейцин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH-CH}_3$   $\text{CH}_2\text{-CH}_3$	глутамин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2$   $\text{CH}_2$   $\text{C=O}$   $\text{NH}_2$
цистеин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2\text{-SH}$	аргинин	$\text{COOH}$   $\text{NH}_2\text{-CH}$   $\text{CH}_2$   $\text{CH}_2$   $\text{CH}_2$   $\text{NH}$   $\text{C=NH}$   $\text{NH}_2$
метионин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-SCH}_3$	лизин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $(\text{CH}_2)_4$   $\text{NH}_2$
треонин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH-OH}$   $\text{CH}_3$	пролин	
фенилаланин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2$   	триптофан	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2$   
тирозин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2$   	гистидин	$\text{NH}_2\text{-CH-COOH}$   $\text{CH}_2$   $\text{C=CH}$   $\text{N}$   $\text{NH}$   $\text{CH}$

Первичная структура белка определяется числом и последовательностью аминокислотных остатков, соединенных между собой при помощи пептидной связи. 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 свертывается 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 идентификации и количественного определения белков и отдельных аминокислот используют цветные реакции, когда происходит взаимодействие специфических реактивов с функциональными группами радикалов аминокислот, входящих в состав белка или пептида.

Существуют два типа цветных реакций:

- универсальные: биуретовая (на все белки) и нингидриновая (на все аминокислоты и белки);
- специфические: только на определенные аминокислоты как в молекуле белка, так и в растворах отдельных аминокислот, например, реакция Фоля (на аминокислоты, содержащие слабосвязанную серу), реакция Миллона (на тирозин), реакция Сакагучи (на аргинин) и др.

**Цель работы** – определить химическую природу белков; доказать, что в состав белков входят  $\alpha$ -аминокислоты.

#### **Опыт №1. Действие азотной кислоты на аминокислоты**

В пробирку помещают 2 капли раствора аминокислоты (например, глицин), 2 капли раствора нитрита натрия  $\text{NaNO}_2$  и 2 капли соляной кислоты  $\text{HCl}$ . При встряхивании содержимого пробирки выделяются пузырьки газа.



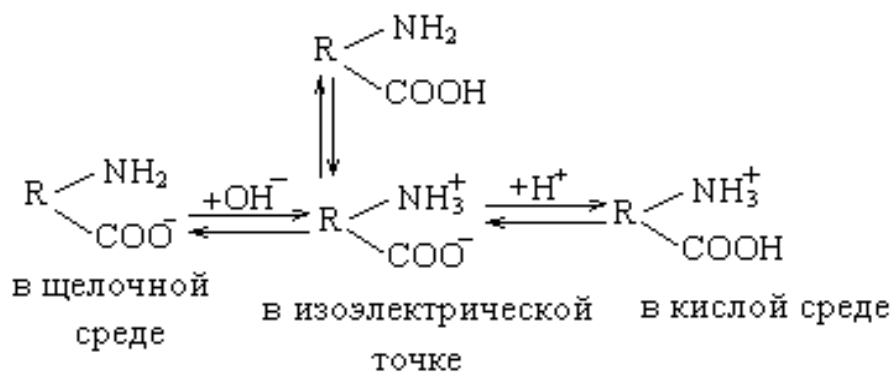


Рис. 1. Схема амфотерных свойств белка

Буферные свойства раствора белка, связанные с его амфотерностью, особенно наглядно обнаруживаются в следующих опытах:

*а)* к 3 мл дистиллированной воды добавьте 1 каплю соляной кислоты HCl. При добавлении к этому раствору несколько капель индикатора Конго наблюдается появление ярко-синего окрашивания. Этот синий раствор медленно прилейте к раствору белка и отметьте изменение окраски. В данном случае белок ведет себя как основание;

*б)* к 3 мл дистиллированной воды добавьте каплю раствора щелочи. Полученный раствор при добавлении к нему капли раствора фенолфталеина окрашивается в розовый цвет. Прилейте щелочной раствор к раствору белка, отметьте изменение окраски и в этом случае, где белок ведет себя уже как кислота.

### **Опыт №3. Биуретовая реакция на пептидную группу**

Биуретовая реакция обнаруживает в молекуле белка пептидные группы  $-\text{CO}-\text{NH}-$ . Продукты распада белка – полипептиды также дают биуретовую реакцию, причем цвет образующихся медных комплексов определяется числом аминокислот, связанных пептидной связью. Дипептиды дают синюю окраску, трипептиды – фиолетовую, а тетрапептиды и более сложные пептиды – красную.

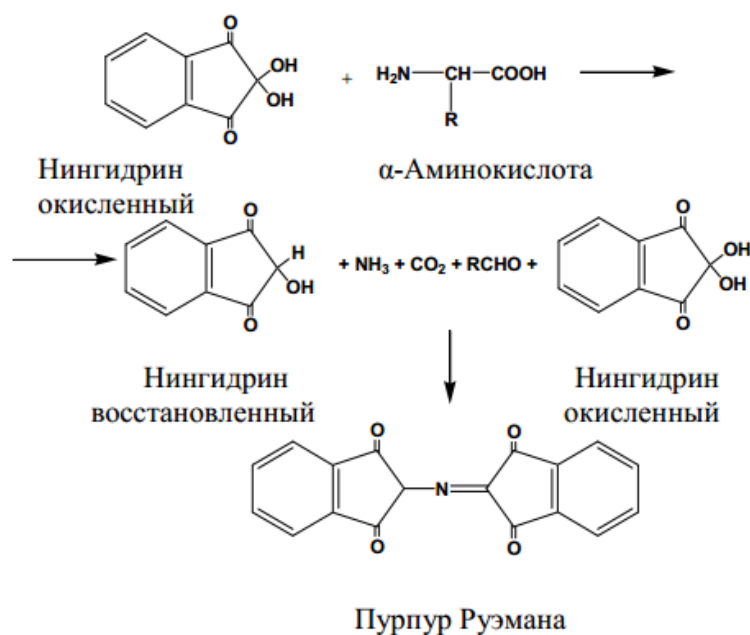
Биуретовую реакцию дают небелковые вещества, содержащие не менее двух пептидных групп, например, производное мочевины – биурет  $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ , давшее название этой реакции, и некоторые другие.

В сильнощелочной среде пептидные группы полипептидов переходят в енольную форму, которая и взаимодействует с ионами  $\text{Cu}^{2+}$ , образуя окрашенный биуретовый комплекс.









*Реактивы:* 1 % раствор глицина; 4 % раствор белка; 0,1 % раствор нингидрина.

*Порядок выполнения работы:* В одну пробирку наливают 1–2 мл раствора глицина, в другую – столько же раствора белка. В обе пробирки добавляют раствор нингидрина (в первую– 5–6, во вторую– 10–12 капель), нагревают одну минуту. В пробирке с раствором глицина быстро появляется сине-фиолетовое или фиолетовое окрашивание. Пробирку с белком нагревать надо до появления красновато-фиолетового окрашивания; Пролин (или 4-гидроксипролин) с нингидрином дает желтое окрашивание.

#### ***Опыт №6. Реакция Шульце-Распайля на триптофан***

Фруктоза в присутствии концентрированной  $H_2SO_4$  теряет три молекулы воды и превращается в оксиметилфурфурол, который образует с триптофаном окрашенные продукты конденсации. Реакцию можно проводить как с фруктозой, так и с сахарозой при гидролитическом расщеплении которой образуются равные количества фруктозы и глюкозы.

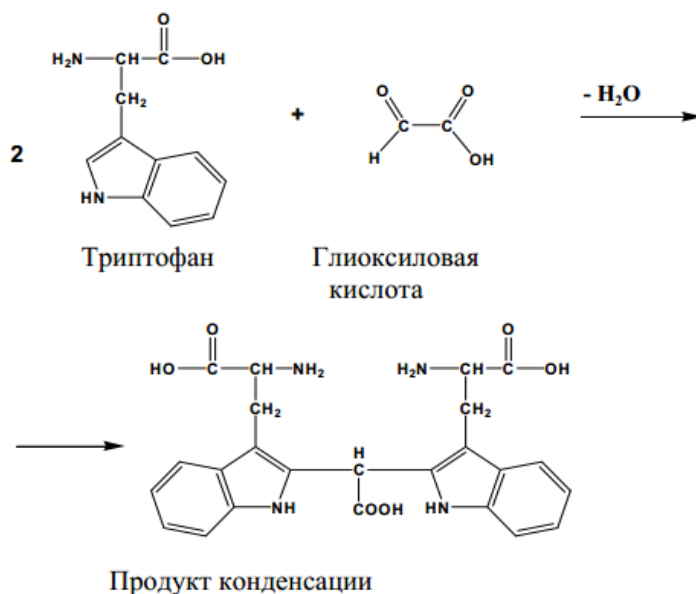
*Реактивы:* 4 % раствор белка; 5 % раствор сахарозы; концентрированная  $H_2SO_4$ .

*Порядок выполнения работы.* К 1–2 мл раствора белка добавляют 6 капель раствора сахарозы и по стенкам пробирки осторожно наслаивают 1 мл концентрированной  $H_2SO_4$ . На границе раздела жидкостей появляется кольцо темно-красного цвета.

#### ***Опыт №7. Реакция Адамкевича на триптофан***

При нагревании триптофан взаимодействует с глиоксиловой кислотой с образованием соединения, окрашенного в красно-фиолетовый цвет.

Для проведения реакции используют ледяную  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , в которой как примесь содержится глиоксиловая кислота. В качестве водоотнимающего средства используется концентрированная  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .



Реактивы: неразбавленный яичный белок; ледяная  $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; концентрированная  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

*Порядок выполнения работы.* В пробирку с двумя каплями свежего неразбавленного яичного белка добавляют 10 капель ледяной  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и осторожно нагревают до растворения выпавшего осадка, после чего содержимое пробирки охлаждают. Очень аккуратно по стенке, наклонив пробирку, подслаивают (следа чтобы жидкости не смешивались) концентрированную  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . На границе двух слоев возникает характерное окрашенное кольцо.

По результатам проведенных реакций заполните табл. 2.

Таблица 2. Качественные реакции на белки

Название реакции	Использованные реактивы	Окраска	Чем обусловлена реакция?

### Вопросы для самоконтроля

- 1 Какие соединения называются аминокислотами? Приведите классификацию по биологическому значению аминокислот, по полярности радикалов и химическому строению.
- 2 Приведите структурные формулы 20 протеиногенных аминокислот
- 3 Охарактеризуйте физико-химические свойства аминокислот. Напишите соответствующие уравнения реакций.
- 4 Какая связь называется «пептидной»? Строение и биологическая роль пептидов.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВ

Цель работы – ознакомиться с основными свойствами белков.

**1 Высаливание белков.** Белки как высокомолекулярные вещества образуют коллоидные растворы.

Растворимость белков в воде определяется наличием гидрофильных групп (несущих заряд или незаряженных) в аминокислотах, входящих в состав белка. Также имеет значение наличие у молекул одноименного суммарного заряда и форма молекул (отношение их длинной и короткой осей).

Воздействия, влияющие на гидратацию, заряд или форму белковых молекул, изменяют и ее растворимость.

**Опыт 1.1.** Высаливание – обратимая реакция осаждения белков из растворов с помощью концентрированных растворов солей: NaCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ .

При высаливании происходит дегидратация макромолекул белка и устранение их заряда. На процесс высаливания влияет гидрофильность, относительная молекулярная масса и заряд белка, поэтому для высаливания различных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей.

Альбумины осаждаются в насыщенном растворе  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , а глобулины – в полунасыщенном  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , так как относительная молекулярная масса глобулинов больше, чем альбуминов.

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

Реактивы: яичный белок; вода дистиллированная; насыщенный раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; кристаллический  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; концентрированный  $\text{HNO}_3$ ;  $\text{NaCl}$ .

*Порядок выполнения работы:* К 0,5 мл неразбавленного яичного белка прибавляют 2,5 мл воды. При этом образуется небольшое количество белого хлопьевидного осадка глобулинов. В пробирку наливают несколько капель насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , после чего происходит растворение выпавшего глобулина. К 3 мл данного раствора яичного белка, содержащего альбумины и глобулины, прибавляют равный объем насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , выпадает осадок глобулинов, который удаляется фильтрованием. К фильтрату добавляют кристаллический  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до полного насыщения. При этом выпадает осадок альбуминов. Он также отфильтровывается. С фильтратом следует сделать пробу на полноту осаждения белка с помощью конц.  $\text{HNO}_3$ .

**Опыт 1.2. Обратимость высаливания.** К 2 мл раствора белка приливают 2 мл насыщенного раствора  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , выпадает осадок, который растворяется при последующем прибавлении воды.

**Опыт 1.3. Осаждение хлористым натрием и сернокислым магнием.** В две пробирки наливают приблизительно по 3 мл белка. Прибавляют до полного насыщения в одну пробирку только измельченный хлористый натрий, в другую – сернокислый магний. Через несколько минут в обеих пробирках появляется осадок глобулинов. Содержимое пробирок отфильтровывают. В фильтрах остаются альбумины, которые в нейтральных растворах не выпадают в осадок даже при полном насыщении  $\text{NaCl}$  и  $\text{MgCl}_2$ . К фильтрату прибавляют несколько капель разведенной уксусной кислоты; в слабокислой среде выпадают альбумины. Через несколько минут альбумины отфильтровывают.

Проверяют фильтрат на отсутствие белка при помощи биуретовой реакции.

## **2 Осаждение 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.

### **Опыт 2.1. Осаждение белков спиртом, ацетоном**

*Реактивы:* 1) белок, 4% р-р; 2)  $\text{NaCl}$ , порошок; 3) спирт этиловый; 4) ацетон.

Принцип метода: Многие органические растворители осаждают белки из нейтрального или слабокислого раствора. Если к водному раствору белка прибавить, например, этиловый спирт, то можно достигнуть такой концентрации его (неодинакова для различных белков), когда происходит осаждение белка. Механизм действия спирта объясняют связыванием воды, что ведет к дегидратации мицелл белка и понижению их устойчивости в растворе. Если при этом присутствует небольшое количество солей (например, NaCl), то осадок образуется полнее и быстрее. Ионы солей связываются коллоидными частицами белка и нейтрализуют их заряд. Это обстоятельство еще более снижает устойчивость раствора белка. Если осаждение проводить на холоде и полученный осадок быстро отделить от спирта, то белок может быть снова растворен в воде, т.е. свойства его в этом случае не изменяются, денатурация не успевает произойти и осаждение обратимо. При стоянии со спиртом белок денатурирует и становится нерастворимым в первоначальном растворителе.

*Порядок выполнения работы:*

а) Приливают в пробирку 1-2 мл раствора белка, прибавляют щепотку сухого NaCl и взбалтывают. В пробирку постепенно приливают несколько мл этилового спирта и сильно взбалтывают. Через несколько минут выпадает мелкий осадок белка.

б) В пробирку наливают 1 мл раствора белка, по стенке осторожно добавляют 0,5 мл ацетона, на границе соприкосновения обеих жидкостей появляется белое кольцо денатурированного белка.

## **Опыт 2.2. Осаждение белков солями тяжелых металлов**

*Реактивы:* 1) белок, 4% р-р; 2) ацетат свинца, 5% р-р; 3) сульфат меди, 1% р-р; 4) нитрат серебра 5% р-р.

Принцип метода: 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  $\text{CuSO}_4$  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.

*Порядок выполнения работы:* В 3 пробирки наливают по 1-2 мл раствора белка. Прибавляют по каплям в первую пробирку раствор уксуснокислого свинца, во вторую – раствор сернокислой меди, в третью – раствор азотнокислого серебра. Наблюдают образование осадков во всех пробирках. В пробирки с осадками от уксуснокислого свинца и сернокислой меди добавляют избыток этих солей. Наблюдается растворение осадков.

### **Опыт 2.3. Осаждение белков минеральными кислотами**

*Реактивы:* 1) HCl, конц.; 2) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, конц.; 3) HNO<sub>3</sub>, конц.; 4) белок, раствор для осаждения.

*Принцип метода:* 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.

*Порядок выполнения работы:* В три пробирки осторожно наливают приблизительно по 1 мл кислот: в 1-ю соляной, во 2-ю – серной, в 3-ю – азотной. Осторожно вносят во все пробирки приблизительно по 1 мл раствора белка. На границе двух жидкостей наблюдается появление осадка белка в виде небольшого белого кольца. Осторожно встряхивают каждую пробирку. Происходит растворение осадков в избытке соляной и серной кислот. В пробирке с азотной кислотой осадок при встряхивании не исчезает, т.к. в избытке азотной кислоты он не растворяется.

### **Опыт 2.4. Осаждение белков при нагревании**

*Реактивы:* 1) белок, раствор для осаждения; 2) уксусная кислота, 1% р-р; 3) уксусная кислота, 10% р-р; 4) хлорид натрия, насыщ. р-р; 5) NaOH, 10% р-р.

Принцип метода: 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.

*Порядок выполнения работы:* Наливают в 5 пробирок приблизительно по 2 мл раствора белка. Нагревают содержимое первой пробирки. Образуется осадок белка. Добавляют во вторую пробирку каплю 1%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и нагревают. Осадок выпадает скорее и полнее вследствие того, что белок находится в изоэлектрической точке. Добавляют в третью пробирку около 0,5 мл 10%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  и нагревают, осадка белка не образуется даже при кипячении. Добавляют в четвертую пробирку около 0,5 мл 10%-ного  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , несколько капель насыщенного раствора хлористого натрия и нагревают. Образуется осадок белка. Добавляют в пятую пробирку около 0,5 мл раствора  $\text{NaOH}$  и нагревают. Осадок не образуется даже при кипячении.

### **3 Определение изоэлектрической точки**

*Реактивы:* 1) желатин, 1% р-р; 2) 0,2 М раствор  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 3) 0,1 М раствор лимонной кислоты; 4) этанол.

Принцип метода: 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 связаны аминными, гуанидиновыми и имидными группами 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  $pH$  (неодинаковым для различных белков) кислотная диссоциация белковой части становится равной щелочной - число положительных зарядов амфотерного иона белка 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 передвижение ни к катоду, ни к аноду.  $pH$  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 кислореагирующих 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.

*Порядок выполнения работы:* В 6 пробирок наливают 0,2 М р-р двузамещенного фосфорнокислого натрия и 0,1 М р-р лимонной кислоты в количествах, указанных в таблице. В каждую пробирку к 1 мл заготовленной буферной смеси приливают по 0,5 мл 1 % р-ра желатина, перемешивают и добавляют по 2 мл этилового спирта. Содержимое пробирок вновь перемешивают и оставляют на 5 мин. Через 5 минут отмечают, в какой пробирке и при таком рН произошло наибольшее помутнение раствора. Отсутствие муты отмечают знаком минус (-), наличие и степень мутности - одним или двумя знаками плюс (+).

Результаты фиксируют в виде таблицы 3.

Таблица 3. Результаты определения изоэлектрической точки

№	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 М), мл	Лимонная кислота (0,1 М), мл	рН смеси	Желатин (1% р-р), мл	Спирт этиловый, мл	Степень мутности
1	0,13	0,37	3,2	0,25	1	
2	0,17	0,33	3,7	0,25	1	
3	0,21	0,29	4,2	0,25	1	
4	0,24	0,26	4,7	0,25	1	
5	0,27	0,23	5,2	0,25	1	
6	0,33	0,17	5,7	0,25	1	

### Вопросы для самоконтроля

- 1 Какие соединения называются белками?
- 2 Приведите классификацию белков. Структурная организация белков
- 3 Охарактеризуйте физико-химические свойства белков.
- 4 Что называется изоэлектрической точкой белка?

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №3. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ФЕРМЕНТОВ

### Общие сведения

Функции ферментов сводятся к ускорению химических реакций, причем, ферменты отличаются рядом уникальных свойств. Во-первых, это самые эффективные из известных катализаторов. Большинство реакций в клетке протекает примерно в миллион и более раз

быстрее, чем если бы они протекали в отсутствие ферментов. Во-вторых, большинство ферментов отличается специфичностью действия. В-третьих, действие большинства ферментов регулируется. Механизмы регуляции представляют сложную систему, посредством которой организм контролирует все свои функции.

Активность ферментов в очень сильной степени зависит от внешних условий, среди которых первостепенное значение имеют температура и pH среды.

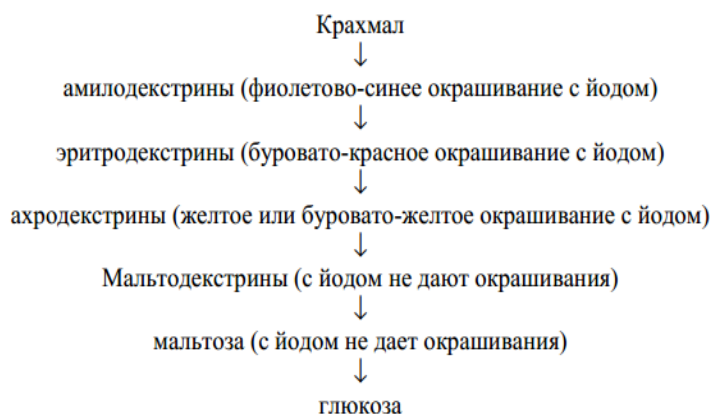
Активность ферментов подвержена значительным колебаниям в зависимости от воздействия ингибиторов (веществ, снижающих активность) и активаторов (веществ, увеличивающих активность), роль которых могут выполнять катионы металлов, некоторые ионы, переносчики фосфатных групп, промежуточные и конечные продукты метаболизма и т.п.

### Опыт 1.1. Ферментативный гидролиз крахмала

*Реактивы:* 1) I<sub>2</sub> (р-р Люголя); 2) крахмал, 0,5 % р-р; 3) разбавленная слюна; 4) NaOH, 5% р-р; 5) сульфат меди, 5 % р-р; 6. реактив Фелинга.

Для получения амилазы рот ополаскивают 2–3 раза дистиллированной водой для удаления остатков пищи, отмеряют цилиндром 30 мл дистиллированной воды и снова ополаскивают ею рот в течение 3–5 минут в несколько приемов. Собирают жидкость в стаканчик, фильтруют через вату, и фильтрат используют в качестве источника фермента – амилазы. Амилаза катализирует гидролиз α-гликозидной связи крахмала и гликогена (α, 1, 4) до промежуточных продуктов, называемых декстринами. В процессе ферментативного гидролиза крахмала увеличивается количество свободных гликозидных гидроксильных групп, имеющих восстанавливающие свойства, что можно проследить с помощью реакций Троммера или Фелинга.

Последовательно процесс расщепления крахмала можно представить следующим образом:



*Порядок выполнения работы:* На стеклянную пластинку, под которую подложен лист белой бумаги, наносят ряд отдельных капель (5-6) раствора йода. Наливают в одну пробирку около 3 мл раствора крахмала и около 1 мл разбавленной слюны, в другую - только крахмал. Встряхивают обе пробирки и ставят их в водяную баню при 37°C, помешивая стеклянной палочкой. Каждые 2 минуты берут стеклянными палочками из каждой пробирки каплю жидкости и наносят ее на каплю раствора йода. Сначала синее окрашивание будет проявляться от капель, взятых из обеих пробирок, затем из пробирки, где есть амилаза; капля начнет давать с йодом красно-бурый оттенок. Вскоре отмечают, что капля жидкости из пробирки со слюной окрашивания больше не дает, капли же, взятые из контрольного опыта, все время дают синее окрашивание. Наблюдают наличие опалесценции в контрольной пробирке (без слюны) и отсутствие опалесценции в пробирке со слюной. Отдельно проделывают с 1-2 мл содержимого каждой пробирки реакцию Троммера. С содержимым контрольной пробирки реакция будет отрицательная, а со слюной – положительная, так как образуется красный осадок закиси меди.

### **Опыт 1.2. Кислотный гидролиз крахмала**

*Реактивы:* 1) крахмал, 0,5% р-р; 2) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10% р-р; 3) H<sub>2</sub>O, дист.

*Порядок выполнения работы:* Наливают в небольшой стаканчик около 15 мл раствора крахмала (обратить внимание на опалесценцию раствора) и около 5 мл 10% серной кислоты. Кипятят жидкость минут 10, добавляя по мере выкипания дистиллированную воду. Охлаждают содержимое стаканчика (обратить внимание на отсутствие опалесценции) и нейтрализуют его раствором щелочи. Отдельно проделывают с частью нейтрализованного гидролизата реакцию Троммера или с Фелинговой жидкостью. Обе реакции будут положительными.

### **Опыт 1.3. Влияние активаторов и ингибиторов на амилазу слюны**

Активаторами и ингибиторами называются вещества, которые способны ускорить или затормозить действие ферментов. Механизм действия активаторов и ингибиторов не всегда ясен. В некоторых случаях в отсутствии активатора действие фермента совершенно не проявляется. Например, амилаза после диализа полностью теряет способность расщеплять крахмал и вновь ее приобретает после добавления NaCl. Активаторами и ингибиторами часто пользуются в биохимических исследованиях для изучения механизма действия отдельных ферментов, имеющихся в тканях. Прибавлением различных ядов удается блокировать активные центры одних ферментов, не изменяя при этом действие других. Если к отдельным порциям смеси, содержащей крахмал и амилазу, прибавить в одном случае NaCl, в другом - воду, в третьем - раствор CuSO<sub>4</sub> (или соли свинца, ионы серебра) и инкубировать в течение,

то через некоторое время при добавлении йода жидкость в пробе с NaCl окрасится в желтый цвет, в контрольной пробе с водой – в красный, а в пробе с CuSO<sub>4</sub> в синий.

Различная окраска жидкости обусловлена неодинаковой степенью гидролиза крахмала амилазой в присутствии NaCl и CuSO<sub>4</sub>.

*Реактивы:* 1) вода дист.; 2) NaCl, 1% р-р; 3) CuSO<sub>4</sub>, 1-5% р-р; 4) слюна, разбавленная в 5 раз; 5) крахмал, 0,5% р-р; 6) йод (р-р Люголя).

*Порядок выполнения работы:* Готовят 3 пробирки. В первую наливают 10 капель дистиллированной воды, во вторую - 8 капель воды + 2 капли 1 % р-ра NaCl, а в третью- 8 капель воды + 2 капли 1% р-ра CuSO<sub>4</sub>.

В каждую пробирку приливают по 10 капель слюны, разведенной в 5 раз, перемешивают, добавляют 5 капель 0,5% р-ра крахмала, вновь перемешивают, оставляют стоять при комнатной температуре.

Через 5-10 минут во все пробирки прибавляют по 5 капель раствора йода. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активатором амилазы является NaCl (2-я пробирка), а ингибитором амилазы является CuSO<sub>4</sub> (3-я пробирка).

#### **Опыт 1.4. Влияние температуры на скорость ферментативного катализа**

Скорость ферментативной реакции закономерно увеличивается примерно вдвое с повышением температуры на каждые 10°C. С 45-50°C начинается денатурация фермента от нагревания. Постепенно разрушение фермента приводит к тому, что скорость основного химического процесса, катализируемого ферментом, замедляется и, наконец, прекращается. Наивысшая температура, при которой сохраняются нативные свойства ферментов в течение длительного периода времени, называется оптимальной температурой. Для большинства ферментов оптимальная температура находится в пределах 45-50°C.

*Реактивы:* 1) крахмал, 0,5% р-р; 2) I<sub>2</sub>, 0,1% р-р в 0,2 % р-ре KI; 3) слюна, разбавленная в 10 раз; 4) вода дист.; 5) NaOH, 10% р-р.

*Порядок выполнения работы:* В 4 пронумерованных пробирки наливают по 4 мл раствора крахмала и по 1 мл разведенной в 10 раз водой слюны. Первую пробирку быстро помещают в кипящую водяную баню, вторую - в лед, третью - в термостат при 37-40°C, а четвертую оставляют при комнатной температуре.

Через 10 минут содержимое каждой пробирки разделить приблизительно на две части. С одной частью проводят пробу на крахмал: добавляют к содержимому 2 капли раствора Люголя, – синее окрашивание свидетельствует о наличии негидролизованного крахмала. Со второй частью содержимого проводят реакцию Троммера или с Фелинговой жидкостью:

добавляют 1 мл 10% NaOH и по каплям 1% CuSO<sub>4</sub> до образования не исчезающей голубой мути. Нагревают пробирки до кипения. Появление желтого окрашивания, переходящего в кирпично-красное, свидетельствует о наличии восстанавливающих углеводов (глюкозы), появившихся после полного расщепления крахмала. Результаты работы сравнивают и анализируют.

### **Опыт 1.5. Открытие действия фермента липазы**

Липаза – один из ферментов подкласса 1 класса гидролаз. Ферменты, входящие в состав этого подкласса, в присутствии воды действуют на сложноэфирные связи. Липаза катализирует гидролиз нейтрального жира. Липазу можно открыть, добавив ее раствор к молоку, содержащему эмульгированный жир. Полученную смесь подщелачивают раствором карбоната натрия до бледно-розовой окраски (на фенолфталеин). В присутствии липазы происходит гидролитическое расщепление жира на глицерин и жирные кислоты, реакция среды при этом сдвигается в кислую сторону, розовая окраска исчезает.

*Исследуемый материал:* молоко.

*Реактивы:* раствор панкреатина, дистиллированная вода, фенолфталеин, 1-процентный раствор карбоната натрия.

*Оборудование:* пробирки, пипетки, термостат.

*Порядок проведения работы:* В 2 пробирки наливают по 10 капель молока. В первую пробирку добавляют 5 капель панкреатина, содержащего липазу. Во вторую пробирку добавляют такое же количество воды. В обе пробирки добавляют по капле 1-процентного раствора фенолфталеина и по капле раствора карбоната натрия до появления бледно-розового окрашивания (нельзя добавлять избыток карбоната натрия). Пробирки помещают в термостат на 30 минут. Наблюдают изменение окраски.

*Оформление работы.* Описать химизм действия ферментов оксидоредуктаз и гидролаз. Сделать вывод.

### **Опыт 1.6. Исследование действия липазы поджелудочной железы**

Жиры, или триацилглицерины, практически не всасываются в пищеварительном тракте. В тонкой кишке происходит их гидролиз, который катализируется липолитическими ферментами, вырабатываемыми поджелудочной железой. Существует несколько типов панкреатических липаз. Одни из них специфичны в отношении эфирных связей в  $\alpha$ -положении триацилглицерина, а другие гидролизуют связи в  $\beta$ -положении. Полный гидролиз триацилглицеринов происходит постадийно: сначала гидролизуются  $\alpha$ -связи, а затем более медленно гидролизуются  $\beta$ -моноацилглицерины. Конечные продукты переваривания (глицерин, высшие жирные кислоты, моно- и диацилглицерины) всасываются в стенках

кишечника. В процессе переваривания и всасывания липидов важную роль играют желчные кислоты. Они эмульгируют жиры, активируют липазу и обеспечивают всасывание нерастворимых продуктов переваривания.

*Исследуемый материал:* молоко, разведенное в соотношении 1:10.

*Реактивы:* спиртовой раствор фенолфталеина; 0,01-процентный раствор NaOH; панкреатин, содержащий липазу.

*Оборудование:* колбы на 25 мл, мерные цилиндры на 10 мл, пипетки, термостат, кипящая водяная баня, бюретка.

*Порядок проведения работы:* Готовят 3 колбы для опытных и контрольной проб. Для контрольной пробы липазу, содержащуюся в панкреатине, предварительно кипятят в течение 10 мин на кипящей бане. В каждую колбу наливают молоко, препарат липазы и желчь, как указано в табл.4.

Таблица 4. Пробы для анализа

Компоненты инкубационной смеси	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Контроль, мл
Молоко, разведенное в соотношении 1:10	10	10	10
Препарат липазы	1	1	1 (прокипяченная)
Препарат желчи	-	1	-

Приготовленные инкубационные смеси тщательно перемешивают. Затем из каждой колбы отбирают по 2 мл смеси в заранее приготовленные стаканчики для титрования. В каждый стаканчик добавляют по 2 капли раствора фенолфталеина и титруют раствором NaOH до слабо-розового окрашивания. При первом титровании нейтрализуются органические кислоты – молочная и другие, – которые присутствуют в молоке до начала действия липазы. Оставшуюся в колбах смесь помещают в термостат (температура 38–40 °С), через определенные интервалы (10, 20, 30, 40 мин) из каждой пробы отбирают, не вынимая из термостата, по 2 мл смеси и титруют 0,01 моль/л раствором NaOH. Время титрования и объем гидроксида натрия фиксируют в табл. 5.

Таблица 5. Результаты титрования

Время инкубации, мин	Объем NaOH, пошедшего на титрование, мл		
	Опыт 1, мл	Опыт 2, мл	Контроль, мл
0			
10			
20			
30			

Результаты первого титрования, полученного до начала действия липазы, вычитают из результатов последующих титрований. На основании полученных данных строят график, где по оси абсцисс откладывают время (в минутах), а по оси ординат – активность липазы, выраженную объемом раствора NaOH (мл), потраченного на нейтрализацию жирных кислот, образовавшихся за данный отрезок времени.

Делают выводы об условиях работы липазы.

#### Вопросы для самоконтроля

1. Общая характеристика ферментов. Что называют кофактором, коферментом, апоэнзимом и холоферментом?
2. Классификация и номенклатура ферментов. Какие классы ферментов Вы знаете?
3. Опишите механизм действия энзимов.
4. Основные свойства ферментов как биологических катализаторов.
5. Активность фермента. От каких факторов она зависит?

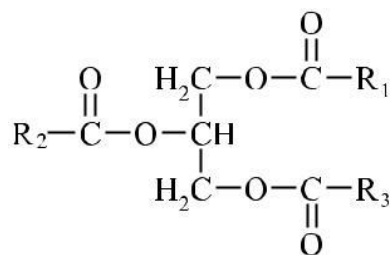
### ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №4. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ЛИПИДОВ

#### *Общие сведения*

Жиры – сложные эфиры трехатомного спирта глицерина и высших жирных карбоновых кислот (ВЖК). Соединения с одним остатком жирной кислоты относятся к группе моноацилглицеридов. Путем последующей этерификации этих соединений можно перейти к диацил- и триацилглицеридам. Так как молекулы жиров не несут заряда, эту группу веществ называют нейтральными жирами.

Углеродные атомы не эквивалентны. При введении одного заместителя в группу -  $\text{CH}_2\text{OH}$  центральный атом углерода становится асимметричным.





Три остатка жирной кислоты могут различаться как по длине цепи, так и по числу двойных связей. Жиры, экстрагированные из биологического материала, всегда представляют собой смесь близких по свойствам веществ, различающихся только остатками жирных кислот. В пищевых жирах чаще всего содержатся пальмитиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая кислоты. Остатки ненасыщенных ВЖК обычно находятся в положении С-2 глицерина.

Триацилглицерины, выделенные из разных органов одного и того же организма, могут значительно различаться по составу. В частности, в подкожных жирах больше насыщенных, а в жирах печени ненасыщенных кислот.

Консистенция жира обусловлена наличием в нем предельных и непредельных кислот. Животные жиры (сало) содержат значительное количество насыщенных кислот, благодаря чему они при комнатной температуре твердые. Температура плавления триацилглицеринов повышается с увеличением числа и длины остатков насыщенных кислот. Жиры, в состав которых входят ненасыщенные кислоты, при обычной температуре жидкие (масло).

Физико-химические свойства жиров определяются входящими в них жирными кислотами. Качество и чистота жиров характеризуются рядом констант: плотностью, температурой плавления и застывания, числом омыления, йодным, кислотным, перекисным числами. Жиры способны вступать во все химические реакции, свойственные сложным эфирам. Наибольшее значение имеет реакция омыления, которая может происходить как при ферментативном гидролизе, так и при действии щелочей.

### **Физико-химические свойства жиров**

#### **1. Растворимость и эмульгирование жиров**

Характерным свойством жиров является их хорошая растворимость во многих органических растворителях и нерастворимость их в воде. При смешивании жиров с водой образуются эмульсии, стойкость которых зависит от среды, в которой она образуется. Наличие в воде эмульгаторов (мыла, желчных кислот, карбонатов) делает эмульсии более стойкими. Образование эмульсий обусловлено тем, что в поверхностный водный слой, окружающий жировые капли, устремляются поверхностно-активные частицы желчных кислот, мыла, карбонатов, которые обволакивают капельки жира и препятствуют их слиянию. В желудочно-кишечном тракте эмульгаторами являются соли желчных кислот, белки, фосфолипиды.

### Опыт 1.1.

*Порядок проведения работы:* В четыре пробирки помещают по 0,2–0,3 мл растительного масла, затем в первую добавляют 5 мл воды, во вторую – 5 мл спирта, в третью – 5 мл бензола, в четвертую – 5 мл хлороформа. Содержимое всех пробирок энергично встряхивают. В первой пробирке масло и вода быстро разделяются на два слоя, во второй – образуется мутный раствор, вследствие плохой растворимости масла в спирте, в третьей и четвертой – образуются прозрачные растворы.

### Опыт 1.2.

*Порядок проведения работы:* Берут пять пробирок. В первую пробирку наливают 1 мл воды, во вторую – 1 мл желчи, в третью – 1 мл 1 % раствора белка, в четвертую – 1 мл 1 % раствора мыла, в пятую – 1 мл 1 % раствора карбоната натрия. Во все пробирки добавляют 5 капель растительного масла, содержимое всех пробирок энергично встряхивают и оставляют на 5 минут.

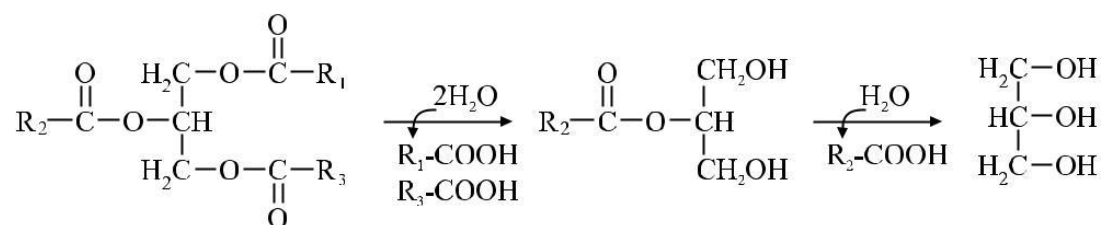
Во всех пробирках, кроме первой, образуются эмульсии. Отмечают различия стойкости эмульсий.

## 2. Гидролиз жира и обнаружение продуктов гидролиза

Гидролиз жиров занимает особое место среди реакций, характерных для триацилглицеринов. С его помощью устанавливают их строение.

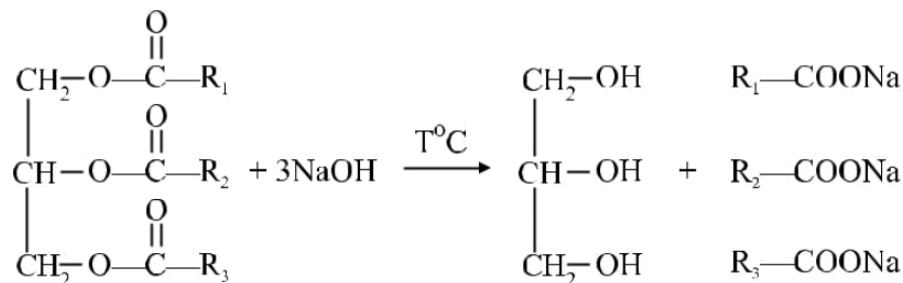
Гидролиз – первая стадия утилизации и метаболизма пищевых жиров в организме. Расщепление жиров, входящих в состав пищи, происходит у человека и млекопитающих преимущественно в верхних отделах тонкого кишечника, где имеются благоприятные условия для эмульгирования жиров. Наиболее мощное эмульгирующее действие на жиры оказывают натриевые соли желчных кислот.

Гидролиз эмульгированных триацилглицеринов под действием панкреатической липазы происходит поэтапно: сначала быстро гидролизуются сложноэфирные связи C1 и C2, а потом медленно идет гидролиз 2-моноацил-глицерина:



Таким образом, основными продуктами, образующимися при распаде жиров в кишечнике, являются моноацилглицерины, жирные кислоты, глицерин.

В промышленности гидролиз жиров осуществляют либо под действием перегретого пара, либо при нагревании с водой в присутствии минеральных кислот и щелочей. Наибольшее значение имеет омыление жиров, так как в этой реакции образуются мыла — соли высших жирных кислот.

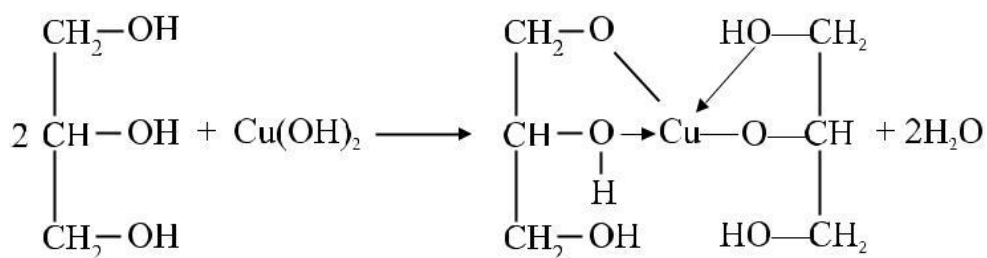
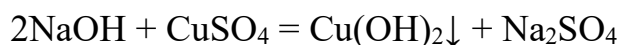


### Опыт 2.1.

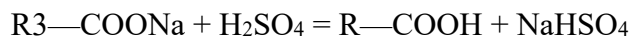
*Порядок проведения работы:* В колбу емкостью 50 мл помещают 1 мл растительного масла, добавляют 20 мл 50 % спиртового раствора гидроксида калия или гидроксида натрия, содержимое тщательно перемешивают. Колбу с обратным воздушным холодильником нагревают на кипящей водяной бане 30–60 минут до образования однородного раствора. Конец гидролиза устанавливают следующим образом: каплю гидролизата помещают на поверхность воды в стаканчике. Если не образуется жирных пятен, гидролиз завершен. К полученному гидролизату добавляют 10 мл дистиллированной воды и открывают глицерин и жирные кислоты.

### Опыт 2.2.

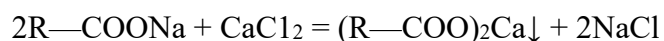
*Порядок проведения работы:* В пробирку наливают 2–3 мл гидролизата, добавляют равный объем 10 % раствора гидроксида натрия и 3–5 капель 2 % раствора сульфата меди. Содержимое пробирки тщательно перемешивают. Наблюдают образование синей окраски в результате образования глицерата меди.



В пробирку наливают 2 мл гидролизата и добавляют равный объем 10 % раствора серной кислоты и помещают в кипящую водяную баню до образования на поверхности раствора жирного слоя высших карбоновых кислот.



В пробирку наливают 2 мл гидролизата, добавляют 1 мл 10 % раствора хлорида кальция. Пробирку встряхивают. Наблюдается появление осадка — нерастворимой кальциевой соли высших жирных кислот.



### 3. Определение числа омыления

Числом омыления называется количество миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации всех жирных кислот, содержащихся в 1 г жира как свободных, так и входящих в состав триацилглицеринов. Число омыления для различных жиров колеблется в пределах 200–300 мг: например, для сливочного масла – 216–240 мг, свиного сала – 195–203 мг, оливкового масла – 185–196 мг.

*Порядок проведения работы:* В колбу помещают 1 г масла, вливают 20 мл 0,5 М спиртового раствора гидроксида калия, соединяют с обратным холодильником и помещают на 40–50 минут в кипящую водяную баню. То же самое проделывают с контрольной колбой, в которой масло заменено 1 мл воды (контроль).

По истечении времени колбы охлаждают, добавляют по 4 капли фенолфталеина, по 10 мл воды, перемешивают и титруют 0,5 М раствором соляной кислоты до исчезновения окраски. По разности титрования контрольной и опытной колб рассчитывают число омыления:

$$\text{ЧО} = (V_1 - V_2) \cdot 28,5 / m,$$

где  $V_1$  – количество 0,5 М раствора соляной кислоты, израсходованное на контрольное титрование (мл),

$V_2$  – то же на опытное титрование;

28,5 – количество гидроксида калия, эквивалентное 1 мл 0,5 М раствора соляной кислоты (мг);

$m$  – навеска масла (г).



встряхивают в течение 6 минут, затем титруют 0,005 М раствором тиосульфата натрия, добавляя 10 капель 1 % раствора крахмала в качестве индикатора.

Перекисное число вычисляют по формуле:

$$\text{ПЧ} = V_2 - V_1,$$

где  $V_2$  – объем 0,005 М раствора тиосульфата натрия, израсходованный на титрование йода (мл),

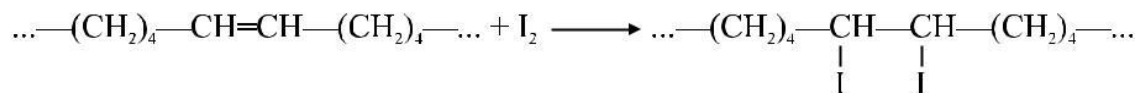
$V_1$  – то же, израсходованное в контроле.

## 5. Определение йодного числа

Природные жиры и масла представляют собой смеси смешанных триацил-глицеринов. Мерой их ненасыщенности служит йодное число. Йодное число соответствует количеству граммов йода, которое может присоединиться к 100 г жира. Состав природных жиров и масел и их йодные числа варьируют в достаточно широких пределах: например, йодное число сливочного масла – 28–42, оливкового масла – 77–95, трескового жира – 154–170.

Йодное число является важным показателем для жиров, оно позволяет судить о степени ненасыщенности масла, о склонности его к «высыханию», прогорканию и другим изменениям, происходящим при хранении и переработке пищевых масел.

С двойными связями жирных кислот, кроме йода, реагируют и другие галогены (хлор, бром). Однако они не только присоединяются по двойным связям, но и замещают атомы водорода в радикале. Йод же в определенных условиях реагирует преимущественно по двойным связям. Определение йодного числа основывается на реакции присоединения йода по двойным связям:



*Порядок проведения работы:* Берут две конические колбы емкостью 50 мл: в одну колбу помещают навеску масла 0,1–0,2 г, во вторую – 0,1–0,2 мл воды (контроль).

В обе колбы приливают по 10 мл 0,1 М спиртового раствора йода, тщательно перемешивают до полного растворения масла. Если масло плохо растворяется, можно подогреть колбу на водяной бане. Через 15 минут содержимое колб оттитровывают 0,1 н. раствором тиосульфата натрия, сначала до появления слабо-желтого окрашивания, а потом, прибавив 1 мл 1 % раствора крахмала, титруют до исчезновения синего окрашивания.

Разность между количеством 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, затраченного на титрование контроля и опыта, является показателем количества йода, связанного навеской масла. Йодное число вычисляют по формуле:

$$\text{ЙЧ} = (V_1 - V_2) \cdot 0,01269 \cdot K \cdot 100 / m,$$

где  $V_1$  – объем 0,1 н. раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование контрольной пробы (мл),

$V_2$  – то же самое, израсходованное на титрование опытной пробы (мл);

0,01269 – количество граммов йода, эквивалентное 1 мл 0,1 н. раствора тиосульфата натрия;

$K$  – коэффициент поправки на титр 0,1 н. раствора тиосульфата натрия;

100 – коэффициент пересчета на 100 г жира;

$m$  – навеска жира (г).

По полученным результатам сделать вывод о качестве исследуемых жиров.

#### **Вопросы для самоконтроля**

1. Приведите классификацию жиров и краткая характеристика каждого класса.
2. Физические свойства жиров.
3. Химические свойства жиров и качественные реакции на жиры.
4. Гидролиза жиров и его количественные характеристики.

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №5. ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ УГЛЕВОДОВ**

#### *Общие сведения*

#### *Моносахариды*

Моносахариды являются полигетерофункциональными соединениями, в молекулах которых одновременно содержатся одна оксогруппа (альдегидная или кетонная) и несколько гидроксильных групп. Моносахариды с химической точки зрения представляют собой полигидроксикарбонильные соединения, т. е. полигидроксиальдегиды (альдозы) и полигидроксикетоны (кетозы).

Моносахариды в зависимости от длины углеродной цепи (3–10) делятся на триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы и т. д.

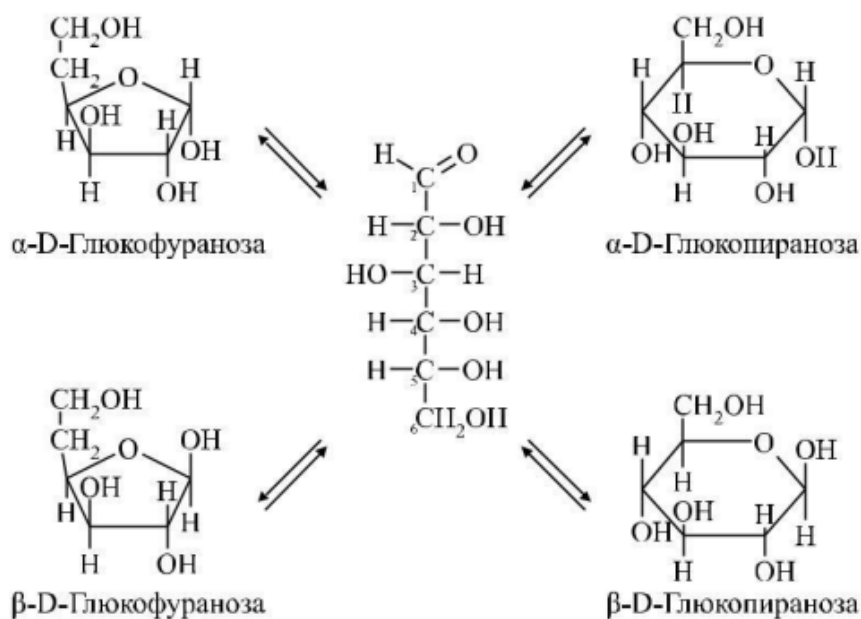
Важнейший природный моносахарид D-глюкоза является альдозой, содержащей шесть углеродных атомов, пять из которых имеют гидроксильные группы. Четыре углеродных атома (C-2 – C-5) являются хиральными центрами, кроме D-глюкозы существует 15 изомерных альдогексоз, лишь немногие из них встречаются в природе. У большинства природных моносахаридов C-5 имеет конфигурацию глицеринового альдегида (конфигурационный стандарт по М. А. Розанову).

В нейтральном растворе менее 0,1% молекул глюкозы находятся в ациклической форме. Подавляющая часть глюкозы присутствует в форме циклического полуацетала, образованного взаимодействием карбонильной группы с одной из гидроксильных групп. В альдогексозах реакция идет главным образом с гидроксильной группой C-5, с образованием шестичленного пиранозного цикла. Если в реакцию вступает гидроксильная группа C-4, то образуется пятичленный фуранозный цикл. Пиранозный цикл альдогексоз термодинамически более устойчив. В растворе все формы ациклические, пиранозная и фуранозная находятся в динамическом равновесии.

В циклической форме возникает дополнительный центр хиральности, так как асимметрическим становится атом углерода, входивший ранее в альдегидную группу. Этот хиральный центр называется аномерным, а соответствующие два стереоизомера –  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномерами.

Циклические моносахариды принято изображать в виде проекционных формул – проекции Хеуорса. Заместители при хиральных атомах углерода располагаются над или под плоскостью кольца в зависимости от их конфигурации. Гидроксильные группы, которые в ациклической форме (проекция Фишера) находятся справа, в циклической форме (проекция Хеуорса) располагаются под плоскостью кольца, а находящиеся слева – над плоскостью кольца.





### Таутомерные превращения D-глюкозы

В проекции Хеурса не учитывается тот факт, что в действительности пиранозный цикл не плоский, а имеет форму кресла. Полуацетальная гидроксильная группа у  $\beta$ -аномера D-глюкопиранозы занимает экваториальное, а у  $\alpha$ -аномера – аксиальное положение. Таким образом,  $\beta$ -аномер, отличается от  $\alpha$ -аномера тем, что у него все заместители находятся в более выгодном экваториальном положении (в таутомерной смеси D-глюкопиранозы в количественном отношении преобладает  $\beta$ -аномер).

Моносахариды отличаются большой реакционной способностью, могут окисляться и восстанавливаться, полуацетальный гидроксил может замещаться другими в реакциях со спиртами, кислотами, фенолами. Ацилированию и метилированию способны подвергаться и спиртовые группы моносахаридов, однако это требует немного более жестких условий.

В разбавленных растворах щелочей при комнатной температуре происходит изомеризация моносахаридов, т. е. получение из одного моносахарида равновесной смеси моносахаридов, различающихся конфигурацией углеродных атомов C-1 и C-2. При нагревании с сильными минеральными кислотами (например, HCl) происходит дегидратация моносахаридов (отщепление трех молекул воды).

Альдопентозы при этом образуют фурфурол, гексозы – 5-гидрокси-метил-фурфурол, которые способны вступать в реакции конденсации с  $\alpha$ -нафтолом, резорцином, дифениламино и др. с образованием окрашенных продуктов.

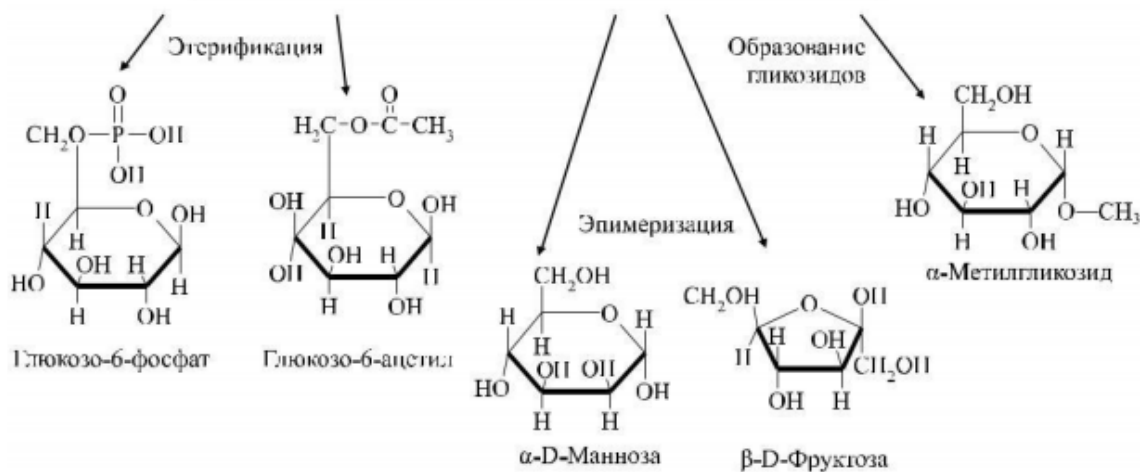
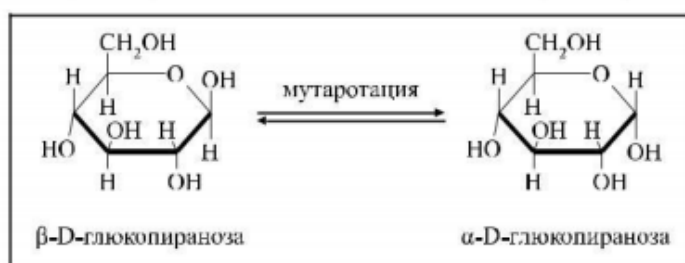
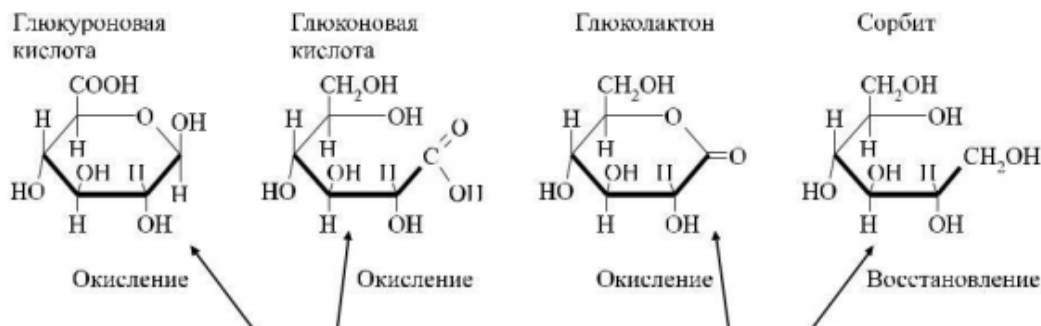
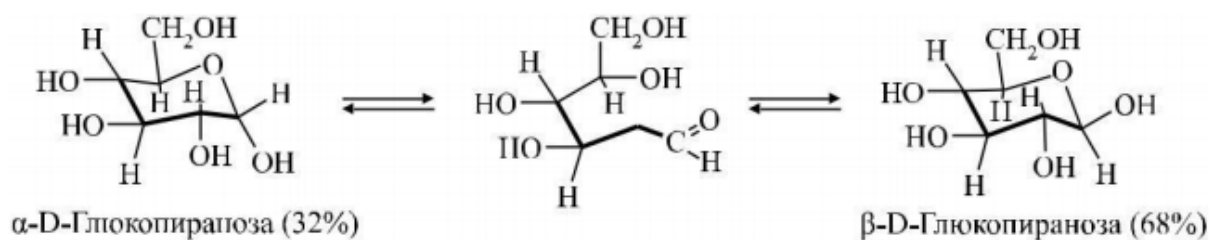


Схема химических превращений D-глюкозы

### Дисахариды

При образовании гликозидной связи между аномерной гидроксильной группой одного моносахарида и OH-группой другого моносахарида получается дисахарид. Поскольку синтез природных дисахаридов с участием ферментов строго специфичен, гликозидная связь может находиться только в одной из возможных конфигураций ( $\alpha$  или  $\beta$ ). Существуют два типа связывания моносахаридных остатков: за счет полуацетальной OH-группы одного и любой спиртовой OH-группы другого моносахарида (восстанавливающие дисахариды) и за счет полуацетальных OH-групп общих моносахаридов (не-восстанавливающие дисахариды).

В природе в виде самостоятельно существующих дисахаридов встречается ограниченное число, основные из них мальтоза, целлобиоза, лактоза, сахароза.

Значительно шире распространены дисахаридные фрагменты, входящие в состав гликозидов растительного и бактериального происхождения.

### *Полисахариды*

Полисахариды широко распространены в природе. По функциональным свойствам они подразделяются на три группы. Структурные полисахариды придают клеткам, органам и целым организмам механическую прочность.

Водорастворимые полисахариды высоко гидратированы и предохраняют от высыхания клетки и ткани. Резервные полисахариды служат энергетическим ресурсом. Благодаря полимерной природе резервные полисахариды осмотически неактивны и поэтому могут накапливаться в клетках в больших количествах.

Полисахариды, построенные из моносахаридных звеньев одного типа, называются гомогликанами, а построенные из различных моносахаридных звеньев – гетерогликанами. К группе гомогликанов относятся многие полисахариды растительного (крахмал, целлюлоза, пектиновые вещества), животного (гликоген, хитин), бактериального (декстраны) происхождения. К гетерогликанам относятся многие животные и бактериальные полисахариды, мурамин, хондроитинсульфаты, гиалуроновая кислота, гепарин и др.

Полисахариды могут быть линейными и разветвленными.

## **1 Качественные реакции на углеводы**

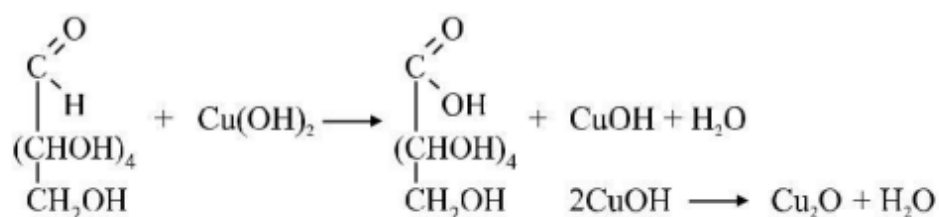
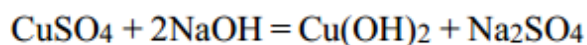
### *Восстанавливающие свойства моносахаридов*

Реакции окисления являются важнейшими в химии углеводов, их используют в биохимических анализах для обнаружения моносахаридов (в частности, глюкозы).

В зависимости от условий окисления моносахаридов образуются различные продукты. В щелочной среде альдозы способны восстанавливать катионы металлов (меди, серебра, висмута), соли при этом окисляются с образованием различных продуктов окисления.

Для обнаружения моносахаридов применяют реактивы Толленса, Бенедикта, Фелинга. Принцип действия этих реактивов одинаков и основан на восстановлении двухвалентной меди до одновалентной.

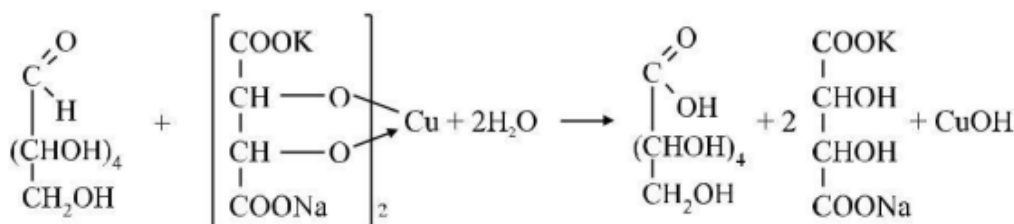
### Опыт 1.1. Реакция Троммера



*Реактивы:* глюкоза (5%); гидроксид натрия (5%); сульфат меди (5%).

*Порядок проведения работы:* К 3 мл 5% раствора глюкозы приливают 1 мл 5% раствора щелочи и 5 капель 5% раствора сульфата меди. Содержимое пробирки окрашивается в голубой цвет. Осторожно нагревают содержимое пробирки до кипения. Наблюдают выпадение желтого осадка гидроксида меди (I) или красного осадка оксида меди (I).

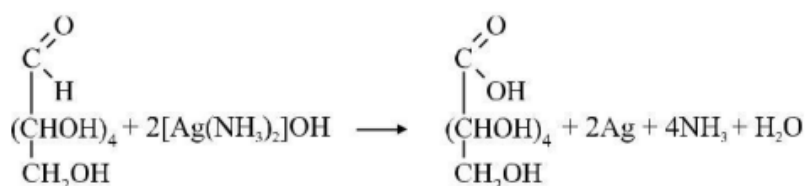
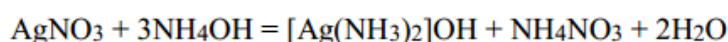
### Опыт 1.2. Реакция Фелинга



*Реактивы:* глюкоза (5%); реактив Фелинга: А. 200 г сегнетовой соли и 150 г гидроксида натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1 л; Б. 40 г перекристаллизованного сульфата меди растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1 л. Равные объемы растворов А и Б смешивают перед началом работы.

*Порядок проведения работы:* К 2 мл 5% раствора глюкозы приливают равный объем реактива Фелинга и нагревают пробирку до кипения. Наблюдают появление красного осадка.

### Опыт 1.3. Реакция серебряного зеркала по Толленсу



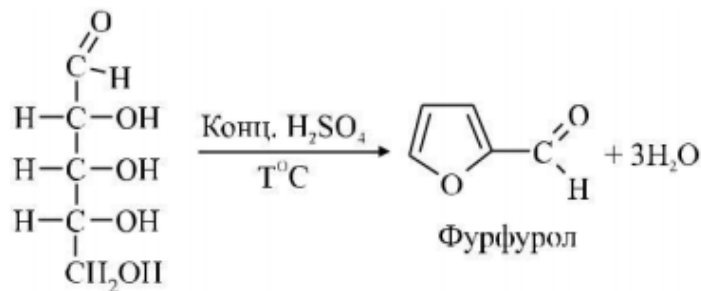
*Реактивы:* глюкоза (5%); гидроксид натрия (5%); нитрат серебра (5%); водный раствор аммиака (10%).

*Порядок проведения работы:* В пробирку наливают 1 мл раствора нитрата серебра, 1 мл раствора гидроксида натрия и по каплям водный раствор аммиака до растворения образующегося серого осадка. Затем к содержимому пробирки добавляют 3 мл раствора глюкозы, перемешивают и осторожно нагревают в пламени горелки до появления бурого окрашивания. Далее реакция идет без нагревания. Наблюдают выпадение металлического серебра в виде черного осадка или его осаждения на стенках пробирки в виде блестящего зеркального налета.

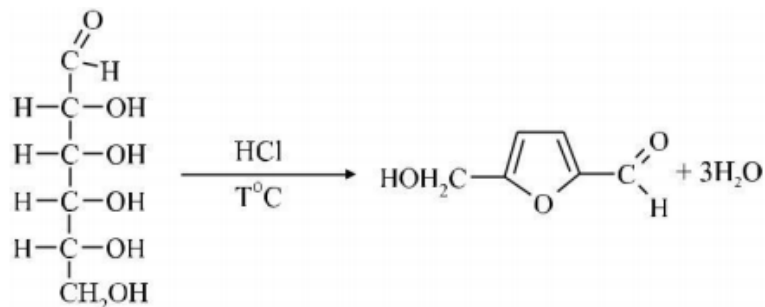
### **Реакция на основе дегидратации моносахаридов**

При нагревании с сильными минеральными кислотами ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HCl}$ ) происходит дегидратация моносахаридов (отщепление трех молекул воды).

Альдо-пентозы при этом образуют фурфурол:



Альдо- и кетогексозы при нагревании с  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  дают 5-гидрокси-метил-фурфурол:

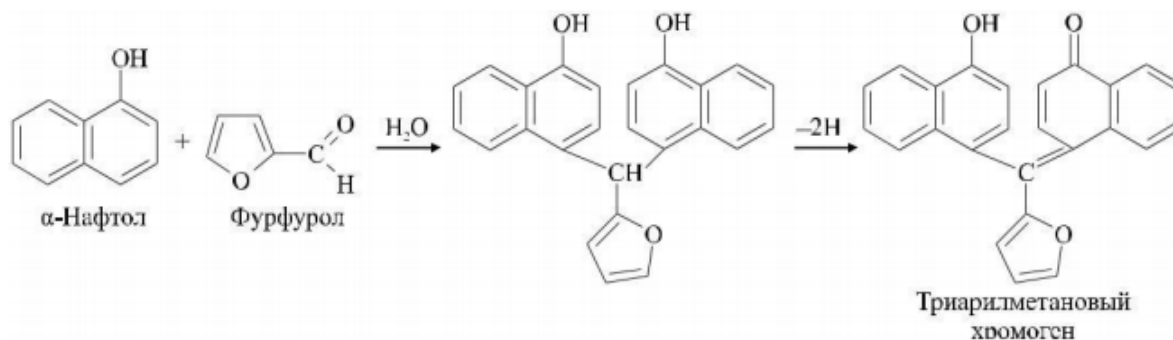


Фурфурол и 5-гидрокси-метил-фурфурол способны вступать в реакции конденсации с фенолами ( $\alpha$ -нафтолом, резорцином, флороглюцином) и ароматическими аминами (анилином, дифениламином) с образованием окрашенных продуктов, например, фурфурол с анилином дает красное окрашивание, 5-гидрокси-метил-фурфурол – красное окрашивание с резорцином.

### **Опыт 1.4. Реакция Подобедова — Молиша**

Реакция с  $\alpha$ -нафтолом является чувствительной и широко используется для обнаружения моносахаридов.

Продукты дегидратации пентоз и гексоз (фурфурол и 5-гидроксиметилфурфурол), соединяясь с 2 моль  $\alpha$ -нафтола образуют продукты конденсации красного и красно-фиолетового цвета.

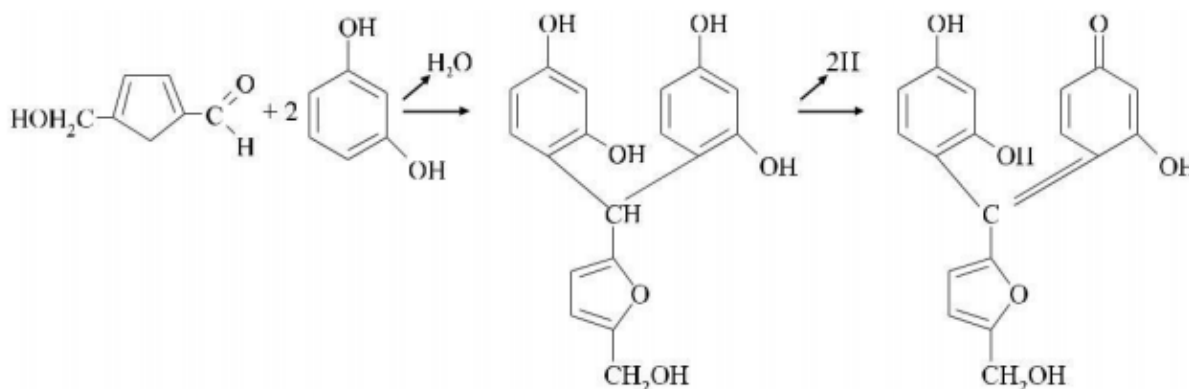


*Реактивы:* глюкоза (1%); спиртовой раствор  $\alpha$ -нафтола (1%); серная кислота (конц.).

**Порядок проведения работы:** в пробирку наливают 5 мл 1% раствора глюкозы и добавляют 2 мл 1% спиртового раствора  $\alpha$ -нафтола и осторожно по стенке пробирки приливают 3 мл концентрированной серной кислоты, которая опускается на дно пробирок. На дне или на границе раздела жидкостей образуются красно-фиолетовые кольца.

#### Опыт 1.5. Реакция Селиванова

Продукт конденсации кетоз — оксиметилфурфурол — дает с резорцином соединение, окрашенное в вишнево-красный цвет:



Альдозы также дают эту реакцию, но она у них протекает значительно медленнее, что обуславливает специфичность реакции Селиванова на кетогексозы.

*Реактивы:* глюкоза (1%); фруктоза (1%); реактив Селиванова: 0,05 г резорцина растворяют в 100 мл разбавленной (1:1) соляной кислоты; соляная кислота (конц.).

**Порядок проведения работы:** В две пробирки наливают по 3 мл реактива Селиванова, затем в одну прибавляют 2 капли 1% раствора фруктозы, в другую – 2 капли 1% раствора глюкозы. Обе пробирки помещают в термостат при 80 °С и оставляют на 8 минут. За это время в пробирке с фруктозой появляется вишнево-красное окрашивание.

## 2. Реакции на дисахариды

Восстанавливающие дисахариды, имеющие свободный гликозидный гидроксил, способны окисляться до соответствующих кислот, участвуя в реакциях, характерных для альдоз. Невосстанавливающие дисахариды, не имеющие свободного гликозидного гидроксила, в такие реакции не вступают. Наиболее широко для обнаружения восстанавливающих дисахаридов используют методы, в основе которых лежит гидролиз дисахаридов с последующим обнаружением продуктов гидролиза.

### Опыт 2.1. Восстанавливающая способность лактозы и мальтозы

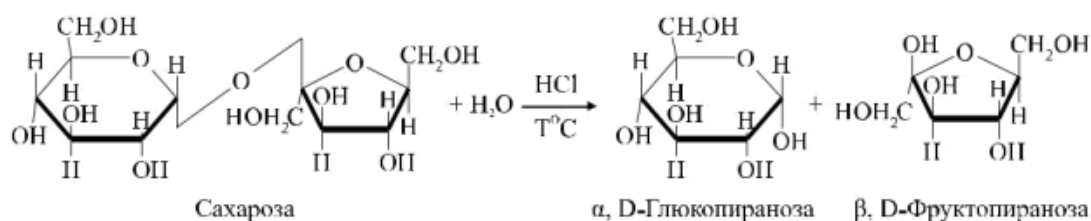
Благодаря наличию свободной альдегидной группы в молекуле лактозы (в остатке глюкозы) и мальтозы (у второго остатка глюкозы) эти дисахариды обладают редуцирующими свойствами и способны участвовать в реакциях восстановления: Троммера, Фединга, Толленса и т. д.

*Реактивы:* мальтоза (5%), лактоза (5%), сахароза (5%), гидроксид натрия (5%), сульфат меди.

*Порядок проведения работы:* В одну пробирку наливают 2 мл 5% раствора лактозы, в другую – 2 мл 5% раствора глюкозы. В обе пробирки затем приливают по 1 мл раствора гидроксида натрия и по 5 капель раствора сульфата меди. Пробирки осторожно нагревают в пламени горелки и наблюдают образование красного осадка.

### Опыт 2.2. Гидролиз сахарозы и открытие продуктов гидролиза

В молекуле сахарозы связь между остатками глюкозы и фруктозы образуется за счет двух гликозидных гидроксильных групп. Сахароза не обладает восстанавливающими свойствами. После гидролиза сахарозы образуются моносахариды, которые можно обнаружить, например, реакцией Троммера глюкозу, а реакцией Селиванова — фруктозу.



*Реактивы:* сахароза (5%), соляная кислота (конц. и 25%), кристаллический бикарбонат натрия, реактив Селиванова, гидроксид натрия (5%); сульфат меди (5%).

*Порядок проведения работы:* В две пробирки наливают по 6 мл 5% раствора сахарозы: в одну из них добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты, вторая пробирка –

контрольная. Обе пробирки выдерживают в термостате при температуре 100 °С в течение 5 минут. После охлаждения гидролизат нейтрализуют сухим бикарбонатом натрия, добавляя его небольшими порциями до тех пор, пока не прекратится выделение углекислого газа. Затем с опытным и контрольным растворами проводят реакции Троммера и Селиванова. Отмечают изменение окраски в гидролизатах и отсутствие таковой в контрольных пробах.

### **3. Реакции на полисахариды**

Полисахариды отличаются друг от друга химической природой повторяющихся моносахаридных единиц, степенью разветвления и длиной цепи.

Полисахариды содержат редуцирующий гликозидный гидроксид на конце цепи и поскольку доля его относительно всей микромолекулы весьма невелика, то полисахариды не проявляют восстановительных свойств.

#### **Опыт 3.1. Реакция крахмала и гликогена с йодом**

При взаимодействии крахмала и гликогена с йодом образуются комплексные адсорбционные соединения, окрашенные в реакции с крахмалом в синий цвет, а с гликогеном — в красно-бурый. Различие в цвете комплексов обусловлено химической структурой крахмала и гликогена.

При нагревании окраска исчезает, но появляется опять при охлаждении, что свидетельствует об образовании нестойких комплексов крахмала и гликогена с йодом.

Обесцвечивание происходит также при добавлении гидроксида натрия или калия. Исчезновение окраски при нагревании и добавлении щелочей обусловлено тем, что в образовании комплексов принимает участие молекулярный йод, а не йодид-ионы.

*Реактивы:* крахмал (0,1%); гликоген (0,1%); гидроксид натрия (10%); реактив Люголя: 1 г йода и 2 г йодида калия растворяют в 15 мл дистиллированной воды и затем доводят водой объем до 300 мл; гидроксид натрия (5%).

*Порядок проведения работы:* В одну пробирку помещают 2 мл 0,1% раствора крахмала, в другую – 2 мл 0,1% раствора гликогена. Затем в обе пробирки вносят по 1–2 капли реактива Люголя. Содержимое пробирок перемешивают и наблюдают появление окрашивания. Затем из каждой пробирки отливают по 1 мл в две другие пробирки. Одну пару пробирок помещают в термостат при 100 °С, а в другую пару добавляют по 1 мл 10% раствора гидроксида натрия. Наблюдают исчезновение окраски. Пробирки из термостата охлаждают, наблюдают вновь появление окраски.



### Опыт 3.2. Гидролиз крахмала и обнаружение продуктов гидролиза

При нагревании крахмала с минеральными кислотами происходит полный гидролиз с образованием глюкозы, которую можно обнаружить качественными реакциями.

*Реактивы:* крахмал (1%); соляная кислота (конц.), гидроксид натрия (5%); сульфат меди (5%)

*Порядок проведения работы:* В две пробирки помещают по 5 мл 1% раствора крахмала: в одну из них добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты, вторая пробирка является контрольной. Помещают пробирки в термостат при 100 °С на 15 минут, затем в обеих пробирках проводят реакцию Троммера. Наблюдают изменение окраски в пробирке с гидролизатом и отсутствие таковой в контрольной пробе.

По результатам проведенных реакций заполните табл. 6.

Таблица 6. Качественные реакции на углеводы

Название реакции	Использованные реактивы	Окраска	Чем обусловлена реакция?

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №6. КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ВИТАМИНЫ

### *Общие сведения*

Витамины – жизненно важные органические соединения, необходимые для человека и животных в ничтожных количествах, но имеющие огромное значение для нормального роста, развития и самой жизни. Витамины обычно поступают с растительной пищей и продуктами животного происхождения, поскольку они не синтезируются в организме человека и животных.

Современная классификация витаминов не является совершенной: она основана на физико-химических свойствах (в частности, растворимости).

В зависимости от растворимости различают жирорастворимые и водорастворимые витамины.

Помимо этих двух главных групп, различают группу разнообразных химических веществ, некоторые из них частично синтезируются в организме человека и обладают витаминными свойствами. Эти вещества принято объединять в группу витаминоподобных: холин, липоевая кислота, пангамовая кислота, оротовая кислота, инозит, убихинон, пара-аминобензойная кислота, карнитин, витамин U, комплекс ненасыщенных жирных кислот (витамин F).

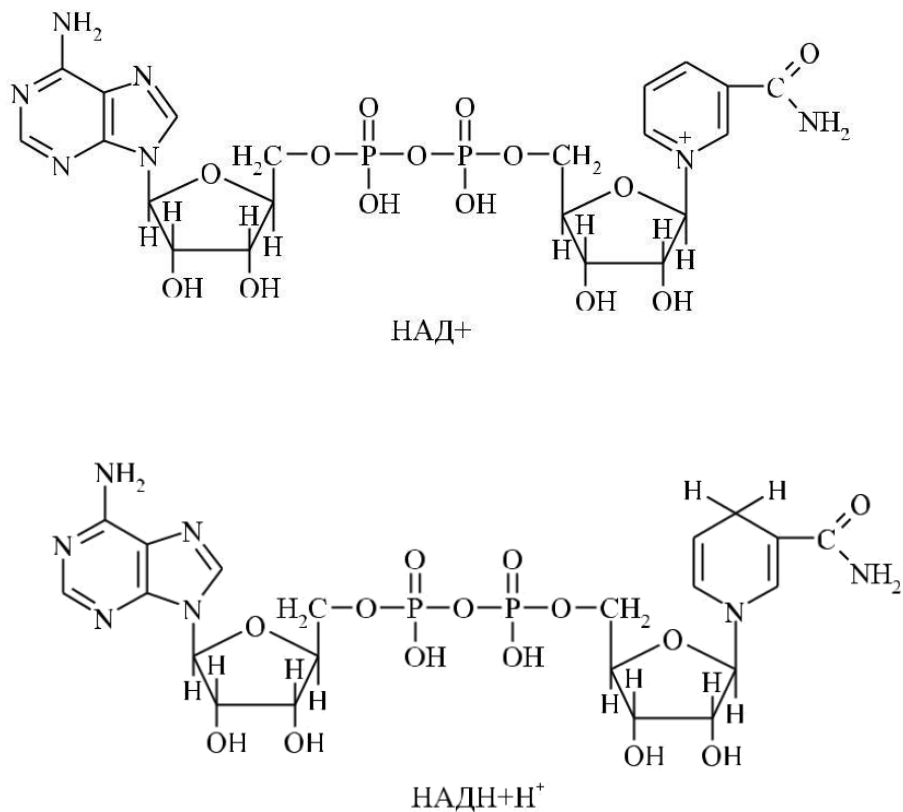
Для обнаружения витаминов в различных веществах или биологических жидкостях и определения их количества существуют качественные реакции, основанные на цветных реакциях, характерных для той или иной группировки, входящей в витамин.

### 1 Реакции на витамин РР

Никотиновая кислота представляет собой соединение пиридинового ряда, содержащее карбоксильную группу, никотинамид отличается наличием амидной группы:



Никотиновая кислота и ее амид входят в состав коферментов никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ) и катализируют окислительно-восстановительные реакции клеточного обмена:

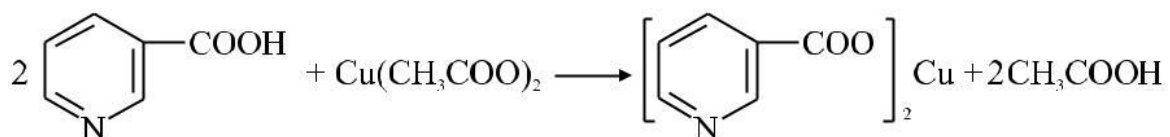


Никотиновая кислота – белое кристаллическое вещество, слабокислого вкуса, хорошо растворимое в воде, устойчиво, не разрушается при действии обычных химических и физических агентов. Никотиновая кислота является провитамином, а собственно антипелларгическим действием обладает амид никотиновой кислоты.

Никотинамид – кристаллическое бесцветное вещество, с температурой плавления 131–132 °С. Недостаточное содержание в пище никотинамида вызывает у людей заболевание, названное пеллагрой. Никотиновая кислота и ее амид широко распространены в животном и растительном мире.

### Опыт 1.1. Реакция с ацетатом меди

При нагревании витамина РР с раствором ацетата меди образуется плохо растворимый осадок медной соли витамина РР:



*Порядок проведения работы:* В пробирку помещают 5–10 мг витамина РР и растворяют при нагревании в 1–2 мл 10 % раствора уксусной кислоты. К нагретому до кипения раствору приливают равный объем 5 % раствора ацетата меди. Жидкость становится мутной, окрашивается в голубой цвет, а при стоянии выпадает синий осадок медной соли никотиновой кислоты.

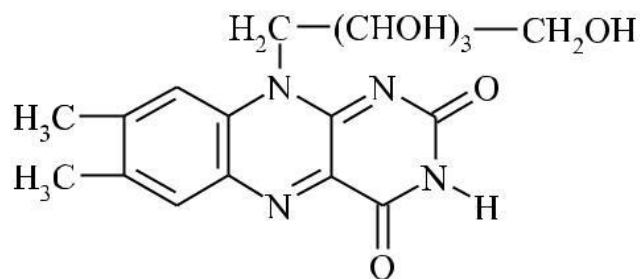
### Опыт 1.2. Реакция с гидросульфитом натрия

Витамин РР восстанавливается гидросульфитом натрия с образованием соединения желтого цвета.

*Порядок проведения работы:* В пробирку помещают 5–10 мг витамина РР, добавляют 1,5 мл 10 % раствора гидрокарбоната натрия, перемешивают и прибавляют 1,5 мл 5 % свежеприготовленного раствора гидросульфита натрия. Жидкость окрашивается в желтый цвет.

## 2. Реакция на витамин В<sub>2</sub>

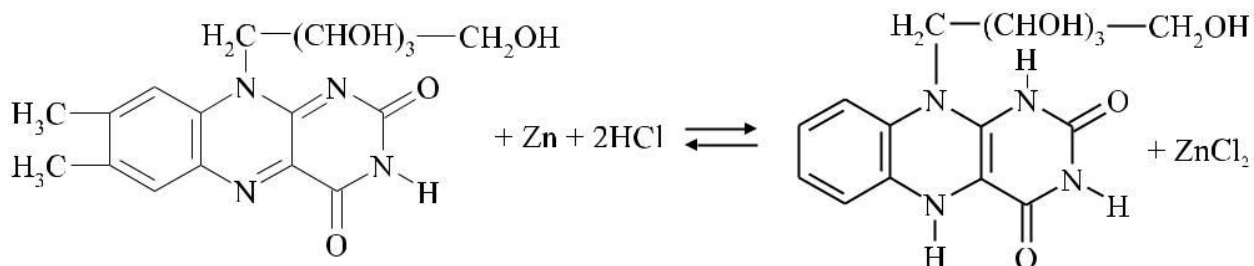
Основу молекулы рибофлавина составляет изоаллоксазин, в котором сочетаются бензольный, пиазиновый, пиримидиновый циклы, в положении 9 имеется остаток пятиатомного спирта – рибита:



Рибофлавин химически неустойчив, легко разрушается при кипячении и на свету. Под действием света он распадается на рибит и 6,7-диметилаллоксазин или люмихром. Рибофлавин легко окисляется и восстанавливается, наибольшей способностью присоединять атомы водорода обладают атомы азота, находящиеся в 1-м и 10-м положениях молекулы изоаллоксазина.

При авитаминозе рибофлавина приостанавливается рост, наблюдается выпадение волос, поражаются слизистые оболочки, утомляется зрение, нарушается нормальный синтез гемоглобина.

Образующийся при добавлении металлического цинка к концентрированной соляной кислоте водород восстанавливает желтый рибофлавин сначала в родофлавин красного цвета, затем в бесцветный лейкофлавин:



### Опыт 2.1

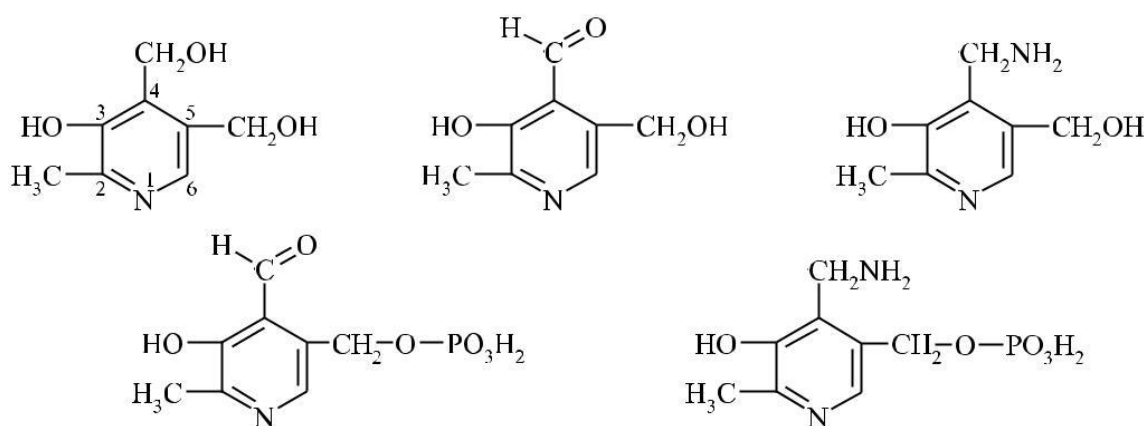
*Порядок проведения работы:* В пробирку приливают 1 мл 0,025 % раствора рибофлавина, 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и опускают кусочек металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с рибофлавином, восстанавливая его, и жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. При взбалтывании обесцвеченного раствора лейкофлавин вновь окисляется кислородом воздуха в рибофлавин.

### 3. Реакции на витамин В<sub>6</sub>

Группа витамина В<sub>6</sub> включает три родственных соединения (пиридоксин): пиридоксол, пиридоксаль, пиридоксамин, которые в биологических системах легко превращаются друг в друга. Термином «витамин В<sub>6</sub>» обозначают все три производных 3-оксипиридина, которые

отличаются друг от друга природой замещающей группы в положении 4 пиридинового ядра. Активной формой витамина В6 является пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат.

Пиридоксальфосфат представляет собой прочно связанную простетическую группу ферментов, катализирующих реакции с участием аминокислот. К наиболее распространенным и хорошо изученным реакциям относятся реакции переаминирования, в которых аминогруппа  $\alpha$ -аминокислоты обратимо переносится на  $\alpha$ -углеродный атом  $\alpha$ -кетокислоты. В результате реакций переаминирования, катализируемых аминотрансферазами, прочно связанный с апоферментом пиридоксальфосфат служит промежуточным переносчиком аминогруппы от ее донора  $\alpha$ -аминокислоты к акцептору  $\alpha$ -кетокислоте.

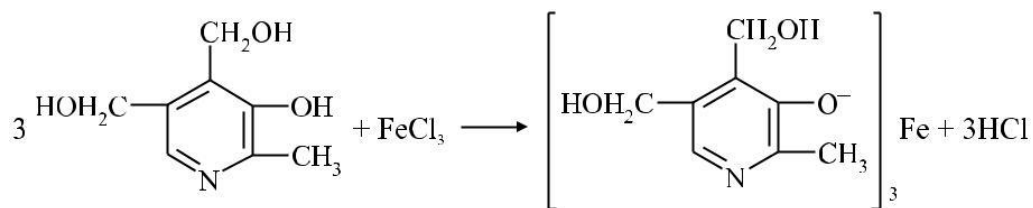


Из трех названных выше веществ, образующих пиридоксиновый комплекс, наиболее изучен пиридоксол, который представляет собой бесцветные кристаллы с температурой плавления 160 °С, горькие на вкус, хорошо растворимые в воде и спирте. Растворы пиридоксола устойчивы к нагреванию с кислотами и щелочами, но быстро теряют активность под действием света.

Отсутствие в пище витамина В6 сопровождается резким нарушением обмена белков, липидов, развивается атеросклероз, различного рода дерматиты, нарушается кроветворение.

### Опыт 3.1 Реакция с хлоридом железа (III)

При взаимодействии витамина В6 с раствором хлорида железа (III) жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования соли типа фенолята железа.

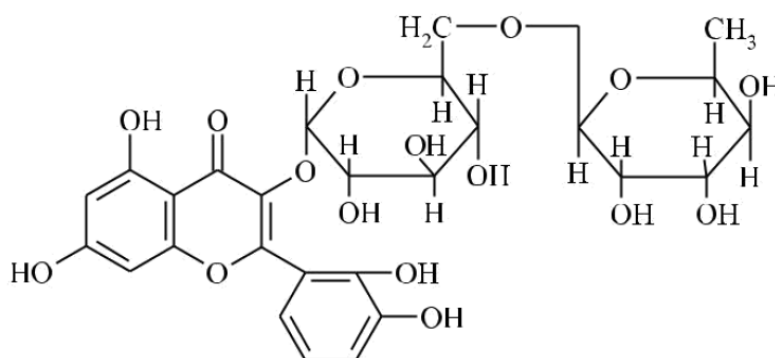


*Порядок проведения работы:* В пробирке смешивают 1 мл 1 % водного раствора пиридоксина и 2 капли 1 % раствора хлорида железа (III). Смесь встряхивают. Наблюдают окрашивание жидкости в красный цвет.

#### 4. Реакции на витамин Р

Витамин Р представляет собой семейство веществ, близких по химической структуре: катехины, халконы, дигидрохалконы, флавины, флавононы, изофлавоны и др. Все они обладают Р-витаминной активностью и в основе их структуры лежит дифенилпропановый углеводородный скелет флавона.

В настоящее время известно свыше десятка соединений, обладающих Р-витаминным действием. Их называют биофлавоноидами. Они отличаются различной степенью гидроксирования бензольных колец, а также различными гликозидными группировками, присоединяющимися по 3-му углеродному атому пиранового кольца, так, например, рутин содержит в своем составе остаток дисахарида — рутинозы:



Препараты витамина Р – желтые кристаллические вещества, труднорастворимые в воде. При отсутствии витамина Р в пище человека и животных повышается проницаемость капилляров, что сопровождается внезапными кровоизлияниями после сдавления тканей, болью в конечностях. Предполагают, что витамины группы Р участвуют в окислительно-восстановительных реакциях. Действие витаминов Р и С взаимосвязано: каждый из них в присутствии другого обладает гораздо более высоким терапевтическим эффектом, чем в одиночку.

##### Опыт 4.1. Реакция с хлоридом железа (III)

Хлорид железа (III) с рутином образует комплексное соединение, окрашенное в изумрудно-зеленый цвет.

*Порядок проведения работы:* К 2 мл насыщенного водного раствора рутина прибавляют несколько капель 1 % раствора хлорида железа (III). Наблюдают появление зеленого окрашивания.

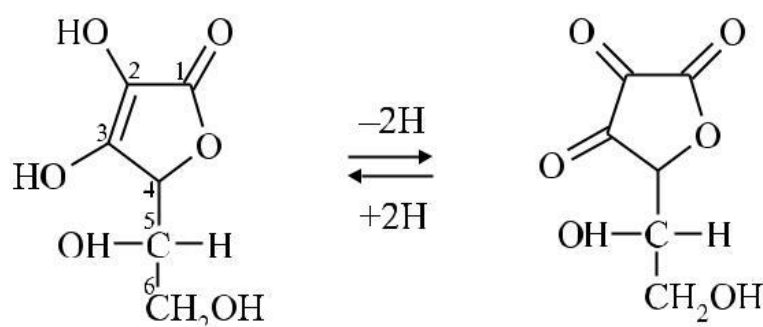
#### Опыт 4.2. Реакция с концентрированной серной кислотой

Концентрированная серная кислота образует с флавонолами флавиевые соли, растворы которых имеют ярко-желтую окраску.

*Порядок проведения работы:* К 2 мл насыщенного водного раствора рутина осторожно по стенке пробирки приливают 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе двух жидкостей возникает окрашенное в желтый цвет кольцо.

#### 5. Реакции на витамин С

Витамин С (L-аскорбиновая кислота) представляет собой  $\gamma$ -лактон 2,3-де-гидрогулоновой кислоты:



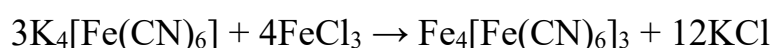
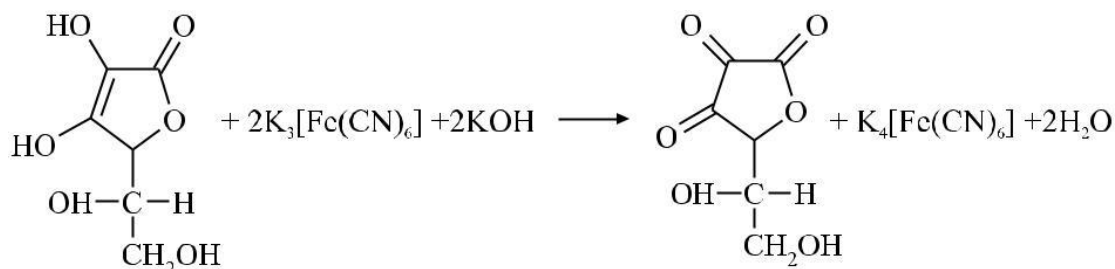
Обе гидроксильные группы имеют кислотный характер, в связи с чем при потере протона соединение может существовать в форме аскорбат-иона. Аскорбиновая кислота содержит два асимметричных атома углерода в 4-м и 5-м положениях, что дает возможность образования четырех оптических изомеров. Витаминной активностью обладают изомеры, относящиеся к L-ряду.

Витамин С — бесцветное кристаллическое вещество с т. пл. 192 °С, хорошо растворимое в воде и спирте. В бескислородной среде устойчиво, может храниться годами. В присутствии кислорода и щелочей витамин С быстро разрушается. Аскорбиновая кислота широко распространена в природе, присутствует во всех тканях и органах животных и растений. Витамин С является участником окислительно-восстановительных систем и обеспечивает нормальное протекание жизненно важных процессов в тканях.

При авитаминозе витамина С у человека развивается цинга, сопровождающаяся кровоизлияниями, разрушением зубов. В основе этих явлений лежат нарушения в синтезе коллагена. Аскорбиновая кислота играет роль кофактора в реакции гидроксилирования пролина, в результате которой образуется гидроксипролин — основной компонент коллагена.

#### Опыт 5.1. Реакция с гексациано-III-ферратом калия

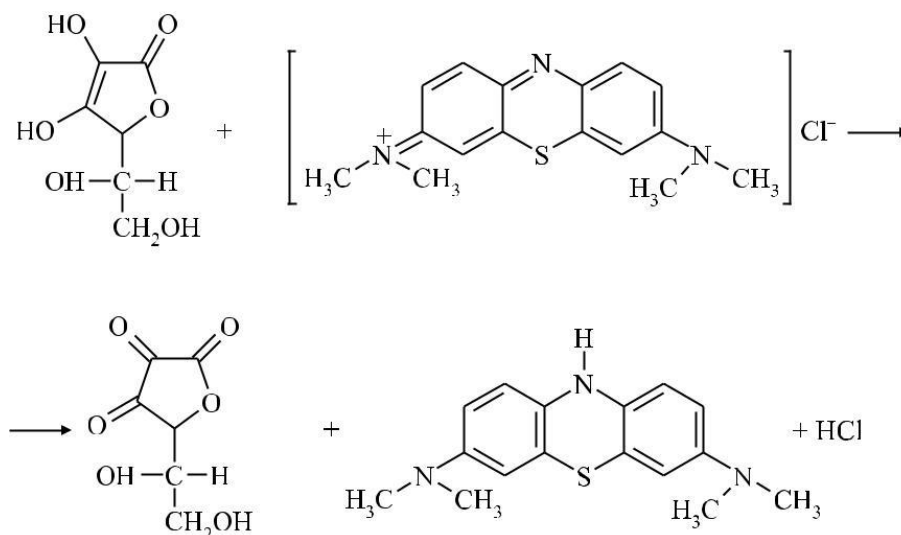
Аскорбиновая кислота легко вступает в окислительно-восстановительные реакции с гексациано-III-ферратом калия, который восстанавливается до гексациано-II-феррата калия, образующий с хлорным железом плохо растворимую в воде соль трехвалентного железа – берлинскую лазурь темно-синего цвета:



*Порядок проведения работы:* К 1 мл 0,1 % раствора аскорбиновой кислоты прибавляют 1 мл 1 % раствора гексациано-III-феррата калия и 0,5 мл 1 % раствора хлорида железа (III). Наблюдают образование сине-зеленого окрашивания.

### Опыт 5.2. Реакция с метиленовой синью

Метиленовая синь в присутствии аскорбиновой кислоты легко переходит в бесцветную лейкоформу:



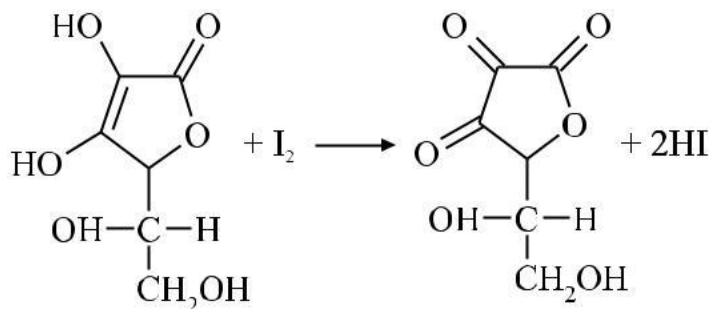
*Порядок проведения работы:* В две пробирки вносят по одной капле 0,01 % раствора метиленовой сини и 10 % раствора карбоната натрия. В первую пробирку вносят 5 капель 0,1 % раствора аскорбиновой кислоты, во вторую — 5 капель воды и ставят обе пробирки в



термостат при 37 °С. Через некоторое время в пробирке с аскорбиновой кислотой жидкость обесцвечивается.

### Опыт 5.3. Реакция с йодом

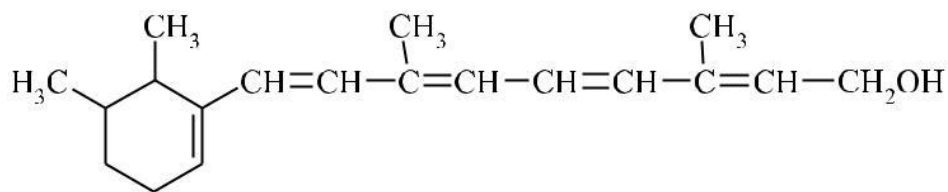
Раствор йода в йодиде калия при добавлении к нему раствора витамина С обесцвечивается за счет восстановления аскорбиновой кислоты йодом:



*Порядок проведения работы:* В две пробирки наливают по 10 капель дистиллированной воды и по 1–2 капле 0,01 % раствора йода в 0,2 % растворе йодида калия. В одну пробирку добавляют 10 капель аскорбиновой кислоты, в другую – столько же воды. В пробирке с аскорбиновой кислотой раствор йода обесцвечивается.

### 6. Реакции на витамин А

Витамин А имеет несколько витамеров, из которых наиболее распространен витамин А, содержащий β-ионное кольцо и боковую цепь, состоящую из двух остатков изопрена и первичной спиртовой группы, в результате чего он получил название ретинола, или аскерофтола:



Ретинол – кристаллическое вещество лимонно-желтого цвета, хорошо растворим в жирах, бензине, эфире. Витамины группы А легко окисляются в присутствии кислорода. Окисляясь в организме при участии биокатализаторов, ретинол превращается в ретиналь, обладающий А-витаминной активностью.

Провитамин А является желтый пигмент растений – каротин. В организме каротин под влиянием каротиказы превращается в витамин А.

Витамин А входит в состав зрительного пурпура – родопсина, находящегося в палочках сетчатки. Под действием кванта света происходит распад родопсина на 11-цис-ретиналь и

опсин. Для участия в акте зрения организм постоянно нуждается в цис-ретиале. Основная функция витамина А в организме человека – участие в акте зрения.

При отсутствии в пище витамина А в организме человека и животных развивается ряд специфических патологических изменений: ослабление зрения, поражение роговой оболочки, эпителиальных тканей, торможение роста, общее истощение организма.

#### **Опыт 6.1. Реакция с концентрированной серной кислотой**

Витамин А в бензольном растворе с концентрированной серной кислотой образует комплекс, окрашенный в синий цвет.

*Порядок проведения работы:* В пробирку с 1–2 каплями раствора витамина А прибавляют 2–3 капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки окрашивается в синий цвет, который через некоторое время переходит в фиолетовый цвет, а затем в бурый.

#### **Опыт 6.2. Реакция с сульфатом железа (II)**

Витамин А с сульфатом железа (II) в кислой среде образует соединение, имеющее розово-красную окраску. Каротины дают при этой реакции зеленоватое окрашивание.

*Порядок проведения работы:* В пробирку с 2–3 каплями раствора рыбьего жира в хлороформе (или масляного раствора витамина А) прибавляют 5–10 капель ледяной уксусной кислоты, насыщенной сульфатом железа (II) и 1–2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в розово-красное.

### **7. Количественное определение витамина С**

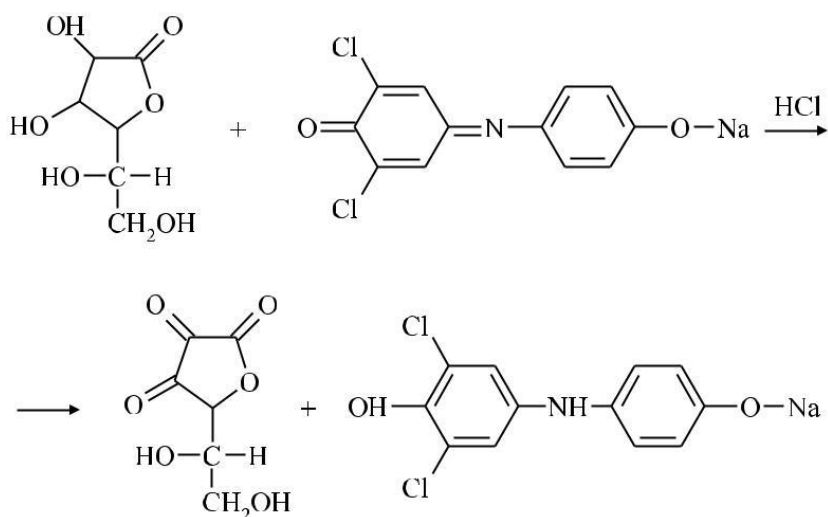
Современные методы количественного определения витаминов в биологических объектах делят на физико-химические и биологические.

При взаимодействии витаминов с рядом химических соединений наблюдаются характерные цветные реакции, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации витаминов в исследуемом растворе. Поэтому витамины можно определять фотоколориметрически. Эти методы позволяют судить как о наличии витамина, так и о количественном содержании их в исследуемом пищевом продукте или органах и тканях человека и животных. Для выяснения обеспеченности организма человека каким-либо витамином часто определяют соответствующий витамин в сыворотке крови, моче. Однако фотоколориметрические методы могут быть применимы не во всех случаях. Например, витамин А имеет специфическую полосу поглощения при 328–330 нм. Для определения витаминов А, В1, В2 и других применяют флюорометрические методы. Широко используют

и титрометрические методы. Например, витамин С определяют, титруя его раствор в кислой среде 2,6-дихлорфенолиндофенолом.

Биологические методы основаны на определении того минимального количества витамина, которое при добавлении к искусственной диете, лишенной только данного изучаемого витамина, предохраняет животное от развития авитаминоза или излечивает его от уже развившейся болезни. Количество витаминов принято выражать в миллиграммах, микрограммах.

Метод количественного определения витамина С основан на способности витамина С восстанавливать 2,6-дихлор-фенолиндофенол, который в кислой среде имеет красную окраску, а при восстановлении обесцвечивается, в щелочной среде окраска синяя. Для предохранения витамина С от разрушения исследуемый раствор титруют в кислой среде щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолом до появления розового окрашивания.



Для расчета содержания аскорбиновой кислоты в миллиграммах на 100 г растительного продукта используют формулу:

$$X = 0,088 \cdot A \cdot \Gamma \cdot 100 / B \cdot B,$$

где X – содержание витамина С в миллиграммах на 100 г продукта,

0,088 – содержание аскорбиновой кислоты (мг),

A – результат титрования 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенолом (мл),

B – объем экстракта, взятый для титрования (мл),

B – количество продукта, взятого для анализа (г),

Г – общее количество экстракта (мл), 100 – пересчет на 100 г продукта.

*Порядок проведения работы:*

1. Приготовление растительного материала. Взвешивают исследуемый растительный материал: 1 г ягод шиповника, или 1 г сосновой хвои, или 1 г капусты, или 5 г картофеля, или 5 г капусты. Мелко измельчают, помещают в ступку и растирают с небольшим количеством кварцевого песка, 2 мл 10 % соляной кислоты, 8 мл дистиллированной воды. Затем без потерь содержимое ступки переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят водой до метки. Полученную смесь оставляют на 5–10 минут, постоянно перемешивая. Затем содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр. Экстракт, полученный из картофеля, не фильтруют.

2. Титрование. Для титрования отмеряют 2 мл фильтрата, добавляют 10 капель 10 % раствора соляной кислоты и титруют 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6 дихлорфенолиндофенола до розовой окраски, сохраняющейся в течение полминуты.

3. Расчет. Вычисляют содержимое аскорбиновой кислоты в 100 г исследуемого растительного материала по формуле, приведенной выше.

#### **Вопросы для самоконтроля**

1. Общая характеристика и классификация витаминов.
2. Понятие а-, гипо-, гипervитаминозов.
3. Жирорастворимые витамины: общая характеристика, строение, биологическое значение.
4. Водорастворимые витамины: общая характеристика, строение, биологическое значение.
5. Коферментная функция витаминов.
6. Качественные реакции на витамины

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА №7.**

#### **ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ПЕРЕВАРИВАНИЯ НУТРИЕНТОВ В ЖКТ**

##### **1 Анализ эмульгирования жиров**

Эмульгирование жиров необходимо для ускорения переваривания жиров пищи в полости кишечника ферментом липазой, так как оно вызывает увеличение соприкосновения жира с водным раствором липазы. Эмульгаторами являются поверхностно-активные вещества – белки, соли желчных кислот, мыла.

Наибольшей эмульгирующей активностью обладают щелочно-реагирующие соли желчных кислот, которые вместе с желчью изливаются в двенадцатиперстную кишку через желчный проток. Они адсорбируются на поверхности жировых капель, образуя тончайший

слой, причем гидрофильные группы желчных кислот обращены в сторону водной фазы, а гидрофобные радикалы направлены к жиру. При этом происходит уменьшение поверхностного натяжения на разделе двух фаз (вода/жир), что приводит к распаду капелек жира на более мелкие.

*Реактивы:* растительное масло или рыбий жир, желчь (разведенная в 2 раза), раствор белка, натриевое мыло (1%-ный раствор), натрий углекислый (1%-ный раствор).

*Порядок проведения работы:* Берут 5 пробирок:

- в первую наливают 15 капель дистиллированной воды,
- во вторую – 15 капель разведенной желчи,
- в третью – 15 капель раствора белка,
- в четвертую – 15 капель 1%-ного раствора мыла
- в пятую – 15 капель 1%-ного раствора соды.

В каждую пробирку добавляют по 3–4 капли растительного масла, одновременно взбалтывают содержимое всех пробирок и ставят их по порядку в штатив. Наблюдают в первой пробирке расслоение неустойчивой эмульсии на жир и воду, а в остальных – образование эмульсии.

Эмульгирование жира содой обусловлено образованием мыла в результате взаимодействия углекислого натрия с присутствующими в жире свободными жирными кислотами.

Результаты опыта занести в таблицу 7, отметив стойкость образовавшейся эмульсии, сделать вывод о стойкости эмульсии в присутствии различных эмульгаторов.

Таблица 7. Эмульгирование жира

Исследуемый жир	Эмульгаторы				
	Без эмульгатора	желчь	белок	мыло	сода

## 2. Анализ переваривания белков пепсином

Переваривание белков начинается в желудке под влиянием желудочного сока. Желудочный сок, выделяемый железами слизистой оболочки стенок желудка, представляет собой жидкость, содержащую 99% воды, свободную соляную кислоту, кислореагирующие фосфаты, хлористый натрий, протеолитический фермент – пепсин, липолитический фермент – липазу (расщепляет только эмульгированный жир и другие вещества). Пепсин выделяется главными клетками желез слизистой желудка в виде неактивного профермента – пепсиногена. Под влиянием соляной кислоты от пепсиногена отщепляются полипептиды, в результате чего

он превращается в активный фермент пепсин, способный к гидролитическому расщеплению пептидных связей белков. Оптимальное значение рН для пепсина человека составляет 1,5–2,5. В нейтральной и щелочной средах пепсин неактивен. Соляная кислота не только участвует в активации пепсиногена и создании оптимального значения рН, но и способствует набуханию и денатурации белков, что создает более благоприятные условия для действия пепсина.

Пепсин является эндопептидазой, так как действует преимущественно на внутренние пептидные связи. Однако под влиянием пепсина разрываются также некоторые пептидные связи, находящиеся на конце полипептидной цепи, что сопровождается появлением свободных аминокислот. В результате гидролиза белков пепсином образуются пептоны – смесь более или менее сложных полипептидов, а также в небольшом количестве свободные аминокислоты.

*Реактивы:* мышечная ткань; 0,1%-ный раствор пепсина в 0,2%-ной соляной кислоте (имитированный желудочный сок), натрий углекислый (2%-ный раствор), гидроксид натрия (0,4%-ный и 10%-ный растворы), соляная кислота (0,2%-ный раствор), сернокислая медь (1%-ный раствор).

*Порядок проведения работы:* В одну пробирку наливают 20 капель имитированного желудочного сока; в другую – 20 капель имитированного желудочного сока, нейтрализованного содой; в третью пробирку - 20 капель имитированного желудочного сока, предварительно подщелоченного 0,4%-ным раствором гидроксида натрия; в четвертую пробирку – 20 капель имитированного желудочного сока, предварительно подвергнутого кипячению; в пятую – 20 капель 0,2%-ного раствора соляной кислоты. Во все пять пробирок добавляют одинаковые небольшие кусочки (1×1 см) мышечной ткани и пробирки помещают в термостат при температуре 38-40° на 30 мин. Затем пробирки вынимают из термостата и наблюдают изменения мышечной ткани.

Распад мышц в первой пробе указывает на то, что пепсин действует в присутствии соляной кислоты. Мышцы во второй и третьей пробах остались неизменными, так как пепсин в нейтральной и щелочной средах не активен. В четвертой пробе, где фермент инактивирован кипячением, и в пятой пробе, в которой пепсина не было, может произойти набухание мышечной ткани под влиянием соляной кислоты.

Содержимое каждой пробирки фильтруют и с фильтратом проводят биуретовую реакцию. Продолжительная реакция обнаруживается только в первой пробе, где был активный пепсин, соляная кислота и мышечная ткань, что указывает на присутствие в фильтрате продуктов переваривания белков.

Оформить результаты работы в виде таблицы 8 и сделать выводы, указав оптимальные условия для переваривания белков пепсином и роль соляной кислоты в этом процессе.

Таблица 8 – Действие пепсина на мышечную ткань

№ пробы	Фермент	Субстрат	Реакция среды	Инактивация пепсина кипячением	Видимые изменения мышечных волокон	Биуретовая реакция