

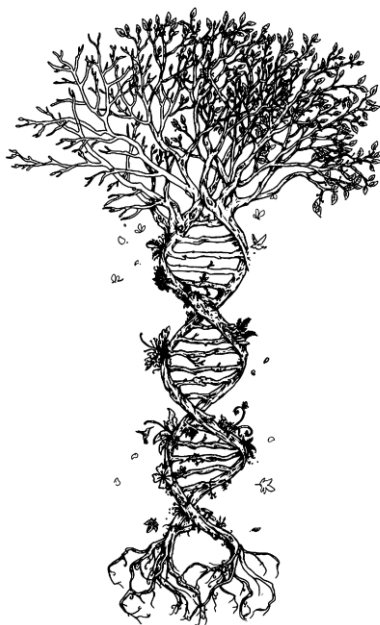


Казанский федеральный  
УНИВЕРСИТЕТ  
ИНСТИТУТ  
фундаментальной медицины  
и биологии

Ганеева Л.А., Зайнуллин Л.И., Абрамова З.И.  
Тенишева Н.Х.

# БИОХИМИЯ

## ПРАКТИКУМ



Казань, 2016

УДК 577.11: 577.12

Рекомендовано к публикации учебно-методической комиссией ИФМиБ,  
протокол №3 от 15.04.2015г.

Авторы: Ганеева Л. А., Зайнуллин Л. И., Абрамова З.И. Тенишева Н. Х., .

Рецензенты: к.б.н. :Невзорова Т.А.,  
к.б.н. Свинтенко Г.Ю.

Биохимия. Практикум : Учебное пособие по курсу «Медицинская биохимия»  
/Л. А. Ганеева, Л. И. Зайнуллин, З.И. Абрамова, Н. Х. Тенишева. — Казань :  
ИСБ, 2015. — 176 с.

В пособие включены лабораторные работы, отражающие основные разделы классической биохимии: биохимия белков, ферментов, витаминов, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот и гормонов. Каждый раздел включает практические работы, а также теоретическое обоснование, что способствует лучшему усвоению материала. Основой данного методического пособия послужил практикум по биохимии, который был напи-сан Тенишевой Н. Х. и долгие годы служил незаменимым руководством для студентов, изучающих биохимию. Данная редакция пособия включает в себя некоторые корректи-вы и дополнения.

Настоящее учебное пособие составлено в соответствии с программой по биохимии и может быть рекомендовано для студентов медицинских, биологических и фармацевтических специальностей.

**УДК 577.11: 577.12**

© Издательство Сергея Бузукина, 2015

# Оглавление

|   |    |
|---|----|
| <b>ГЛАВА 1. БЕЛКИ</b> .....   | 7  |
| <b>АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ</b> .....   | 7  |
| <b>Работа 1.</b> Качественные реакции на аминокислоты и белки.....                                    | 9  |
| <i>Нингидриновая реакция</i> .....  | 10 |
| <i>Биуретовая реакция</i> .....   | 12 |
| <i>Ксантопротеиновая реакция</i> .....  | 14 |
| <i>Реакция Миллона</i> .....  | 14 |
| <i>Реакция Фоля</i> .....   | 15 |
| <i>Реакция Сакагучи</i> .....   | 16 |
| <i>Реакция Паули</i> .....  | 16 |
| <i>Реакция Адамкевича</i> .....   | 17 |
| <b>Работа 2.</b> Разделение смеси аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге ..... | 19 |
| <b>КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ</b> .....  | 23 |
| <b>Работа 3.</b> Количественное определение общего белка сыворотки крови по биуретовой реакции. ....  | 25 |
| <b>ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКА</b> .....   | 26 |
| <b>Работа 4.</b> Диализ солевого раствора белка.....  | 29 |
| <b>Работа 5.</b> Определение изоэлектрической точки казеина.....                                      | 30 |
| <b>Работа 6.</b> Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка методом высаливания .....           | 31 |
| <b>Работа 7.</b> Осаждение белков.....  | 31 |
| <i>Осаждение белков при нагревании</i> .....  | 31 |
| <i>Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами</i> .....                               | 32 |
| <i>Осаждение белков органическими кислотами</i> .....   | 32 |
| <i>Осаждение белков алкалоидными реактивами</i> .....   | 33 |
| <i>Осаждение белков солями тяжелых металлов</i> .....   | 33 |
| <i>Осаждение белков органическими растворителями</i> .....  | 34 |
| <b>КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ</b> .....   | 35 |
| <b>ГЛИКОПРОТЕИНЫ</b> .....  | 36 |
| <b>Работа 8.</b> Определение углеводного компонента в гликопротеинах .....                            | 38 |
| <i>Доказательство наличия углеводного компонента в яичном альбумине</i> .....                         | 38 |
| <i>Выделение муцина из слюны и определение его углеводного компонента</i> .....                       | 38 |

|   |    |
|---|----|
| <b>ФОСФОПРОТЕИНЫ</b> .....  | 38 |
| <b>Работа 9.</b> Выделение казеиногена из молока и гидролиз его,<br>определение продуктов гидролиза ..... | 39 |
| <b>ХРОМОПРОТЕИНЫ</b> .....  | 40 |
| <b>Работа 10.</b> Качественное определение геминовой группировки<br>гемоглобина .....                     | 40 |
| <b>ОБМЕН БЕЛКОВ</b> .....   | 42 |
| <b>ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ</b> .....  | 44 |
| <b>Работа 11.</b> Гидролиз казеина при участии трипсина .....   | 45 |
| <b>КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ<br/>АЗОТИСТОГО ОБМЕНА</b> .....                                   | 47 |
| <b>Работа 12.</b> Определение общего азота мочи колориметрическим методом ..                              | 48 |
| <b>ГЛАВА 2. ФЕРМЕНТЫ</b> .....  | 52 |
| НОМЕНКЛАТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ .....  | 52 |
| СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ .....  | 54 |
| МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ .....   | 56 |
| <b>Работа 13.</b> Изучение действия ферментов .....   | 58 |
| <i>Действие <math>\alpha</math>-амилазы (КФ 3.2.1.1).</i> .....   | 58 |
| <i>Действие пепсина (КФ 3.4.23.1)</i> .....   | 60 |
| <i>Действие уреазы (КФ 3.5.1.5)</i> .....   | 61 |
| <i>Действие каталазы (КФ 1.11.1.6)</i> .....  | 61 |
| <i>Действие липазы (КФ 3.1.1.3).</i> .....  | 62 |
| <b>Работа 14.</b> Изучение влияния различных факторов на скорость<br>ферментативных реакций. ....         | 63 |
| <i>Влияние температуры на активность амилазы слюны</i> .....  | 63 |
| <i>Влияние pH на активность амилазы</i> .....   | 64 |
| <i>Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы</i> ....                                       | 65 |
| <b>Работа 15.</b> Специфичность действия ферментов .....  | 65 |
| <i>Специфичность действия сахаразы и амилазы</i> .....  | 66 |
| <i>Специфичность действия уреазы</i> .....  | 67 |
| <b>ГЛАВА 3. ВИТАМИНЫ</b> .....  | 71 |
| <b>Работа 16.</b> Качественные реакции на витамины .....  | 74 |
| <i>Реакции на витамин В<sub>1</sub>.</i> .....  | 74 |
| <i>Реакция на витамин В<sub>2</sub></i> .....   | 76 |
| <i>Реакции на витамин РР</i> .....  | 77 |
| <i>Реакции на витамин В<sub>6</sub>.</i> .....  | 79 |
| <i>Реакции на витамин Р</i> .....   | 80 |
| <i>Реакции на витамин С.</i> .....  | 81 |
| <i>Реакции на витамин А</i> .....   | 84 |
| <i>Реакции на витамин D</i> .....   | 85 |
| <i>Реакции на витамин Е</i> .....   | 86 |
| <i>Реакции на витамин К.</i> .....  | 87 |

|   |     |
|---|-----|
| КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ.....   | 88  |
| <b>Работа 17.</b> Определение витамина С в растительном материале .....   | 89  |
| <b>Работа 18.</b> Определение содержания витамина С в моче .....  | 90  |
| <b>Работа 19.</b> Определение витамина Р в чае — черном и зеленом .....   | 91  |
| <b>Работа 20.</b> Количественное определение тиамина (В <sub>1</sub> ) в моче .....   | 91  |
| <b>ГЛАВА 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ</b> .....   | 94  |
| СОСТАВ, СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ. ....   | 94  |
| <b>Работа 21.</b> Выделение рибонуклеопротеинов (РНП) из дрожжей<br>и качественное определение продуктов их гидролиза ..... | 102 |
| ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ .....  | 106 |
| <b>Работа 22.</b> Определение активности рибонуклеазы<br>спектрофотометрическим методом .....                               | 108 |
| <b>Работа 23.</b> Определение содержания мочевой кислоты в моче .....   | 108 |
| <b>ГЛАВА 5. УГЛЕВОДЫ</b> .....  | 111 |
| СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА УГЛЕВОДОВ .....   | 111 |
| <i>МОНОСАХАРИДЫ</i> .....   | 111 |
| <i>ДИСАХАРИДЫ</i> .....   | 114 |
| <i>ПОЛИСАХАРИДЫ.</i> .....  | 116 |
| <b>Работа 24.</b> Качественные реакции на углеводы .....  | 118 |
| <i>Восстанавливающие свойства моносахаридов</i> .....   | 118 |
| <i>Реакция на основе дегидратации моносахаридов</i> .....   | 119 |
| <i>Реакции на дисахариды.</i> .....   | 122 |
| <i>Реакции на полисахариды.</i> .....   | 123 |
| КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ.....   | 125 |
| <b>Работа 25.</b> Определение содержания фруктозы в сыворотке крови<br>фотоколориметрическим методом .....                  | 125 |
| <b>Работа 26.</b> Определение глюкозы энзиматическим методом .....  | 126 |
| ОБМЕН УГЛЕВОДОВ .....   | 128 |
| <b>Работа 27.</b> Качественная проба на молочную кислоту .....  | 129 |
| <b>ГЛАВА 6. ЛИПИДЫ</b> .....  | 132 |
| ПРОСТЫЕ ЛИПИДЫ. ....  | 133 |
| <b>Работа 28.</b> Физико-химические свойства жиров .....  | 134 |
| <b>Работа 29.</b> Количественное определение свободных жирных кислот<br>в сыворотке крови .....                             | 140 |
| СЛОЖНЫЕ ЛИПИДЫ .....  | 142 |
| <b>Работа 30.</b> Выделение лецитина из яичного желтка и изучение<br>его растворимости. ....                                | 144 |
| <b>Работа 31.</b> Гидролиз лецитина и определение продуктов его гидролиза .....   | 145 |

|   |     |
|---|-----|
| ПРОИЗВОДНЫЕ ЛИПИДОВ .....   | 148 |
| <b>Работа 32.</b> Выделение холестерина из мозга и качественные реакции на него .....   | 149 |
| <b>ГЛАВА 7. ГОРМОНЫ</b> .....   | 151 |
| <b>Работа 33.</b> Качественное определение гормонов .....   | 153 |
| <b>Работа 34.</b> Количественное определение адреналина .....   | 158 |
| <b>ГЛАВА 8. ВОДНО-СОЛЕВОЙ ОБМЕН</b> .....   | 161 |
| <b>Работа 35.</b> Качественное определение неорганических соединений костной ткани .....  | 163 |
| <b>Работа 36.</b> Количественное определение кальция в сыворотке крови .....  | 164 |
| <b>Работа 37.</b> Определение хлоридов в крови .....  | 165 |
| <b>ГЛАВА 9. ПИГМЕНТНЫЙ ОБМЕН</b> .....  | 167 |
| <b>Работа 38.</b> Определение содержания билирубина и его фракций в сыворотке крови колориметрическим диазометодом (по Йендрашику — Клеггорну — Грофу)..... | 169 |
| <b>КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЖЕЛЧНЫЕ ПИГМЕНТЫ В МОЧЕ</b> .....  | 171 |
| <b>Работа 39.</b> Обнаружение желчных пигментов в моче с реактивом Фуше ...   | 172 |
| <b>Работа 40.</b> Обнаружение желчных пигментов в моче пробой Гупперт — Сальковского .....  | 172 |
| <b>Работа 41.</b> Обнаружение желчных пигментов в моче по реакции со спиртовым раствором йода (проба Розина).....   | 173 |
| <b>Работа 42.</b> Обнаружение желчных пигментов в моче с концентрированной азотной кислотой (проба Гмелина) .....   | 173 |
| <b>Литература</b> .....   | 175 |

# ГЛАВА 1. БЕЛКИ

Белки — высокомолекулярные азотсодержащие органические соединения, молекулы которых построены из  $\alpha$ , L-аминокислот (простые белки), а так-же содержащие- еще и другие дополнительные компоненты: ионы металлов, неорганические- и органические простетические группы (сложные белки).

Белки как основа всего живого были издавна в центре внимания исследова- телей. Более чем двухсотлетняя история химии белка наполнена непрерывным совершенствованием экспериментальных методов и богата различными теоре- тическими концепциями.

Большой вклад в развитие химии белка внесли многие отечественные ученые-: А. Я. Данилевский, Н. Д. Зелинский, В. С. Садилов, Д. Я. Галмуд, А. С. Спирин- и др., а также зарубежные исследователи: Э. Фишер, Т. Курциус, М. Бергман-, Ф. Шорм, Ф. Сенгер и др.

Химия белка — это особая область, которая соединила в себе идеи и методы биологии, химии, физики, медицины. Белки — материальная основа деятельности- клетки. Функции белков в природе универсальны: *каталитиче- ские, транспортные-, защитные, структурные, сократительные, дыхатель- ные, запасные, регуляторные и др.* Невозможно представить работу генети- ческого аппарата клетки без участия белков, осуществляющих *репликацию, транскрипцию, трансляцию информации.*

Белки составляют основу структуры и функции живых организмов, подсчитано-, что в природе встречается примерно  $10^{10}$ – $10^{12}$  различных белков, обеспечивающих- существование около  $10^6$  живых организмов, от вирусов до человека. Каждый организм характеризуется уникальным набором белков. Фенотипические признаки и многообразие функций обусловлены особенно-стями пространственной- структуры белков, зависящей от последовательности одних и тех же аминокислотных остатков, а также специфичностью объеди-нения белков во многих случаях в виде надмолекулярных и мультимолекуляр-ных структур, в свою очередь определяющих ультраструктуру клеток и их ор-ганелл.

## АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ

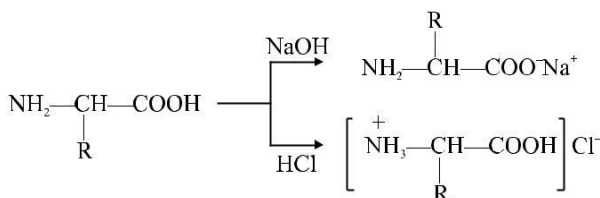
Все многообразие белков построено из  $\alpha$ -аминокислот. Общее число  $\alpha$ -аминокислот, входящих в их состав, близко к 70. Среди них выделяется груп- па из 20 наиболее важных  $\alpha$ -аминокислот, постоянно встречающихся во всех белках. Аминокислоты — кристаллические вещества, растворимые в воде. В твердом состоянии-  $\alpha$ -аминокислоты существуют в виде *биполярного иона*.  $\alpha$ -Аминокислоты — *гетерофункциональные* соединения, содержащие *карбок- сильную группу и аминогруппу-* у одного и того же  $\alpha$ -углеродного атома.

Принцип построения  $\alpha$ -аминокислот, т. е. нахождения у одного и того же атома углерода двух различных функциональных групп, радикала и атома во-

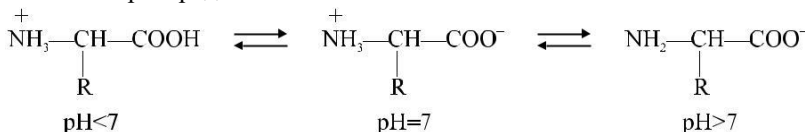
дорода, предопределяет- хиральность (асимметричность)  $\alpha$ -углеродного атома (исключение составляет глицин). Почти все природные  $\alpha$ -аминокислоты принадлежат к L-ряду (расположение аминогруппы в проекционной формуле Фишера слева).

Использование для построения белков живых организмов только энантиомеров L-ряда имеет важнейшее значение для формирования пространственной структуры белков и проявления ими биологической активности.

$\alpha$ -Аминокислоты являются амфотерными соединениями, что обусловлено наличием- в их молекулах функциональных групп кислотного и основного характера. Поэтому-  $\alpha$ -аминокислоты образуют соли как со щелочами, так и с кислотами:



В водном растворе  $\alpha$ -аминокислоты существуют в виде равновесной смеси биполярного иона, катионной и анионной форм молекул. Положение равновесия зависит от pH среды:



Ионное строение придает некоторые особенности  $\alpha$ -аминокислотам: высокую температуру плавления (выше 200 °C), нелетучесть, растворимость в воде, что является важным фактором в обеспечении их биологического функционирования, их всасываемость, транспорт в организме и т. п.

Положение равновесия, т. е. соотношение разных форм  $\alpha$ -аминокислоты в водном растворе при определенных значениях pH, существенно зависит от строения радикала, главным образом от наличия в нем ионогенных групп, играющих роль дополнительных кислотных или основных групп. Общим для всех  $\alpha$ -аминокислот является преобладание катионных форм в сильноокислых (pH 1–2) и анионных — в сильнощелочных (pH 13–14) средах.

Значение pH, при котором концентрация биполярных ионов максимальна, называется изоэлектрической точкой (ИЭТ, pI). Значение pI определяется по уравнению:  $pI = \frac{1}{2} (pK_1 + pK_2)$ . Величина pK (отрицательный десятичный логарифм- константы диссоциации) характеризует кислотные и основные свойства карбоксильной и аминогрупп.



В изоэлектрической точке суммарный заряд ионной формы молекулы  $\alpha$ -аминокислоты равен нулю, биполярные ионы не перемещаются в электрическом поле. При изменениях pH среды ниже, чем pI, катион  $\alpha$ -аминокислоты движется к катоду, при pH выше pI анион  $\alpha$ -аминокислоты движется к аноду.

У нейтральных  $\alpha$ -аминокислот значение pI не равно 7, а лежит несколько ниже (5,5–6,3) вследствие большей способности к диссоциации карбоксильной группы (pI<sub>ала</sub> 6,02, pI<sub>гли</sub> 5,97, pI<sub>фен</sub> 5,48 и т. д.).

Изоэлектрическая точка аминокислот, содержащих дополнительные кислотные или основные группы, зависит от кислотности или основности радикалов-этих аминокислот. У кислых аминокислот, имеющих в радикале дополнительную карбоксильную группу, изоэлектрическая точка вычисляется как среднее арифметическое значение величин pK  $\alpha$ -COOH и COOH-радикала, pI кислых аминокислот находится в сильнокислой среде (pI<sub>асп</sub> 2,74, pI<sub>глю</sub> 3,24). У основных  $\alpha$ -аминокислот, имеющих в радикале дополнительные аминокислотные группы, pI вычисляется из полусуммы значений pK для  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> и NH<sub>2</sub>-группы радикала. Изоэлектрическая точка основных аминокислот находится в области pH выше 7 (pI<sub>гис</sub> 7,59, pI<sub>лиз</sub> 9,82, pI<sub>арг</sub> 10,76).

В организме при физиологических значениях pH 6,9–7,4 преимущественно все  $\alpha$ -аминокислоты (исключение составляет гистидин) находятся в катионной или анионной форме, а не в форме биполярного иона. Гистидин обладает значительными буферными свойствами при физиологическом pH. Содержащийся в эритроцитах гемоглобин характеризуется высоким содержанием остатков гистидина, что придает ему значительную буферную емкость.

На различиях в кислотно-основных свойствах  $\alpha$ -аминокислот, т. е. на различиях в знаке и величине суммарного электрического заряда при данном значении pH, разработаны эффективные и чувствительные методы (электрофорез и ионно-обменная хроматография) идентификации и количественного определения каждой из 20  $\alpha$ -аминокислот.

### **Работа 1. Качественные реакции на аминокислоты и белки**

Особенность химии аминокислот и белков заключается в наличии многочисленных качественных (цветных) реакций, составляющих в свое время химическую основу анализа  $\alpha$ -аминокислот и белков. В настоящее время, когда исследование  $\alpha$ -аминокислот и белков проводится физико-химическими методами, многие качественные реакции сохраняют свое значение и применяются для обнаружения  $\alpha$ -аминокислот, пептидов и белков в электрофорезе и хроматографическом анализе.

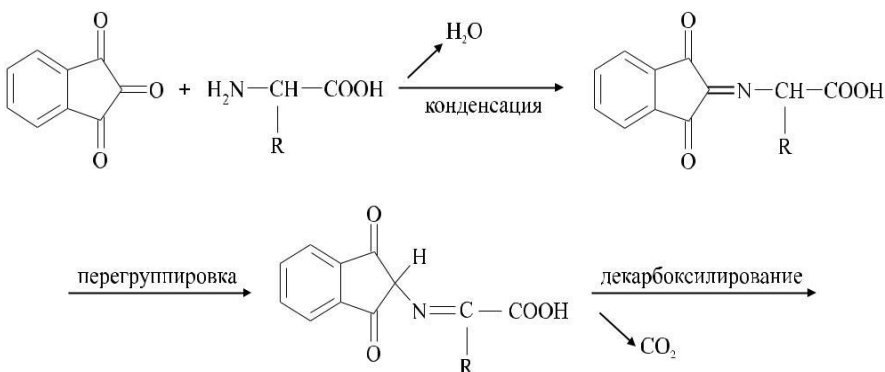
Общая качественная реакция  *$\alpha$ -аминокислот* — это реакция с нингидрином, а для *белков* — биуретовая реакция. Существует также ряд частных реакций, позволяющих обнаружить отдельные  $\alpha$ -аминокислоты или группы родственных  $\alpha$ -аминокислот.

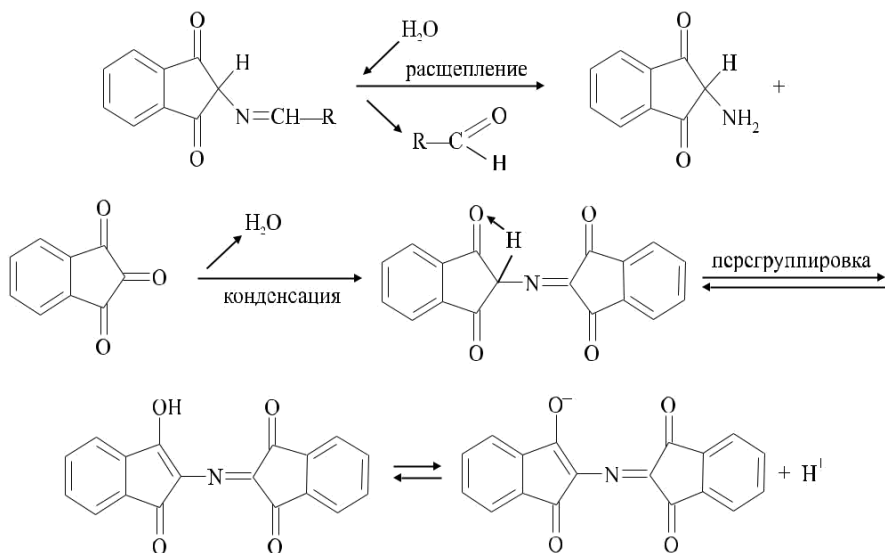
## Реактивы и оборудование:

Гидроксид натрия (10% и 20%); азотная кислота (конц.); серная кислота (конц.); соляная кислота (5%); сульфаниловая кислота (1%); ледяная уксусная кислота; сульфат меди (1%); ацетат свинца (1%); гипобромид натрия (0,2%); нитрит калия (0,5%); карбонат натрия (10%); фенол (0,1%); нингидрин (1% в 95% ацетоне); мочевины (крист.), мочевины (40%);  $\alpha$ -нафтол (0,2% спиртовой раствор); желатин (1%); 0,01% растворы аминокислот: глицина, пролина, тирозина, цистеина, аргинина, гистидина, триптофана. Реактив Миллона: в 60 мл конц.  $\text{HNO}_3$  ( $\rho$  1,40 г/мл) растворяют 40 г ртути при комн. температуре, помещают в теплую водяную баню до прекращения выделения бурых паров и перемешивают. Затем добавляют 120 мл  $\text{H}_2\text{O}$  и полученный раствор разбавляют водой 1:1. Яичный белок: белок от 1 куриного яйца растворяют в 250 мл воды, фильтруют через слой марли и хранят в холодильнике. Штатив, пробирки, мерные пипетки (1 и 5 мл), термостат.

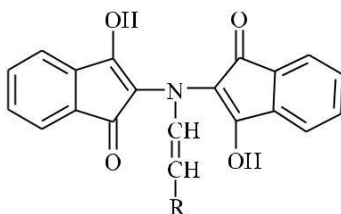
### Нингидриновая реакция

Нингидриновая реакция характерна для *аминогрупп*, находящихся в  $\alpha$ -положении и входящих в состав белков, пептидов и свободных аминокислот.  $\alpha$ -Аминокислоты, пептиды, белки при нагревании с раствором нингидрина дают синее или сине-фиолетовое окрашивание. Нингидриновая реакция со спиртовым или ацетоновым растворами широко используется в электрофорезе, хроматографических методах для открытия отдельных аминокислот и определения их количества. В результате взаимодействия  $\alpha$ -аминокислот с нингидрином образуется *шиффово основание*, которое *перегруппировывается*, *декарбоксилируется* и *расщепляется* на альдегид и *аминодикетогидринден*. Аминодикетогидринден *конденсируется* еще с одной молекулой нингидрина. Образовавшееся соединение, *енолизируясь*, переходит в окрашенную форму, получившую название «*сине-фиолетовый комплекс Руэмана*».

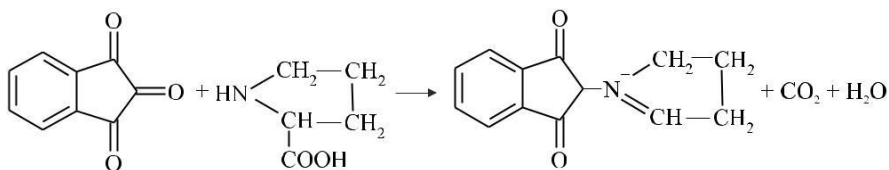




В присутствии органических растворителей (аcetона, этанола), на которых готовят раствор нингидрина, возможно протекание побочной реакции с образованием соединения, содержащего в своем составе радикал аминокислоты.



Наличие радикала аминокислоты в составе этого соединения обуславливает различную окраску соединений (красную, желтую, голубую), возникающих при реакции аминокислот с нингидрином. В реакции глицина с нингидрином образуется соединение, имеющее сине-фиолетовую окраску, а с пролином — желтую.



**Ход работы: А.** В пробирку вносят 1 мл 1% раствора глицина и 5 капель 1% раствора нингидрина в 95% растворе ацетона. Содержимое пробирки тщательно перемешивают и помещают на пять минут в термостат при температуре 70 °С.

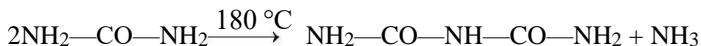
**Б.** В пробирку приливают 3 мл 0,01% раствора пролина и 5 капель 1% раствора нингидрина в ацетоне. Содержимое пробирки перемешивают и нагревают в термостате при температуре 70 °С в течение 5 минут.

**В.** К 1 мл 1% раствора белка добавляют 5 капель 0,5% водного раствора нингидрина, перемешивают и помещают в термостат на 5 минут при температуре 70 °С. В пробирке появляется розово-фиолетовое окрашивание, с течением времени раствор синее.

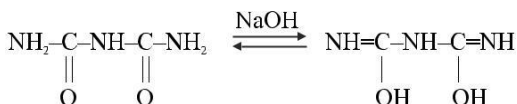
### Биуретовая реакция

В щелочной среде раствор белка при взаимодействии с ионами меди приобретает сине-фиолетовое или красно-фиолетовое окрашивание. Биуретовую реакцию способны давать вещества, которые содержат не менее двух пептидных связей, например три-, тетрапептид и т. д.

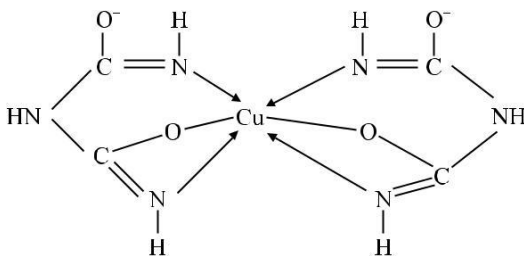
Впервые реакция образования комплексных соединений меди была проведена для биурета, отсюда и название реакции — биуретовая. Биурет образуется при нагревании сухой мочевины:



В щелочной среде биурет переходит в енольную форму:

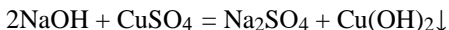


Две молекулы биурета взаимодействуют с гидроксидом меди с образованием биуретового комплекса:

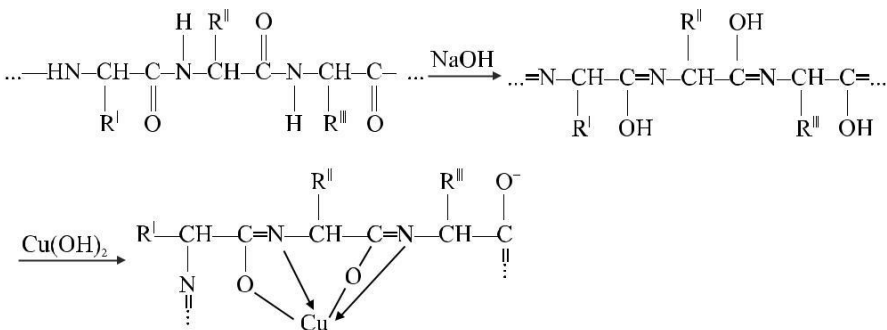


Биуретовая реакция обусловлена образованием *биуретового* комплекса в результате соединения ионов меди с *пептидной* связью белка. Окраска биуретового комплекса зависит от количества ионов меди, от длины полипептидной цепи, концентрации белка и может варьировать от розового до сине-фиолетового цвета.

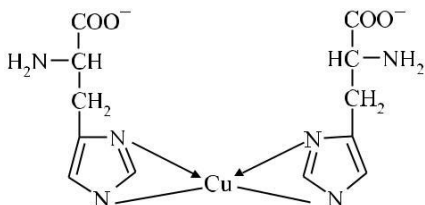
Гидроксид меди (II) для проведения биуретовой реакции получают взаимодействием гидроксида натрия и сульфата меди:



В щелочной среде пептидные связи белка из *кетоформы* переходят в *еноль-ную* форму, которая взаимодействует с гидроксидом меди (II):



Аминокислоты не дают положительную биуретовую реакцию за исключением гистидина, серина, треонина при условии больших концентраций их в растворе:



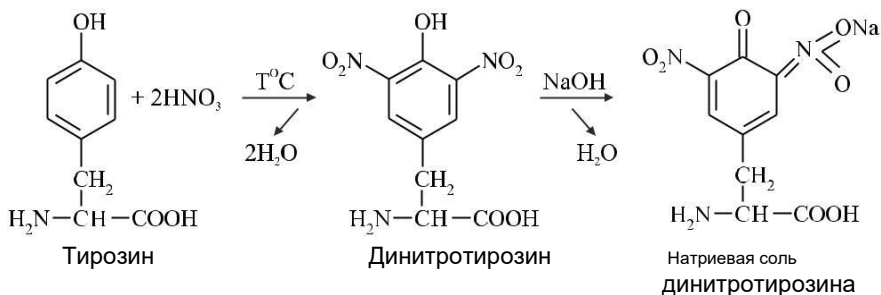
Биуретовый комплекс гистидина

**Ход работы: А.** К 1 мл 1% раствора яичного белка прибавляют 2 мл 10% раствора гидроксида натрия, 2 капли 1% раствора сульфата меди и все перемешивают. Содержимое пробирки приобретает фиолетовое окрашивание. Нельзя добавлять избыток сульфата меди, так как синий осадок гидроксида меди маскирует характерное фиолетовое окрашивание биуретового комплекса белка.

**Б.** Нагревают в пробирке несколько кристаллов мочевины до расплавления. Затем после охлаждения пробирки добавляют 2–4 капли воды и по 1 капле гидроксида натрия и сульфата меди. Содержимое пробирки приобретает розовую окраску.

### Ксантопротеиновая реакция

Реакция получила название *ксантопротеиновой* от греческого *xanthos* — желтый. Реакция обеспечивает появление желтого окрашивания при попадании концентрированной азотной кислоты на кожу, ногти и т. д. Ксантопротеиновая реакция доказывает наличие в белке *ароматических аминокислот*: *фенилаланина, тирозина, триптофана*. Белки: желатин, сальмин, клупеин — дают отрицательную- реакцию на азотную кислоту, что свидетельствует об отсутствии в составе этих белков ароматических аминокислот. Тирозин и триптофан нитруются легко, а фенилаланин — с трудом.

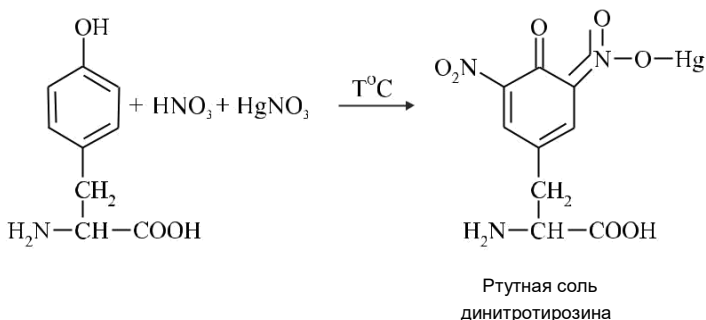


**Ход работы:** Берут три пробирки и наливают: в первую — 1 мл 0,01% раствора тирозина, во вторую — 1% раствора яичного белка, в третью — 1% раствора- желатина. Затем во все пробирки добавляют по 0,5 мл концентрированной азотной кислоты и осторожно нагревают. Наблюдают появление в первой пробирке- желтой окраски, во второй — осадка желтого цвета, в третьей — очень слабое окрашивание, так как желатин почти не содержит ароматических аминокислот-. В щелочной среде нитропроизводные ароматических аминокислот образуют соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет. После охлаждения в первые две пробирки добавляют 10–15 капель 20% раствора щелочи- до появления оранжевого окрашивания.

### Реакция Миллона

Реакция Миллона является качественной на аминокислоту *тирозин*. Следовательно, ее используют для открытия в белках тирозина. При добавлении- к раствору белка реактива Миллона белок выпадает в осадок, который- при нагревании приобретает красный цвет. Реакция доказывает наличие в радикале тирозина фенольного кольца, способного образовывать ртутную соль динитро-тирозина.

К раствору белка не следует добавлять избыток реактива Миллона, так как он содержит азотную кислоту, которая при взаимодействии с белком может дать желтое окрашивание, маскируя реакцию Миллона.



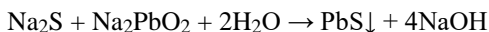
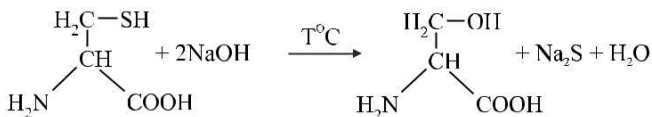
**Ход работы: А.** К 1 мл 0,01% раствора тирозина добавляют 0,5 мл реактива Миллона, тщательно перемешивают. Через 10 минут раствор окрашивается в красный цвет.

**Б.** К 1 мл 1% раствора яичного белка добавляют 0,5 мл реактива Миллона, тщательно перемешивают реакцию смесь. Через 10 минут выпавший белый-осадок осторожно нагревают и наблюдают его окрашивание в красный цвет.

#### Реакция Фоля

Реакция Фоля позволяет открыть в белке или пептиде *цистеин*, содержащий *слабосвязанную сульфгидрильную группу*. Метионин хотя и является серосодержащей- аминокислотой, но в отличие от цистеина этой реакции не дает, так как сера в нем связана прочно.

При кипячении цистеина в щелочной среде сера отщепляется в виде сероводорода-, который в щелочной среде легко образует сульфид натрия. Образование- сульфида натрия можно обнаружить с помощью ионов свинца, образующих с ионами серы нерастворимый сульфид свинца черного цвета. Для выявления сульфида натрия можно использовать ацетат свинца, взаимодействующий с гидроксидом натрия с образованием плумбита натрия, который, реагируя с сульфидом натрия, приводит к образованию сульфида свинца.

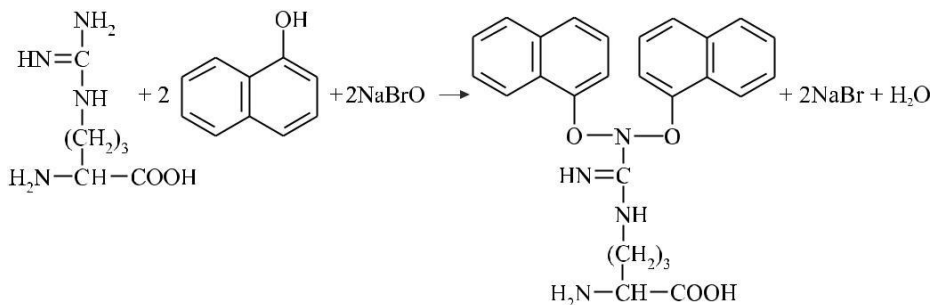


**Ход работы: А.** К 1 мл 0,01% водного раствора цистеина добавляют 2 мл концентрированного раствора гидроксида натрия и 1 мл реактива Фоля (10% раствор ацетата свинца с 10% раствором щелочи). Смесь тщательно перемешивают- и кипятят 2 минуты. Через 5 минут выпадает бурый или черный осадок.

**Б.** К 1 мл 1% раствора яичного белка добавляют 1 мл реактива Фоля, перемешивают и кипятят 2 минуты. После охлаждения наблюдают образование бурого осадка, свидетельствующего о наличии в молекуле белка остатков цистеина.

### Реакция Сакагучи

Качественной реакцией на *аргинин* является реакция Сакагучи. Аргинин, имеющий *гуанидиновую* группировку, в присутствии  $\alpha$ -нафтола окисляется ги-побромидом в щелочной среде с образованием продукта конденсации розово-красного цвета.



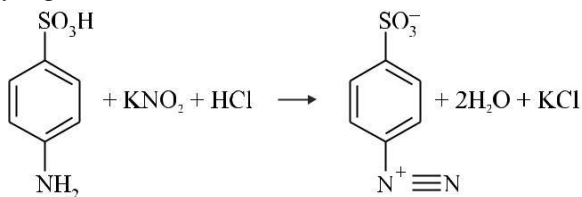
**Ход работы: А.** В пробирку наливают 1 мл 0,01% раствора аргинина, 1 мл 10% раствора гидроксида натрия, 3 капли 0,2% спиртового раствора  $\alpha$ -нафтола, тщательно перемешивают и добавляют 3 капли 0,2% раствора гипобромид натрия-, вновь перемешивают. Для стабилизации быстро развивающегося красного окрашивания немедленно вливают 1 мл 40% раствора мочевины.

**Б.** К 1 мл яичного белка добавляют 1 мл 10% раствора щелочи, 3 капли раствора  $\alpha$ -нафтола, тщательно перемешивают и добавляют 3 капли раствора гипобромид натрия, перемешивают, затем быстро добавляют 1 мл 40% раствора мочевины.

### Реакция Паули

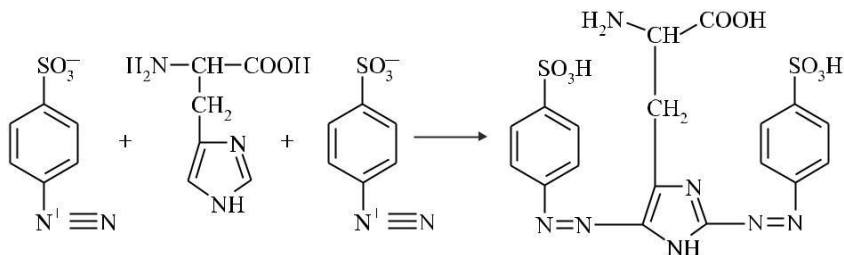
Реакция Паули открывает в белковых растворах и гидролизатах аминокислоты *гистидин* и *тирозин*.

При взаимодействии кислого раствора сульфаниловой кислоты с нитритом калия происходит реакция диазотирования и образуется диазобензолсульфоно-вая кислота.





При реакции диазобензолсульфоновой кислоты с гистидином (или тирозином) образуется комплексное соединение вишнево-красного цвета.

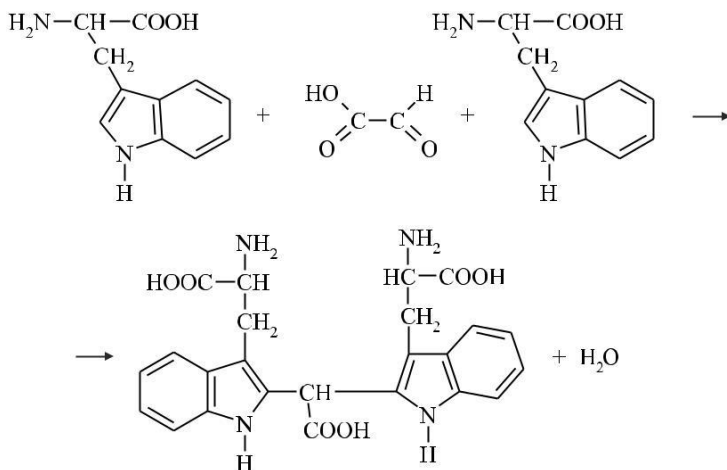


2, 5-бис-4-сульфобензолгистидин

**Ход работы:** В две пробирки наливают по 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты в 5% растворе соляной кислоты и по 2 мл 0,5% раствора нитрита калия и сильно встряхивают пробирки. Затем быстро в первую пробирку наливают 2 мл 0,01% раствора гистидина, во вторую — 2 мл 1% раствора яичного белка, пробирки тщательно перемешивают и добавляют в обе пробирки по 6 мл 10% раствора карбоната натрия. Развивается интенсивная вишнево-красная окраска.

#### Реакция Адамкевича

Реакция Адамкевича является специфической реакцией на *триптофан* и используется для обнаружения его в белках. Триптофан в кислой среде вступает в реакцию с глиоксиловой кислотой (альдегидами), образуя окрашенные в красно-фиолетовый цвет продукты конденсации.



**Ход работы: А.** К 0,5 мл 0,01% раствора триптофана добавляют 0,5 мл ледяной уксусной кислоты, которая содержит небольшое количество глиоксиловой кислоты. Полученную смесь вначале нагревают, а затем охлаждают и осторожно по стенке по каплям, чтобы жидкости не смешивались, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты. Через 10 минут на границе раздела двух слоев наблюдается образование красно-фиолетового кольца.

**Б.** Провести реакцию Адамкевича с 1 мл 1% раствора яичного белка.

Отчет по данной работе рекомендуется выполнить в виде таблицы:

*Таблица 1. Качественные реакции на белки и аминокислоты*

| № п/п | Название реакции | Реактивы | Что открывает | Химизм реакции |
|-------|------------------|----------|---------------|----------------|
|       |                  |          |               |                |

### **Вопросы и задания для самопроверки**

1. Какова химическая природа белка? Назовите структурные единицы белковой молекулы.
2. Напишите структурные формулы протеиногенных аминокислот, имеющих в радикале: а) гетероциклическое кольцо, б) серу, в) гидроксогруппы, г) амидные- группы.
3. Напишите структурные формулы незаменимых аминокислот. Почему они называются незаменимыми?
4. Почему аминокислоты обладают амфотерными свойствами? Приведите уравнения реакций на примере аланина.
5. Чем объяснить основные свойства лизина и кислые аспарагиновой кислоты?
6. В какой области значений рН и почему находится изоэлектрическая точка: а) кислой, б) основной, в) нейтральной аминокислот?
7. Каким образом связаны в молекуле белка аминокислоты? Напишите формулы- ди-, три- и тетрапептидов из следующих аминокислот: а) лизина и глутамина-, б) глицина, глутаминовой кислоты, аланина, в) серина, цистеина, пролина, треонина.
8. Напишите формулы пептидов и осуществите их гидролиз: а) ала-три-гли- арг, б) лиз-вал-иле, в) мет-тир-фен-асп-гли.
9. На чем основаны цветные реакции на белки и каково их практическое значение?
10. Чем объяснить розово-фиолетовое окрашивание щелочного раствора белка в присутствии катионов меди? Напишите уравнение биуретовой реакции с пептидом ала-иле-гли-вал-фен.
11. Какие аминокислоты в белке обуславливают ксантопротеиновую реакцию? Напишите уравнение ксантопротеиновой реакции с одной из них.
12. На чем основана реакция обнаружения серосодержащих аминокислот в белковой- молекуле? Приведите уравнение реакции.

13. Какой качественной реакцией можно определить  $\alpha$ -аминокислотный состав белка? Приведите химизм этого процесса. Почему пролин в отличие от других аминокислот дает желтое окрашивание? Напишите уравнение этой реакции с пролином.
14. Какими реакциями можно открыть в пептиде вал-тир-цис-гис-глу аминокислоты- тирозин и гистидин? Напишите уравнения этих реакций.
15. Какую аминокислоту открывают реакцией Сакагучи? Напишите уравнение реакции.

## Работа 2. Разделение смеси аминокислот методом

### распределительной хроматографии на бумаге

Для определения аминокислот разработано множество методов: *ферментативные, изотопные, электрофоретические, хроматографические*. Аминокислотный анализ существенно способствовал бурному развитию химии белка. Главными областями применения аминокислотного анализа являются установление аминокислотного состава белковых гидролизатов, определение первичной структуры белков, аналитический контроль пептидного синтеза, а также клиническая диагностика. Определение свободных аминокислот важно для изучения обмена белков в организме. В норме в плазме крови содержится около 21,42 ммоль/л аминокислот, с мочой выделяется 0,5 г аминокислот. При нарушении функций отдельных органов или физиологических систем крови, мочи наблюдаются изменения в содержании аминокислот.

Не меньший интерес представляет также изучение аминокислотного состава пищевых белков и белковых смесей, определяющего в значительной мере характер влияния пищи на организм и пищевой ценности белка и белковых смесей.

При *хроматографическом разделении* смесь веществ в подвижной фазе транспортируется через неподвижную фазу. При этом компоненты смеси из-за различий в строении, растворимости, полярности, заряде вступают в специфическое взаимодействие с неподвижной фазой, которое обуславливает различные скорости транспорта компонентов смеси.

В соответствии с агрегатным состоянием подвижной фазы различают *жидкостную и газовую* хроматографии.

В зависимости от типа физико-химического взаимодействия между активным адсорбентом и находящимся в растворе веществом различают три вида хроматографии: *адсорбционную, распределительную, ионную*. *Адсорбционная* хроматография основана на сорбции растворенного вещества поверхностью твердой фазы. В *распределительной* хроматографии вещество распределяется между жидкими фазами, одна из которых неподвижна. *Ионообменная* хроматография основана на образовании ионных соединений между растворенными веществами и заряженными группами сорбента. На практике эти процессы

чаще протекают совместно. По методическим особенностям, по технике выполнения- различают хроматографию: *тонкослойную, бумажную, колоночную*. Различают виды хроматографии и по направлению движения подвижной фазы: *восходящая, нисходящая, радиальная, одномерная, двумерная*.

Бумажная хроматография, впервые примененная в 1944 г. Консденом, Гордоном, Мартином, представляет собой распределительную хроматографию, при которой адсорбционно связанная с целлюлозой вода образует стационарную (неподвижную), а смесь органических растворителей — подвижную фазу. Непрерывная- диффузия растворенных компонентов из одной фазы в другую приводит- к их распределению между фазами. Более гидрофобные аминокислоты лучше растворяются в органических растворителях и движутся с большей скоростью, чем гидрофильные аминокислоты. В результате этого аминокислоты по окончании хроматографического разделения оказываются на разном расстоянии от линии старта. Аминокислоты определяют с помощью нингидрина. Положение- определенных пятен на хроматограмме характеризуется коэффициентом удерживания  $R_f$ :

$$R_f = \frac{l_{\text{аминокислоты}}}{l_{\text{растворителя}}}$$

Существует определенная связь между строением аминокислот и значением  $R_f$ . Аминокислоты с заряженными или полярными радикалами имеют более низкие значения  $R_f$ , с повышением гидрофобности радикала повышается значение  $R_f$ .

### Реактивы и оборудование:

*0,1 М растворы аминокислот; бутанол; ледяная уксусная кислота; 1% нингидрин в 95% ацетоне. Сушильный шкаф, хроматографические камеры (цилиндры-), хроматографическая бумага, стеклянные пластинки, пинцеты, микропипетки-, простые карандаши, линейки, держалки для сушки хроматограмм, ножницы, пульверизаторы.*

**Ход работы:** 1. Вырезают полоску хроматографической бумаги в зависимости от величины хроматографической камеры, в которой проводят хроматографирование-. В качестве хроматографической камеры можно использовать большие- пробирки, цилиндры. Хроматографическую бумагу брать только пинцетом, чтобы не оставлять отпечатки пальцев.

2. На полоске бумаги (3 см × 15 см) наносят простым карандашом линию на расстоянии 3 см от края хроматограммы. Делят линию старта на 4 точки и обозначают цифрами 1, 2, 3, 4. Конец полоски бумаги «заостряют» со стороны линии старта, отрезав кусочек бумаги.

3. Помещают этот край бумаги на две стеклянные пластинки, расположенные параллельно друг другу с зазором 1 см. Бумагу прижимают к нижним пластинкам двумя такими же верхними пластинками.

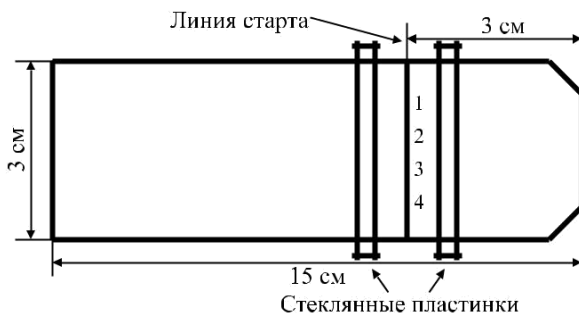


Рис. 1. Схема разметки и расположения хроматографической бумаги

4. Капиллярными пипетками наносят в точки 1, 2, 3 стандартные аминокислоты (например, лизин, аланин и фенилаланин соответственно), в точку 4 смесь этих аминокислот.

Можно использовать следующие сочетания аминокислот (растворы концентрацией- 0,1 М):

- а) лизин, аланин, фенилаланин;
- б) глутаминовая кислота, аланин, лейцин;
- в) цистеин, треонин, метионин.

5. После подсыхания пятен помещают полоску бумаги в хроматографический сосуд. На дно сосуда наливают смесь бутанола, уксусной кислоты и воды (4:1:1). Помещают хроматограмму так, чтобы «заостренный» конец был погружен в растворитель.

6. Сосуд плотно закрывают крышкой и оставляют на 2 часа.

7. Через 2 часа хроматограмму вынимают из сосуда, отмечают границу фронта растворителя, делая небольшие надрезы ножницами слева и справа, и высушивают хроматограмму в вытяжном шкафу.

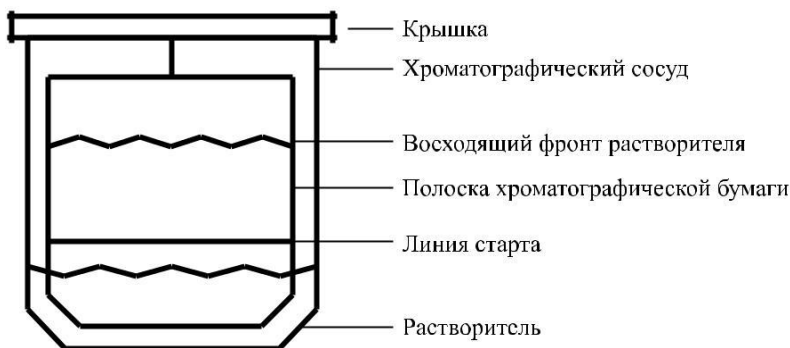


Рис. 2. Установка для бумажной хроматографии

8. На высушенную хроматограмму наносят при помощи пульверизатора 0,5% раствор нингидрина в ацетоне так, чтобы хроматограмма была равномерно смочена раствором, и оставляют на 5 минут в вытяжном шкафу.

9. Помещают хроматограмму в сушильный шкаф при температуре 70 °С на 15 минут.

10. Проводят идентификацию аминокислот по значению  $R_f$ . Для этого измеряют с точностью до миллиметра расстояние, пройденное растворителем от линии- старта до границы фронта растворителя. С такой же точностью измеряют расстояние от точки нанесения каждой аминокислоты до центра цветного пятна, образовавшегося в результате нингидриновой реакции.

$R_f$  — величина постоянная для каждой аминокислоты при одинаковых условиях- опыта: температура, сорт бумаги, растворитель. Сравнивают  $R_f$  известных стандартных аминокислот с  $R_f$  аминокислот исследуемой смеси.

Указания к составлению отчета: приклеить полученную хроматограмму в тетрадь, привести все измерения и вычисления для каждой аминокислоты.

### Вопросы и задания для самопроверки

1. На чем основан метод хроматографического разделения смеси веществ?
2. Какие хроматографические методы применяются в белковой химии для разделения- аминокислот, пептидов, белков?
3. На чем основан метод ионообменной хроматографии, используемой для разделения- смеси аминокислот?
4. Какая из нижеприведенных аминокислот будет сходиться с ионообменной хроматографической колонны первой, если через колонку пропускают бу- фер с а) рН 3, б) рН 7: а) асп и лиз, б) арг и мет, в) глу и вал, г) глу и лей.
5. На каких свойствах аминокислот основана распределительная хроматография? Какие виды распределительной хроматографии чаще всего используют в лабораторной практике?
6. Каков суммарный заряд пептидов: а) гли–ала–асп–про, б) глу–тре–про–вал, в) цис–тре–вал–про–фен, г) вал–арг–лиз–гис в кислой, нейтральной, щелочной средах? Напишите формулы указанных пептидов.
7. В каком направлении (катод, анод) будут перемещаться или оставаться на старте в процессе электрофореза в кислой, нейтральной и щелочной средах следующие пептиды: а) сер–вал–арг, б) лиз–гли–асн, в) гли–лей–три, г) арг–вал–лиз–цис. Напишите формулы указанных пептидов.
8. В какой среде (кислой, нейтральной, щелочной) лежат изоэлектрические точки следующих пептидов: а) глу–вал–ала–цис, б) мет–гли–мет–асн, в) цис–гли–лей–тир, г) арг–глу–фен–тре–три–гис–цис–лиз?
9. Какие аминокислоты (кислые, основные или нейтральные) преобладают в составе пептида, если изоэлектрическая точка его лежит в слабощелочной среде. Приведите формулу такого пептида.

10. Смесь глицина, лизина, глутаминовой кислоты разделяли методом электрофореза на бумаге при pH 6,8. Какая из аминокислот: а) перемещалась к аноду, б) перемещалась к катоду, в) оставалась на старте? Изоэлектрическая точка глицина находится при pH 5,97; лизина — при pH 9,74; глутаминовой кислоты при pH 3,22.
11. Укажите направление движения пептида лиз–гли–глю–арг в процессе электрофореза на бумаге при pH а) 3,0; б) 6,5; в) 10,0.
12. ИЭТ белка равна 6,8. Фракционирование ведется при pH 7,0. Как изменится его электрофоретическая подвижность, если в его молекуле изменить: а) глю на вал, б) лиз на глю, в) ала на асп?
13. В форме каких ионов находится аланин, гистидин, аргинин при значениях pH 7,1 и 7,4, характерных для плазмы крови и межклеточной жидкости, соответственно-, если  $pK_1=2,1$ ;  $pK_2=9,0$ ;  $pK_3(\text{гис})=6,0$ ;  $pK_3(\text{арг})=12,5$ ?

### КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ

Для количественного определения белков применяют физические, химические и биологические методы.

Из физических методов наибольшее распространение получили три: *рефрактометрический* — по показателю преломления белковых растворов, *спектрофотометрический* — по поглощению в ультрафиолетовой области спектра, *полярографический* — по кривым, показывающим зависимость между силой тока и напряжением, приложенным к системе, содержащей белок.

Для экспрессивного установления содержания белка широко используется прямая спектрофотометрия образцов при определенных длинах волн. Наибольшей известностью пользуется метод, основанный на измерении оптической плотности образца при 280 и 260 нм, предложенный Варбургом и Христианом. Однако этим методом можно лишь ориентировочно определить концентрацию белков, потому что они между собой могут сильно отличаться содержанием ароматических аминокислот-, обуславливающих экстинцию при 280 нм.

Химические методы определения белков разнообразны. Наиболее простым химическим методом является количественное определение общего или белкового азота. Умножая величину процентного содержания общего азота на коэффициент 6,25 (среднее содержание азота в белках 16%, отсюда  $100:16=6,25$ ), получают данные о содержании сырого белка. Однако способ условен, так как не дает абсолютных результатов. Самым распространенным химическим методом количественного определения белка является *фотокolorиметрический метод*. Он основан на измерении интенсивности цветных реакций, развивающихся при взаимодействии белков с тем или иным специфическим реагентом. Для определения концентрации белка часто применяют метод Лоури. Однако, несмотря на высокую чувствительность, он имеет определенные недостатки, так как используемый в этом методе реактив Фолина — Чокольтеу дает сильную реакцию и на некоторые другие вещества.

Биологические методы применимы только к белкам, обладающим ферментативной и гормональной активностью. Измеряя степень биологической активности препарата, можно составить представление о содержании в нем белка. Этот метод не дает абсолютных результатов.

### Реактивы и оборудование:

*Смесь спирта и эфира (1:1), сыворотка крови. Рефрактометр, фильтровальная бумага, микропипетки.*

**Ход работы:** Раскрывают камеру, тщательно промывают призмы водой, промокают фильтровальной бумагой, затем протирают призмы смесью спирта и эфира (1:1). На нижнюю призму наносят две капли дистиллированной воды и закрывают камеру. Устанавливают рефрактометр так, чтобы призмы его были ярко освещены. Поворотом призм или окуляра подводят границу темного поля к перекрестку нитей окуляра. Делают отсчет по шкале. При температуре 20 °С отсчет должен быть 1,333 (показатель преломления воды при 20 °С).

После того как прибор установлен по воде, призмы сушат спиртоэфирной смесью. Затем наносят на нижнюю призму каплю сыворотки крови и проводят измерения три раза по методике, описанной выше. Из трех значений показателя преломления сыворотки крови находят среднее арифметическое и, пользуясь таблицей 2, находят процентное содержание белка в сыворотке крови.

*Таблица 2. Зависимость между показателем преломления и концентрацией белка*

| Показатель преломления-сыворотки- крови | Белок в сыворотке крови (%) | Показатель преломления-сыворотки- крови | Белок в сыворотке крови (%) |
|---|-----------------------------|---|-----------------------------|
| 1                                       | 2                           | 3                                       | 4                           |
| 1,33705                                 | 0,63                        | 1,34575                                 | 3,68                        |
| 1,33743                                 | 0,86                        | 1,34612                                 | 5,90                        |
| 1,33781                                 | 1,08                        | 1,34650                                 | 6,12                        |
| 1,33820                                 | 1,30                        | 1,34687                                 | 6,14                        |
| 1,33858                                 | 1,52                        | 1,34724                                 | 6,55                        |
| 1,33896                                 | 1,74                        | 1,34761                                 | 6,77                        |
| 1,33934                                 | 1,96                        | 1,34798                                 | 6,98                        |
| 1,33972                                 | 2,18                        | 1,34836                                 | 7,20                        |
| 1,34000                                 | 2,40                        | 1,34873                                 | 7,42                        |
| 1,34048                                 | 2,62                        | 1,34910                                 | 7,63                        |
| 1,34086                                 | 2,84                        | 1,34947                                 | 7,85                        |
| 1,34124                                 | 3,06                        | 1,34984                                 | 8,06                        |
| 1,34162                                 | 3,28                        | 1,35021                                 | 8,28                        |
| 1,34199                                 | 3,50                        | 1,35058                                 | 8,49                        |
| 1,34237                                 | 3,72                        | 1,35095                                 | 8,71                        |



| Показатель преломления-<br>сыворотки- крови | Белок в сыворотке<br>крови (%) | Показатель преломления-<br>сыворотки- крови | Белок в сыворотке<br>крови (%) |
|---|--------------------------------|---|--------------------------------|
| 1   | 2                              | 3   | 4                              |
| 1,34275                                     | 3,94                           | 1,35132                                     | 8,92                           |
| 1,34313                                     | 4 16                           | 1,35169                                     | 9,14                           |
| 1,34350                                     | 4,38                           | 1,35205                                     | 9,35                           |
| 1,34388                                     | 4,60                           | 1,35242                                     | 9,57                           |
| 1,34426                                     | 4,81                           | 1,35279                                     | 9,78                           |
| 1,34463                                     | 5,03                           | 1,35316                                     | 9,99                           |
| 1,34500                                     | 5,25                           | 1,35352                                     | 10,20                          |
| 1,34537                                     | 5,47                           | 1,35388                                     | 10,41                          |

Чувствительность метода невелика (0,5–1%). Ошибка метода в пределах 10%.

### **Работа 3. Количественное определение общего белка сыворотки крови по биуретовой реакции**

Белки сыворотки крови при взаимодействии с серноокислой медью в щелочной среде образуют за счет своих пептидных связей комплексные соединения с ионами меди фиолетового цвета. Интенсивность окрашивания раствора находится в прямой зависимости от концентрации в нем белка.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Сыворотка крови; биуретовый реактив, рабочий раствор, приготовленный из основного раствора; хлористый натрий, 0,9% раствор, стандартный раствор альбумина (из человеческой или бычьей сыворотки), 10% в 0,9% растворе хлористого натрия. 1 мл раствора содержит 0,1 г белка. Микропипетки, пипетки емкостью 1 мл с делениями и 5 мл, фотозлектроколориметр, штатив с пробирками.*

**Ход работы:** К 0,1 мл сыворотки крови прибавляют 5,0 мл рабочего раствора биуретового реактива, смешивают, избегая образования пены. Через 30 минут (и не позднее, чем через час) измеряют оптическую плотность раствора на ФЭКе в кювете с толщиной слоя 1 см при длине волн 540–560 нм (зеленый светофильтр) против контроля. Одновременно ставят контроль. К 0,1 мл 0,9% раствора хлористого натрия прибавляют 5 мл рабочего биуретового реактива. Далее обрабатывают как опыт. Контроль производят в двух пробирках. Перед фотометрированием жидкость из обеих пробирок смешивают и разливают на две кюветы. Расчет ведут по калибровочному графику. Для его построения из стандартного 10% раствора альбумина готовят рабочие стандартные растворы, как указано в таблице 3.

Таблица 3. Состав смесей для построения калибровочного графика

| №№ п/п | Стандартный раствор белка (мл) | 0,9 % раствор хлористого натрия (мл) | Содержание белка в пробе (г) | Концентрация белка (%) |
|--------|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|------------------------|
| 1      | 0,4                            | 0,6                                  | 0,04                         | 4                      |
| 2      | 0,6                            | 0,4                                  | 0,06                         | 6                      |
| 3      | 0,8                            | 0,2                                  | 0,08                         | 8                      |
| 4      | 1,0                            | —                                    | 0,10                         | 10                     |

Из каждого разведения берут по 0,1 мл рабочего раствора и прибавляют по 5 мл рабочего биуретового реактива; через 30–60 минут измеряют оптическую плотность на ФЭКе, как в опыте, против контроля. По полученным данным строят калибровочный график. Норма — 6,5–8,5 % белка.

*Примечание.* Содержание белка в стандартном растворе должно быть не меньше 7 %. При содержании белка в сыворотке больше 10 % сыворотку разводят физиологическим раствором, а результаты умножают на коэффициент разведения.

### ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКА

Наиболее характерными физико-химическими свойствами белков являются высокая вязкость растворов, незначительная диффузия, способность к набуханию в больших пределах, оптическая активность, подвижность в электрическом поле, способность к поглощению УФ-лучей при 280 нм (обусловленное наличием- в белках ароматических аминокислот).

Белки — высокомолекулярные соединения, молекулярная масса которых колеблется- от 6 000 до 1 000 000 Дальтон и выше.

Современные методы исследования позволили установить существование в природе *глобулярных* (шарообразных) и *фибриллярных* (нитевидных) белков. Благодаря применению методов сканирующей микроскопии и рентгеноструктурного анализа высокого разрешения (0,2–0,3 нм) удалось расшифровать не только полную пространственную структуру, соответственно форму, но и степень асимметричности белковых молекул. Оказалось, что даже глобулярные белки крови (гемоглобин, альбумины, глобулины) являются асимметричными.

Физико-химические свойства белков зависят главным образом от свойств радикалов аминокислот, входящих в его состав, а также от количества свободных функциональных групп. Белки являются *амфотерными* электролитами, так как в их молекуле присутствуют как кислые, так и основные группы. Кислотноосновные- свойства белков определяются главным образом боковыми радикалами- аминокислот, способными к ионизации. Вклад концевых аминио- и карбоксильных- групп крайне незначителен. Величины рК боковых радикалов аминокислот- в составе белков несколько отличаются от таковых в свободных аминокислотах, поскольку степень ионизации групп в белках зависит

от природы соседних- боковых радикалов, т.е. от электростатического окружения. Присутствие диссоциирующих группировок в белках обуславливает определенный суммарный заряд молекулы, зависящий от рН среды. Большинство природных белков относится к *кислым* благодаря значительному содержанию дикарбоновых кислот- и поэтому при рН, близких к нейтральным, имеют отрицательный заряд (как и цитоплазма).

Для каждого белка существует такое значение активной реакции среды, при котором положительные и отрицательные заряды в молекуле скомпенсированы. *Значение рН, при котором белок не несет суммарного заряда и не движется в электрическом поле, называют изоэлектрической точкой (ИЭТ) и обозначают как pI.* Величины ИЭТ определяют при кислотно-основном титровании белкового раствора, а также при изоэлектрофокусировании белка. Для большинства глобулярных белков ИЭТ лежат в кислой области (4,5–6,5). Однако есть и исключения, например, пепсин имеет pI около 1, лизоцим — pI около 11.

Поскольку в ИЭТ молекула белка не имеет суммарного заряда и между соседними- молекулами отсутствует электростатическое отталкивание, белки легко- осаждаются из растворов при рН, равном их pI.

Изоэлектрическую точку белка следует отличать от *изоионной точки*, так как эти величины не всегда совпадают. *Изоионной точкой белка* называют то значение рН, при котором число протонов, связанных с основными группами, равно числу протонов, отданных диссоциированными кислотными группами в белковой молекуле. Таким образом, *изоионной точке соответствует значение рН, при котором суммарный заряд белковой молекулы равен нулю в условиях полного отсутствия электролитов в растворе.*

Подавляющее большинство белков — *гидрофильные* вещества, хорошо растворяющиеся- в водных растворах. *Растворимость* белков определяется природой тех групп, которые оказываются на поверхности молекулы при ее пространственной укладке в нативную конформацию. Большая часть поверхности белковой молекулы образована *гидрофильными* группами (—COOH, —OH, —CONH<sub>2</sub>, —NH<sub>2</sub>). Растворимость белков в воде возрастает при добавлении небольших концентраций нейтральных солей. Нейтральные соли в малых концентрациях увеличивают степень диссоциации- ионизированных групп белка, экранируют заряженные группы белковых молекул и тем самым уменьшают белок-белковое взаимодействие. Высокие концентрации нейтральных солей осаждают (высаливают) белки из водных растворов, наиболее- активно это происходит в ИЭТ белка. Растворимость белка также зависит от рН растворителя, его состава, температуры.

В растворах белки проявляют *коллоидные* свойства: они медленно диффундируют, не проходят через полупроницаемую мембрану, рассеивают свет, характеризуются высокой вязкостью. Однако следует иметь в виду,

что белковые растворы не являются типичными коллоидными растворами, т. к. белки диспергированы до единичных молекул и образуют гомогенный раствор. Растворы белков, как и типичные коллоидные растворы, могут при определенных условиях терять свою текучесть и образовывать гели. Полагают, что в ряде растительных и животных тканей белки находятся в виде гелей (в протоплазме клеток, хрусталике глаза, соединительных тканях и др.). При подготовке растений к зиме происходит переход части белков из растворенного состояния в гелеобразное.

Благодаря гидрофильным и гидрофобным группировкам белки могут влиять на растворимость других веществ, выступая в роли *эмульгаторов*. В организме человека в эмульгированном состоянии находятся жиры в крови и лимфе. Белок образует на поверхности капелек жира тонкую пленку, которая притягивает воду и препятствует слипанию жировых частичек.

Характерным свойством белков является их способность к *денатурации*. Под денатурацией белка понимают любые вызванные физическими и химическими воздействиями изменения, которые при сохранении первичной структуры сопровождаются большей или меньшей потерей его биологической активности и других индивидуальных свойств белков. Таким образом, под денатурацией следует понимать нарушение уникальной структуры нативной молекулы белка, вызванной ослаблением гидрофобных взаимодействий, разрывом водородных связей, а в присутствии восстановителей и разрушением дисульфидных связей. Внешние проявления денатурации сводятся к потере растворимости особенно в изoeлектрической точке, повышению вязкости белковых растворов, увеличению количества свободных функциональных HS-групп и изменению характера рассеивания рентгеновских лучей. Наиболее характерным признаком денатурации является резкое снижение или полная потеря его биологической активности (каталитической, гормональной, защитной и других). Физически денатурация может быть вызвана механическими (сильное перемешивание, встряхивание) или физическими воздействиями (нагревание, ультрафиолетовое, рентгеновское, радиоактивное облучение, обработка ультразвуком и абсорбция на границе раздела). Химическая денатурация достигается прежде всего с помощью соединений, разрывающих водородные связи (6–8 М раствор мочевины, 4 М раствор гидрохлорида гуанидина), обработкой кислотами и щелочами ( $3 < \text{pH} < 9$ ), а также воздействием поверхностно-активных веществ, например 1% раствором додецилсульфата натрия. Чувствительность отдельных белков к денатурирующим средствам различна.

Денатурация с разрывом нековалентных связей обычно обратима. Путем образования новых связей, а также благодаря взаимодействию с денатурирующим веществом новая конформация стабилизируется. Возникающее метастабильное состояние при восстановлении физиологических условий может вернуться к нативной конформации, т. е. происходит *ренатурация*. Способность

к ренатурации экспериментально- была доказана для трипсина, панкреатической рибонуклеазы и др.

### **Реактивы и оборудование:**

*Сульфат аммония (кристаллический и насыщенный раствор); уксусная кислота (1% и 10%); гидроксид натрия (10%); концентрированные кислоты: азотная, серная, соляная, уксусная; трихлоруксусная кислота (5%); сульфосалициловая кислота (20%); сульфат меди (1%); ацетат свинца (1%); нитрат серебра (1%); пикриновая кислота (насыщенный раствор); таннин (10%); соляная кислота (5%); 0,2 М уксусная кислота; 0,2 М ацетат натрия; этиловый спирт; ацетон; гексацаноферрат (III) калия (5%); казеин (1%); яичный белок (1%); солевая вытяжка белка: 10 г измельченной мышечной ткани настаивают при помешивании в ступке в течение 10–15 минут с 40–50 мл 10% раствора хлорида натрия. Образовавшуюся однородную массу фильтруют через двойной слой марли. Первые мутные капли фильтрата сливают на фильтр и повторно фильтруют. Фильтрация идет медленно. Получают около 15–20 мл прозрачного опалесцирующего розово-красного раствора. В полученной солевой вытяжке белка содержатся глобулины и альбумины.*

*Штатив с набором пробирок, стеклянные воронки, стеклянные палочки, фильтры бумажные, пипетки на 1 и 2 мл, спиртовки, целлофановые мешочки: вырезают из целлофана круг диаметром 9–12 см. Складывают его в форме мешочка, вставляют в отверстие стеклянную трубку, длиной 5–6 см и диаметром- 0,5–0,8 см, так, чтобы верхний конец трубки выступал из мешочка на 2–3 см, а нижний был погружен внутрь на одну треть мешочка. Мешочек туго завязывают на трубке шнурком. До работы диализный мешочек следует сохранять наполненным водой и погруженным в воду. Перед работой воду выливают и с помощью воронки с оттянутым концом вливают в мешочек солевой раствор- белка (не более половины объема мешочка); диализатор (или стеклянный стакан на 0,5 л).*

### **Работа 4. Диализ солевого раствора белка**

Метод диализа основан на способности низкомолекулярных веществ диффузно- проникать через полупроницаемые мембраны, а макромолекул — не проникать-. Белки, являясь высокомолекулярными коллоидными веществами, не диффундируют через полупроницаемые мембраны (например, коллоидную или целлофановую пленки). Это свойство белков лежит в основе очистки их от низкомолекулярных- примесей.

**Ход работы:** Вначале с помощью биуретовой реакции (см. работу 1) определяют, содержит ли исследуемый раствор белок.

Целлофановый мешочек наполняют на одну треть объема 1% раствором исследуемого- белка. Мешочек помещают в диализатор, заполненный дистиллированной водой, зажимая у верхнего края двумя стеклянными палочками,

которые- скреплены резиновыми колечками. Через 48 часов с диализатом (наружная жидкость) и используемой для диализа дистиллированной водой проводят реакцию- на обнаружение хлоридов. Готовят две пробирки, в одну из них наливают 1 мл диализата, в другую — 1 мл дистиллированной воды, затем по 1 капле 10% раствора азотной кислоты и 1% раствора нитрата серебра. В пробирке, содержащей- диализат, выпадает белый осадок, а в пробирке с дистиллированной водой осадка нет. Делают вывод о том, что при диализе солевого раствора белка хлориды- проникли в диализат через полупроницаемую мембрану.

Для проверки содержания белка в одну пробирку наливают 3 мл диализата, в другую — 3 мл диализируемой жидкости, затем в обе пробирки добавляют по 1 мл 10% раствора гидроксида натрия и по 1–2 капли 1% раствора сульфо-та меди (проводят биуретовую реакцию). По изменению окраски в пробирке с диализируемой- жидкостью делают вывод о том, что белок не проникает через полупроницаемую- мембрану.

### Работа 5. Определение изоэлектрической точки казеина

Определение изоэлектрической точки белков основано на их способности под действием осадителей, вызывающих дегидратацию белков, при значении рН среды, соответствующих их рI, легко осажаться. В отличие от других белков-, казеин осаждается в изоэлектрической точке без дегидратирующих средств. Изоэлектрическая точка казеина соответствует рН 4,7.

**Ход работы:** В шести пронумерованных пробирках готовят буферные растворы с разными значениями рН, используя данные таблицы 4.

*Таблица 4. Соотношение компонентов реакционной смеси (мл) для приготовления- буферных систем для определения ИЭТ казеина*

| № пробирок | Состав буферной смеси       |                              | рН ацетатной буферной- смеси | Степень помутнения- раствора казеина |
|------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
|            | CH <sub>3</sub> COOH, 0,2 М | CH <sub>3</sub> COONa, 0,2 М |                              |                                      |
| 1          | 1,9                         | 0,1                          | 3,4                          |                                      |
| 2          | 1,8                         | 0,2                          | 3,8                          |                                      |
| 3          | 1,4                         | 0,6                          | 4,4                          |                                      |
| 4          | 1,0                         | 1,0                          | 4,7                          |                                      |
| 5          | 0,6                         | 1,4                          | 5,1                          |                                      |
| 6          | 0,2                         | 1,8                          | 5,7                          |                                      |

Содержимое пробирок взбалтывают и в каждую добавляют по 1,0 мл 1% раствора казеина. После этого содержимое пробирок снова встряхивают и оставляют на несколько минут, затем по максимальной степени помутнения определяют- изоэлектрическую точку казеина.

## **Работа 6. Разделение альбуминов и глобулинов яичного белка методом высаливания**

Высаливание — обратимая реакция осаждения белков из растворов с помощью больших концентраций нейтральных солей ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и др.). При высаливании происходит дегидратация макромолекул белка и устранение заряда. На процесс высаливания влияет ряд факторов, таких как гидрофильность белка, его относительная молекулярная масса, заряд. Вследствие этого для высаливания различных белков требуется разная концентрация одних и тех же солей.

Глобулины осаждаются в полунасыщенном растворе сульфата аммония, а альбумины — в насыщенном растворе сульфата аммония.

**Ход работы:** К 1–2 мл яичного белка приливают равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и перемешивают. Получается полунасыщенный раствор сульфата аммония, в котором выпадает осадок глобулина. Через 5 минут осадок отфильтровывают. В фильтрате остается другой белок — яичный альбумин. Для высаливания альбумина к фильтрату добавляют кристаллический сульфат аммония до полного насыщения, т. е. пока новая порция соли остается нерастворенной. Выпавший осадок альбумина отфильтровывают.

## **Работа 7. Осаждение белков**

Белок, находящийся в растворе, способен при определенных условиях выпадать в осадок. Это его свойство используется для обнаружения белка в исследуемом материале и для выделения его в чистом виде. Методы осаждения можно разделить на обратимые (высаливание нейтральными солями, действие спиртов) и необратимые, которые приводят к разрушению нативной конформации белка, т. е. денатурации.

### *Осаждение белков при нагревании*

Выпадение белков в осадок при нагревании характерно почти для всех белков (исключение составляет желатин). Особенно легко и более полно происходит осаждение белка в слабокислой среде, вблизи от ИЭТ. В нейтральной и сильнокислой среде осаждение белков идет значительно хуже, а в щелочной среде вовсе не наблюдается. Тепловая денатурация в начальной стадии ведет к региоселективным изменениям конформации, которые могут быть обратимыми. На последующей стадии неконтролируемая агрегация ведет к образованию неупорядоченного клубка.

**Ход работы:** В пять пронумерованных пробирок наливают по 2 мл 1% раствора яичного белка. Первую пробирку нагревают до кипения. Наблюдают образование осадка.

Во вторую пробирку добавляют 0,1 мл 1% раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Выпадает хлопьевидный осадок. Осаждение идет полнее

и быстрее, чем в первом случае, вследствие того, что частицы белка теряют заряд, потому что рН раствора приближается к изоэлектрическому состоянию.

В третью пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора уксусной кислоты и нагревают до кипения. Осадок не образуется даже при кипячении, т. к. молекулы белка приобретают положительный заряд, что повышает их устойчивость.

В четвертую пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора уксусной кислоты. 0,5 мл насыщенного раствора хлорида натрия и нагревают. Наблюдают появление осадка. Его образование обусловлено тем, что белок при взаимодействии с ионами хлорида натрия теряет свой заряд.

В пятую пробирку добавляют 0,5 мл 10% раствора гидроксида натрия. При кипячении осадок не образуется, т. к. в щелочной среде увеличивается отрицательный заряд белка.

#### *Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами*

Многие белки денатурируют при сильном подкислении (рН 2–3). В этих условиях практически все диссоциирующие группы белка имеют одноименный заряд. Взаимное отталкивание одноименных зарядов вызывает разрыв слабых связей, в результате чего нарушается нативная конформация. Минеральные кислоты вызывают дегидратацию белковых молекул, а также способны к образованию комплексных солей.

Однако необходимо учитывать, что некоторые белки достаточно устойчивы в сильно кислой среде. Например, при рН 2 стабильны гистоны, протамины, лизоцим, а у пепсина при рН 1,5–2,2 активность максимальна.

**Ход работы:** В три сухие пробирки наливают по 1 мл концентрированных азотной, серной, соляной кислот. Затем, наклонив каждую пробирку, осторожно по стенке пробирки прикапывают по 0,5 мл раствора белка. На границе раздела двух жидкостей образуется осадок в виде кольца. Содержимое пробирок перемешивают, в пробирках с соляной и серной кислотами осадки растворяются, в пробирке с азотной кислотой осадок не исчезает.

#### *Осаждение белков органическими кислотами*

Органические кислоты, такие как трихлоруксусная, сульфосалициловая, вызывают дегидратацию и денатурацию белковых молекул. Для этих кислот характерен сложный механизм денатурации, включающий как непосредственное воздействие на водородные связи, так и блокирование полярных группировок. Сульфосалициловая и трихлоруксусная кислоты являются чувствительными и специфическими реактивами на белок, трихлоруксусную кислоту используют для полного осаждения белков из биологических жидкостей, например сыворотки крови.



**Ход работы:** В две пробирки наливают по 2 мл раствора белка и добавляют в первую — 0,5 мл 5% раствора трихлоруксусной кислоты, во вторую — 0,5 мл 20% раствора сульфосалициловой кислоты. В обоих случаях наблюдают выпадение осадка белка.

#### *Осаждение белков алкалоидными реактивами*

Механизм осаждения белков алкалоидными реактивами (таннином, пикриновой, гексациановой, фосфорно-вольфрамовой, фосфорно-молибденовой кислотами и их солями) обусловлен образованием нерастворимых соединений этих реактивов с аминогруппами белка. В таких соединениях алкалоидные реактивы являются анионами, а белки — катионами. Для придания молекуле белка положительного заряда раствор белка подкисляют. В результате этого положительно-заряженные частицы белка легко взаимодействуют с отрицательно-заряженными молекулами осадителя. Гистоны, протамины легко осаждаются алкалоидными реактивами без подкисления.

**Ход работы:** В три пробирки приливают по 1 мл яичного белка, по 0,5 мл раствора уксусной кислоты и по 2–3 капли: в первую — 10% раствора пикриновой кислоты, во вторую — насыщенного раствора таннина, в третью — 1% раствора гексациано-(III)-феррата калия. Наблюдают выпадение осадка. При добавлении избытка раствора таннина и гексациано-(III)-феррата калия осадки растворяются.

#### *Осаждение белков солями тяжелых металлов*

Соли тяжелых металлов (меди, ртути, цинка, серебра, свинца) осаждают белки в результате образования комплексных соединений. Осадок денатурированного белка в избытке солей некоторых тяжелых металлов (ацетата свинца, сульфата меди) растворяется. Это связано с тем, что избыток ионов этих металлов, адсорбируясь на поверхности белковых частиц, вызывает перезарядку белкового комплекса, в результате чего он переходит в раствор. Этот процесс называется адсорбционной пептизацией. Способность белка прочно связывать ионы тяжелых металлов в виде нерастворимых в воде осадков используется как противоядие при отравлениях солями ртути, меди, свинца и др. Сразу после отравления следует принимать молоко или яйца, пока еще эти соли находятся в желудке и не успели всосаться. Вслед за этим необходимо вызвать рвоту, чтобы удалить яд из организма.

**Ход работы:** В три пробирки наливают по 1 мл яичного белка и добавляют по 1–2 капли: в первую — 1% раствора сульфата меди, во вторую — 1% раствора ацетата свинца, в третью — 1% раствора нитрата серебра. Во всех пробирках образуются осадки, нерастворимые в воде. Затем добавляют в пробирки соответственно по 5–10 капель растворов сульфата меди, ацетата свинца, нитрата серебра. В первых двух пробирках наблюдают растворение осадков. В третьей пробирке в избытке нитрата серебра растворение осадка не происходит.

### *Осаждение белков органическими растворителями*

Органические растворители осаждают белки из водных растворов вследствие дегидратации белковых молекул.

**Ход работы:** В две пробирки наливают по 1–2 мл раствора яичного белка и добавляют в первую — 1–2 мл этилового спирта, во вторую — ацетона. Растворы в обеих пробирках становятся мутными. Затем в обе пробирки добавляют по 1 мл насыщенного раствора хлорида натрия, через некоторое время наблюдают выпадение осадка белка.

#### **Вопросы и задания для самопроверки**

---

1. Какие факторы влияют на растворимость белков и их стабильность в растворе?
2. Почему при нагревании в слабокислой или слабощелочной среде белок легко- выпадает в осадок?
3. На каких свойствах белка основаны реакции осаждения и каково их практическое применение?
4. При добавлении к водному раствору белков нейтральных солей в высоких концентрациях белок выпадает в осадок. Как называется это явление? Почему- добавление солей в высоких концентрациях приводит к понижению растворимости- белка?
5. Дайте определение изоэлектрической точке белка и изоэлектрическому состоянию его.
6. Какие аминокислоты преобладают в составе белка, если ИЭТ лежит в пределах: а) рН 3, б) рН 10? Приведите примеры белков кислого и основного характера.
7. В какой среде (кислая, щелочная, нейтральная) находится ИЭТ следующих пептидов: а) глу–сер–фен–три–асп–цис–про–вал, б) мет–гис–тир–тре– арг–лиз–ала, в) иле–про–лей–мет–вал–фен–мет–тир.
8. Пепсин желудочного сока имеет изоэлектрическую точку около рН 1. Какие функциональные группы должны присутствовать в пепсине в относительно больших количествах?
9. Какие аминокислоты должны присутствовать в гистонах, если изоэлектрическая точка их около рН 10,8?
10. Какие свойства характерны для нативных белков?
11. Что такое денатурация белков и какими факторами можно ее вызвать? Какие свойства характерны для денатурированных белков?
12. Почему глобулярные белки, в которых содержится много остатков цистина, денатурируют при более высоких температурах и длительном нагревании. Приведите примеры таких белков.
13. Что такое ренатурация? В каких условиях проводят ренатурацию?
14. Какой процесс носит название адсорбционной пептизации?
15. На чем основан метод диализа? С какой целью применяют диализ в белковой химии?

## КЛАССИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

Из огромного количества природных белков структура и функции расшифрованы для относительно небольшого числа, следовательно, не представляется возможным систематически классифицировать белки по структурно-функциональным параметрам. В белковой химии используются различные принципы классификации, часто перекрещивающиеся и во многих отношениях несовершенные.

Взяв за основу происхождение организма, различают растительные, животные, вирусные, бактериальные белки. По месту локализации белков в органах, тканях, клеточных органеллах различают белки плазмы, мышечные белки, белки молока, яиц, рибосомальные белки, ядерные белки, белки мембран и т. д.

Характеризуя белки по химическому составу, их делят на две большие группы: простые и сложные. Простые белки (однокомпонентные) построены из аминокислот-, сложные белки (двухкомпонентные) состоят из простого белка и небелкового компонента, называемого простетической группой.

Простые белки в свою очередь делят на основании некоторых критериев, например растворимости в воде, водно-солевых, спиртовых растворах, на ряд подгрупп: альбумины, глобулины, проламины; по аминокислотному составу — протамины (содержат до 80–90% аргинина), гистоны (содержат не менее 30% аргинина, лизина, гистидина), проламины (содержат 20–50% глутаминовой кислоты- и 10–15% пролина).

Классификация сложных белков основана на химической природе входящего в их состав небелкового компонента: фосфопротеины (содержат фосфорную кислоту), хромопротеины (содержат различные пигменты), нуклеопротеины (содержат нуклеиновые кислоты), гликопротеины (содержат углеводы), липопротеины (содержат липиды), металлопротеины (содержат металлы). Приведенная классификация крайне несовершенна. Тонкие методы анализа белков, интенсивно проводящиеся в последние годы, позволяют обнаружить в составе простых белков незначительные, но стабильные соединения, не являющиеся аминокислотами. Например, яичный альбумин, долгое время считавшийся простым белком, содержит около 2% маннозы.

По форме белковой молекулы выделяют два класса: фибриллярные и глобулярные белки. Молекула фибриллярного белка имеет вытянутую форму, обладает волокнистой структурой. Часто молекулы фибриллярных белков имеют очень большой размер, состоят из двух и более полипептидных цепей и образуют структурные элементы соединительной ткани. Фибриллярные белки нерастворимы в воде. Важнейшими представителями фибриллярных белков являются коллагены, кератины, эластины, фиброины и др.

Глобулярные белки обладают гораздо более компактной структурой, вследствие высокоупорядоченного способа, которым пептидная цепь сложена, изогнута, скручена. Такие молекулы по форме представляют собой почти пра-

вильную сферу либо эллипсоид. Глобулярные белки растворимы в воде. Хорошая растворимость их объясняется локализацией на поверхности глобулы заряженных аминокислотных остатков, которые, окружая себя гидратной оболочкой, обеспечивают хороший контакт с растворителем. Среди глобулярных белков наблюдается гораздо большее разнообразие, они выполняют каталитические, защитные, регуляторные, гормональные, транспортные, дыхательные и другие функции.

В последние годы, на основе достижений биохимии и биофизики белков, предприняты попытки классификации белков в соответствии с особенностями их структурной организации. Согласно этой классификации глобулярные белки делят на четыре подкласса:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\alpha+\beta$ -,  $\alpha/\beta$ -белки. К  $\alpha$ -белкам относятся глобулярные белки, содержащие  $\alpha$ -спиральные конформации в количестве не менее 60% от полипептидной цепи; к  $\beta$ -белкам относятся содержащие не менее двух ( $\beta$ -антипараллельных цепей); к классу  $\alpha+\beta$ -белков относятся содержащие  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -структуру в пределах одной и той же полипептидной цепи; к классу  $\alpha/\beta$ -белков относятся содержащие многочисленные  $\beta$ -структуры, либо чередующиеся- вдоль полипептидной цепи, либо расположенные так, что один или несколько  $\beta$ -слоев окружены несколькими  $\alpha$ -спиралями каждой. Большинство изученных глобулярных белков относятся к классу  $\alpha/\beta$ , которому по численности- немного уступает  $\beta$ -класс, классы  $\alpha$  и  $\alpha+\beta$  менее распространены.

Наиболее общепринятая классификация белков основана на их функциях. По этой классификации среди белков выделяют достаточно большое количество классов: каталитически активные белки (ферменты), белки-гормоны, регуляторные белки, защитные белки, токсичные белки, транспортные белки, сократительные белки, структурные белки, рецепторные белки, запасные белки, дыхательные белки, антистрессовые белки и т. д.

Конечно, существующая классификация белков далека от совершенства, но в каждом классе белков удается подметить некоторые черты общности структуры-, свойств, функциональной активности включенных в его состав конкретных белков. Это позволяет более глубоко понять соотношение структуры и функции белковых молекул, открывает возможности для обобщения материалов, касающихся- взаимодействия белков с другими классами веществ: углеводами, нуклеиновыми- кислотами, липидами и др.

## ГЛИКОПРОТЕИНЫ

Гликопротеины — сложные белки, в составе которых имеется углеводный компонент. В соответствии с особенностями химического строения гликопротеины могут быть подразделены на истинные гликопротеины и протеогликаны (гликозаминопротеогликаны). Основное различие между ними заключается в том, что углеводные группировки истинных гликопротеинов содержат обыч-

но до 15–20 моносахаридных компонентов, не образующих повторяющихся олигосахаридных фрагментов, в то время как у протеогликанов они построены из очень большого числа повторяющихся единиц, в основном имеющих своеобразный- дисахаридный характер.

Молекулярная масса истинных гликопротеинов варьирует в широких пределах-, достигая иногда 1 млн и более. Особенно велика молекулярная масса у гликопротеинов слюны. На долю углеводного компонента в гликопротеинах приходится от 1–3% (овальбумин) до 80–90% (групповые вещества крови) массы всей молекулы. В составе углеводных компонентов обнаружено более 10 различных моносахаридов: D-галактоза, D-манноза, D-глюкоза, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин, D-ксилоза, L-арабиноза и др. Типичным компонентом гликопротеинов является также нейраминавая кислота, чаще встречаемая в форме сиаловых кислот. Связь между углеводным компонентом и белковой частью в разных гликопротеинах осуществляется через одну из трех аминокислот: аспарагин, серин, треонин.

Молекулярная масса протеогликанов велика и достигает нескольких миллионов за счет большого числа чередующихся дисахаридных звеньев. Растворы этих углеводсодержащих белков обладают высокой вязкостью. Протеогликаны состоят из небольшой белковой части, к которой ковалентно присоединяется значительное число (несколько десятков) гетерополисахаридных цепей, содержащих в своих молекулах остатки аминсахаридов и урновых кислот: гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, гепарин, гепарансульфат, кератансульфат. В протеогликанах, содержащих гиалуроновую кислоту, на долю белковой части приходится 0,4–2% от всей массы молекулы, в случае хондроитинсульфатов — 17–22%. Связь между углеводными и белковыми компонентами осуществляется в протеогликанах через гликозидную связь D-ксилозы и серина (у хондроитинсульфатов, гепарина), N-ацетилглюкозамина и треонина (у кератансульфатов).

Углеводсодержащие белки широко распространены в живых организмах, они встречаются у животных, растений и микроорганизмов, где выполняют самые разнообразные функции: избирательного взаимодействия, высокоспецифического узнавания, транспортные, каталитические, структурно-механические. Помимо перечисленных, гликопротеины выполняют в организме и ряд других функций, например, участвуют в процессах свертывания крови (фибриноген, протромбин, гепарин), защитные (интерфероны, иммуноглобулины), гормональные (гонадотропные, фолликулостимулирующий, тиреоглобулин-) и др. Следует отметить, что углеводные компоненты значительно повышают стабильность молекул, в состав которых они входят, к различного рода физическим и химическим воздействиям и предохраняют их от действия протеиназ, определяя тем самым биологическую роль гликопротеинов.

## Работа 8. Определение углеводного компонента в гликопротеинах

### Реактивы и оборудование:

*Вареный яичный белок, 1% раствор яичного белка, 0,1% спиртовой раствор  $\alpha$ -нафтола, 1% спиртовой раствор тимолола, концентрированные кислоты: соляная, серная, уксусная. Пробирки, штатив для пробирок, стеклянные палочки, пипетки, фильтровальная бумага.*

*Доказательство наличия углеводного компонента в яичном альбумине*

**Ход работы:** А. В пробирку вносят кусочек вареного яичного белка и 3 мл концентрированной соляной кислоты. Содержимое пробирки осторожно нагревают в пламени горелки, не доводя до кипения. Белок, а затем и вся жидкость приобретают фиолетовое окрашивание.

Б. В две пробирки наливают по 1 мл 1% раствора белка, затем в одну из них добавляют 2–3 капли 0,1% раствора  $\alpha$ -нафтола, в другую — столько же 1% раствора тимолола. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и осторожно по стенке приливают по 0,5 мл концентрированной серной кислоты и дают постоять. На границе раздела двух жидкостей в первой пробирке наблюдают фиолетовое кольцо, во второй — красное. Окрашенные кольца возникают за счет реакции фурфурола с  $\alpha$ -нафтолом и тимололом соответственно.

*Выделение муцина из слюны и определение его углеводного компонента*

**Ход работы:** А. В пробирку собирают 1–2 мл слюны и по каплям приливают концентрированную уксусную кислоту (10–20 капель). Выпадает осадок муцина. Осторожно сливают жидкость из пробирки, а сгусток высушивают фильтровальной бумагой. Со сгустком проводят реакции с  $\alpha$ -нафтолом или тимололом.

Б. К сгустку муцина приливают 3 капли 0,2% спиртового раствора  $\alpha$ -нафтола. Дают постоять, затем осторожно по каплям приливают 0,5 мл концентрированной серной кислоты. Появляется розово-фиолетовое окрашивание.

### ФОСФОПРОТЕИНЫ

Фосфопротеины — сложные белки, содержащие в качестве небелковой части остатки фосфорной кислоты (0,5–1%). Фосфорная кислота в фосфопротеинах связана с радикалами серина и треонина эфирной связью. Наиболее часто остатки фосфорной кислоты связаны с гидроксилом того серина, который находится в пептидной цепи рядом с глутаминовой кислотой. К фосфопротеинам относятся казеиногены молока, вителлин, фосфатин яичного желтка, овальбумин белка куриного яйца, ихтулин икры рыб, некоторые ферменты: фосфорилаза, фосфоглюкомутаза, пепсин.

Фосфопротеины в клетках синтезируются в результате посттрансляционной модификации, подвергаясь фосфорилированию при участии протеин-

киназ. Уровень фосфопротеинов в клетке зависит в значительной степени от регулирующего действия ферментов, катализирующих фосфорилирование (протеинкиназы) и дефосфорилирование (протеинфосфатазы).

Следует особо отметить, что ряд ключевых ферментов, регулирующих процессы внутриклеточного обмена веществ, также существуют как в фосфорилированной, так и в дефосфорилированной формах.

Фосфопротеины служат одним из питательных материалов для развития эмбрионов- и для растущих организмов. Так, казеиноген (казеин) молока содержит все незаменимые аминокислоты и фосфорную кислоту. Вместе с казеиногеном в организм ребенка поступает фосфорная кислота, необходимая для развития скелета и процессов обмена веществ. Казеиноген молока представлен в виде растворимой кальциевой соли, содержащей два важных минеральных вещества — фосфор и кальций.

Таким образом, фосфопротеины являются ценными источниками энергетического- и пластического материала в процессе эмбриогенеза и дальнейшего постнатального роста и развития организма.

### **Работа 9. Выделение казеиногена из молока и гидролиз его, определение продуктов гидролиза**

Казеиноген обладает кислыми свойствами и в молоке находится в виде ани-онов, растворимых в воде (кальциевая соль казеиногена). Изoeлектрическая точка казеиногена находится при pH 4,7. Этим объясняется, что при подкислении молока до 4,7 молоко свертывается в результате выпадения в осадок казеиногена-. Не следует добавлять в молоко избыток кислоты, так как молекулы казеиногена- вновь перезаряжаются и переходят в раствор, что мешает осаждению.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Серная кислота (10%); концентрированная уксусная кислота; гидроксид натрия (10%); сульфат меди (1%); карбонат натрия (0,1%); фенолфталеин (0,5% спиртовой раствор); концентрированная азотная кислота; молоко; молибденовый- реактив: 7,5 г молибдата аммония растворяют в 100 мл дистиллированной- воды и добавляют 100 мл 32% раствора азотной кислоты (плотность- 1,21 г/мл). Воронки, фильтры, пробирки, стеклянные палочки, пипетки на 2 мл, колбочки с обратным холодильником.*

**Ход работы:** К 4 мл молока приливают равный объем дистиллированной воды. Осаждают казеиноген добавлением 2 капель концентрированной уксусной кислоты. Выпавший осадок казеиногена отфильтровывают и промывают на фильтре дистиллированной водой два раза.

Все содержимое с фильтра переносят в колбу (или пробирку), осадок с фильтра смывают в ту же колбу 2 мл 0,1% раствора карбоната натрия и добавляют- 4 мл 10% раствора гидроксида натрия. Колбу закрывают

пробкой с обратным- холодильником и кипятят на умеренном огне 15 минут с момента закипания. После охлаждения к гидролизату добавляют равный объем 0,1% раствора карбоната натрия и проводят реакции на продукты гидролиза. Белок открывают биуретовой реакцией (см. работу 1). Фосфат обнаруживают молибденовой пробой. К 10 каплям гидролизата добавляют 1 каплю фенолфталеина и 1 каплю концентрированной азотной кислоты и после обесцвечивания реакционной смеси- добавляют 20 капель молибденового реактива. Затем доводят содержимое пробирки до кипения и сразу охлаждают ее в струе холодной воды. На дне пробирки появляется желтый осадок фосфорномолибденовокислого- аммония.

## **ХРОМОПРОТЕИНЫ**

Хромопротеины — сложные белки, простетическая группа которых представлена окрашенным небелковым компонентом, откуда и произошло их название (от греч. *chroma* — краска). Среди хромопротеинов различают гемопро- теины, магнийпорфирины, флавопротеины. Хромопротеины наделены рядом уникальных биологических функций: они участвуют в фотосинтезе, дыхании клеток и целостного организма, в транспорте кислорода и углекислого газа, в окислительно-восстановительных реакциях, в свето- и цветовосприятии.

Таким образом, хромопротеины играют исключительно важную роль в процессах жизнедеятельности. Достаточно, например, подавить дыхательную функцию гемоглобина путем введения угарного газа или синильной кислоты или ее солей (цианидов), ингибирующих ферментные системы клеточного ды- хания, как моментально наступает смерть организма.

К хромопротеинам относятся гемоглобин и его производные, миоглобин, хлорофиллсодержащие белки, вся цитохромная система, каталаза, пероксида- за, ксантиноксидаза, альдегидоксидаза, дигидрооротатдегидрогеназа и др.

### **Работа 10. Качественное определение геминовой группировки гемоглобина**

Гемоглобин состоит из белка (глобина) и простетической группы (гема). По химической природе гем — соединение протопорфирина с двухвалент- ным железом, способное при особых условиях переходить в трехвалентное (метгемоглобин). В каждой молекуле гемоглобина 4 молекулы гема и 4 ато- ма железа. Молекула- гемоглобина взрослого человека состоит из двух пар  $\alpha$ - и  $\beta$ -идентичных полипептидных цепей.

Видовая специфичность гемоглобина зависит от белковой части глобина, поскольку гем имеет одинаковое строение для всех гемоглобинов. Качественное определение геминовой группировки гемоглобина обусловлено способно-стью гемоглобина катализировать окисление бензидина перекисью водорода. Бензидин при этом окисляется в парахинондиимин и жидкость приобретает



синюю окраску-, а при стоянии — красную. Аналогично протекает реакция и с гваяковой кислотой. Эти реакции очень чувствительны и служат для обнаружения минимальных- количеств крови в биологических жидкостях.

### **Реактивы и оборудование:**

*Кровь; перекись водорода (3%); 1% раствор бензидина: 1 г бензидина растворяют в ледяной уксусной кислоте и доводят объем до 100 мл, хранят в холодильнике в темной склянке с притертой пробкой. Для растворения используют бензидин основной  $H_2N-C_6H_4-C_6H_4-NH_2$ ; роданид аммония или роданид калия- (1%); концентрированная азотная кислота; соляная кислота (10%). Пробирки-, пипетки, тигли с крышками.*

**Ход работы:** А. В первую пробирку наливают 0,5 мл крови, во вторую — 0,5 мл дистиллированной воды. В обе пробирки добавляют по 0,5 мл 1% раствора бензидина и по 0,5 мл 3% раствора перекиси водорода. В пробирке с кровью жидкость окрашивается в синий цвет, через некоторое время смесь приобретает красную окраску.

Б. На крышку тигля вносят 2 капли крови и озоляют, добавив 4 капли концентрированной азотной кислоты, продолжают нагревание до образования сухого- остатка. Затем остаток растворяют в 10% растворе соляной кислоты, прибавив- несколько капель. К образовавшемуся раствору прибавляют 2 капли раствора роданида аммония или роданида калия и наблюдают образование роданида железа, окрашивающего жидкость в красный цвет.

### **Вопросы и задания для самоподготовки**

---

1. Что положено в основу классификации белков?
2. Можно ли считать существующие виды классификации белков научно обоснованными-?
3. Какова классификация белков по химическому составу? По каким признакам классифицируют простые белки? Приведите примеры.
4. В чем отличие сложных белков от простых? Дайте краткую характеристику классам сложных белков.
5. Какие белки относятся к гликопротеинам? Какие вещества являются их простетической группой? Приведите примеры, напишите их структур-ные формулы.
6. Каким образом осуществляется взаимодействие белковой части и простетической группы в гликопротеинах?
7. Какова биологическая роль фосфопротеинов? Какую роль играют процессы фосфорилирования и дефосфорилирования в обмене веществ?
8. Почему гемоглобин, цитохромы, флавопротеины относят к классу хромо-протеинов? Каковы особенности их строения? Приведите структурную формулу простетической группы гемоглобина. Каким образом она соединяется с белковой частью? Чем объясняется видовая специфичность гемоглобина?

9. Каковы биологические функции хромопротеинов?
10. Какими методами изучают химический состав сложных белков?
11. Какими качественными реакциями можно обнаружить продукты гидролиза: а) казеиногена, б) гемоглобина?
12. Какие два класса белков выделяют, основываясь на форме белковой молекулы?
13. Каковы особенности строения фибриллярных белков? Приведите примеры строения коллагена, кератинов. Каковы основные функции фибриллярных белков?
14. Дайте краткую характеристику классам глобулярных белков в соответствии с особенностями строения их вторичной и третичной структуры.
15. Какова функциональная классификация белков? (Перечислите классы.) Каково значение классификации белков по функциям? Дайте краткую характеристику представителям некоторых классов (строительные, сократительные, дыхательные, защитные).

### **ОБМЕН БЕЛКОВ**

Белковый обмен занимает особое место в многообразных превращениях веществ, характерных для всех живых организмов. Выполняя ряд уникальных функций, свойственных живой материи, белки определяют специфику клеток, органов и целостного организма (пластическая функция) и в значительной степени динамическое состояние между организмом и окружающей средой. Кроме того, белки выполняют уникальную каталитическую функцию, которой не наделены ни жиры, ни углеводы, ни какие-либо другие органические соединения.

Белковый обмен строго специфичен, направлен и настроен, обеспечивая непрерывность воспроизводства и обновления белковых тел организма, обеспечивая тем самым непрерывность жизни.

*Таблица 5. Содержание белка в некоторых пищевых продуктах*

| Наименование продукта животного происхождения- | Содержание белка (%) | Наименование продукта растительного происхождения- | Содержание белка (%) |
|--|----------------------|--|----------------------|
| Мясо   | 18–22                | Рис  | 8                    |
| Рыба   | 17–22                | Горох  | 26                   |
| Сыр  | 20–36                | Соя  | 35                   |
| Яйца   | 13                   | Гречневая крупа                                    | 11                   |
| Молоко   | 3,5                  | Картофель  | 1,5–2                |

Главными источниками белков для человека являются пищевые продукты животного и растительного происхождения. Биологическая ценность пищевого белка целиком зависит от степени его усвоения организмом, что в свою очередь определяется соотношением между аминокислотным составом потребляемого белка и аминокислотным составом белков тела. Такой белок лучше

используется- организмом для синтеза белков тканей и органов. Для человека белки мяса, молока, яиц биологически более ценны, поскольку их аминокислотный состав ближе к аминокислотному составу органов и тканей. Однако это не исключает приема растительных белков, в которых содержится необходимый набор аминокислот-, но в другом соотношении, поэтому для биосинтеза одного и того же количества собственных белков тела человеку потребуется значительно больше растительных белков, чем животных.

Нормы белка для взрослого человека и для детей разного возраста основаны на результатах многочисленных научных исследований. Эти нормы выводятся из оптимального содержания белка в пищевом рационе. Так, взрослый человек, занимающийся умственным трудом и подвергающийся средней физической нагрузке, должен получать в сутки 100–120 г белка. Потребности белка в детском возрасте определяются в первую очередь возрастом и массой тела. Дети даже раннего- возраста нуждаются в получении 55–72 г белка в сутки. С возрастом (от 12 до 15 лет) эта норма увеличивается до суточной нормы взрослого человека.

В организме взрослого человека метаболизм белка в целом сбалансирован, т. е. количество поступающего и выделяемого белкового азота примерно равно. Предполагается, что в организме взрослого человека (массой около 70 кг) ежедневно разрушается до аминокислот 300–400 г белка. В то же время примерно такое же количество аминокислот включается во вновь образованные молекулы белка. Высокий оборот белка в организме необходим потому, что многие белки относительно недолговечны, они начинают обновляться спустя несколько часов после синтеза, а биохимический полупериод составляет 2–8 дней. Еще более короткоживущими являются ферменты метаболизма. В противоположность им долговечны структурные белки, гистоны, гемоглобин.

*Таблица 6. Содержание незаменимых аминокислот в белках различного происхождения (в % на сухую массу)*

| Аминокислоты | Пшеничная-мука | Соевая мука | Рыба | Говядина | Коровье молоко | Кормовые дрожжи |
|--------------|----------------|-------------|------|----------|----------------|-----------------|
| Аргинин*     | 4,2            | 4,7         | 5,0  | 7,7      | 4,1            | 8,0             |
| Гистидин*    | 2,2            | 2,4         | 2,3  | 3,3      | 2,6            | 7,1             |
| Изолейцин    | 4,2            | 5,4         | 4,6  | 6,0      | 7,8            | 5,5             |
| Лейцин       | 7,0            | 7,7         | 7,8  | 8,0      | 11,0           | 7,6             |
| Лизин        | 1,9            | 6,5         | 7,5  | 10,0     | 8,7            | 6,8             |
| Фенилаланин  | 5,5            | 5,1         | 4,0  | 5,0      | 5,5            | 3,9             |
| Треонин      | 2,7            | 4,0         | 4,2  | 5,0      | 4,7            | 5,4             |
| Триптофан    | 0,8            | 1,5         | 1,2  | 1,4      | 1,5            | 1,6             |
| Валин        | 4,1            | 5,0         | 5,2  | 5,5      | 7,1            | 6,1             |

\* Не синтезируется в детском организме.

Полученные с пищей белки подвергаются полному гидролизу в желудочно-кишечном тракте до аминокислот, которые всасываются кровотоком и распределяются в организме. Не могут синтезироваться во взрослом организме человека 8 из 20 белковых аминокислот, в детском — 10. Эти незаменимые аминокислоты- должны поступать с пищей.

## ГИДРОЛИЗ БЕЛКОВ

Весь сложный процесс переваривания пищевых белков в желудочно-кишечном тракте происходит таким образом, чтобы путем последовательного действия протеолитических ферментов лишить белки пищи видовой и тканевой специфичности и придать продуктам распада способность всасываться в кровь через стенку кишечника.

Ферментативная деградация белков катализируется гидролазами, кото-рые ускоряют разрыв пептидных связей. Причем известны две группы пеп-тидаз: экзопептидазы-, катализирующие разрыв концевых пептидных связей, и эндопептидазы-, катализирующие пептидные связи внутри полипептидной цепи. Эндо-пептидазы обладают разной субстратной специфичностью действия, определяемой- природой радикалов аминокислот по соседству с разрывае-мой пептидной связью.

Белки в желудке денатурируют под действием соляной кислоты и становятся более чувствительными к атаке эндопептидазами желудочного сока. Желудочный сок содержит свободную соляную кислоту, муцины, неорганические соли и предшественников различных ферментов: пепсиногены, прохимозин и др. Наиболее важными пищеварительными ферментами желудочного сока являются пепсиногены, которые аутокаталитически активируются при низких значениях рН до пепсинов.

Пепсин отличается высокой устойчивостью в сильнокислой среде и характеризуется низким значением изоэлектрической точки (рI 1). Пепсин гидролизует внутренние пептидные связи, образованные ароматическими аминокислотами, а также ала-ата, ала-сер.

В желудке интенсивный процесс переваривания белков продолжается в течение 1–3 часов. Кислое содержимое желудка порциями поступает в двенадцатиперстную кишку, где смешивается со щелочным секретом поджелудочной железы и желчью.

Секрет поджелудочной железы содержит множество ферментов, среди которых — трипсиноген, химотрипсиноген, эластаза, карбоксипептидаза. Ключевую роль среди протеолитических ферментов играет трипсиноген. Трипсиноген активируется энтеропептидазой, отщепляющей N-концевой гексапептид, вследствие чего функциональные группы радикалов аминокислот перестраиваются, образуя активный центр. Образующиеся молекулы трипсина способны активировать следующие молекулы трипсиногена (аутокатализ), а также активировать другие зимогены: химотрипсиноген, проэластазу, прокарбоксипептидазу.

Трипсин, химотрипсин, эластаза являются эндопептидазами, т. е. расщепляют внутренние пептидные связи. Трипсин гидролизует пептидные связи, образованные основными аминокислотами (лиз, арг), химотрипсин ускоряет гидролитический разрыв пептидных связей, образованных карбоксильными группами ароматических- аминокислот (фен, тир, три), а эластаза — пептидные связи, образованные гли, ала, сер. Все эти ферменты являются гидролазами с рН-оптимумом в нейтральной или слабощелочной среде (рН 7,5–8,8).

Образовавшиеся пептиды небольшого размера атакуются карбоксипептидазами. Дальнейший гидролиз пептидов до свободных аминокислот, помимо карбоксипептидаз, осуществляется в стенках тонкого кишечника аминоксипептидазами и различными дипептидазами. Среди дипептидаз кишечного сока хорошо изучена глицил-глицин-дипептидаза, а также пролил-дипептидаза, катализирующая гидролиз пептидной связи, в образовании которой участвует карбоксигруппа пролина и пролин-дипептидаза, гидролизующая амидную связь дипептидов про-про. Эта группа ферментов относится к экзопептидазам. При этом образуются свободные аминокислоты, которые подвергаются всасыванию слизистой кишечника с одновременным поглощением ионов натрия.

### **Работа 11. Гидролиз казеина при участии трипсина**

Трипсин — фермент, относящийся к классу гидролаз, подклассу пептид-пептидгидролаз (эндопептидаз), подподклассу сериновые протеиназы. Строение трипсина хорошо изучено. Это белок с относительной молекулярной массой, равной 23 950, состоит из 228 аминокислотных остатков. Первичная структура трипсина полностью выяснена, также многое известно о вторичной и третичной структурах. В активный центр трипсина входят аминокислоты: серин-183 остаток, гистидин-29 остаток. Благодаря сочетанию перечисленных аминокислот в молекуле трипсина и осуществляется гидролиз пептидных связей после аргинина и лизина: ала-фен-лиз-вал-арг-глу-гли + H<sub>2</sub>O → ала-фен-лиз + вал-арг + глу-гли.

Степень распада белка при действии на него трипсина можно проследить по увеличению количества α-аминогрупп, освобождающихся при гидро-лизе пептидных- связей белка. Чем больше освободилось α-аминных групп, тем больше, соответственно, распалось пептидных связей и тем выше, следовательно, степень- деструкции белковой молекулы.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Раствор казеина (10 мг в 1 мл): навеску казеина растворяют в небольшой порции 0,1% раствора карбоната натрия при осторожном нагревании, разбавляют дистиллированной водой и осторожно нейтрализуют 0,1 н. раствором соляной кислоты; раствор трипсина 0,25 мг в 1 мл; 0,2 М трис-буфер (рН 8,0): смешивают 50 мл 0,4 н. раствора триоксиметиламинометана с 26,8 мл 0,4 н. раствора соляной кислоты и доводят до 100 мл дистиллирован-*

ной водой; нингидрин (3%); изопропиловый спирт (50%); ацетатный буфер (рН 5,4): 270 г ацетата натрия растворяют в 200 мл дистиллированной воды- и добавляют 50 мл перезнанной уксусной кислоты и доводят объем до 750 мл дистиллированной водой. ФЭК, термостат, пробирки, штативы для пробирок, пипетки на 1 и 5 мл.

**Ход работы:** В две пронумерованные пробирки вносят по 1 мл 0,2 М трис-НСl буфера (рН 8,0) и по 1 мл 1% раствора казеина. В одну пробирку приливают 1 мл 0,025% раствора трипсина, в другую — 1 мл инактивированного раствора- трипсина (заранее прокипяченного не менее часа). Растворы хорошо перемешивают и тотчас берут из каждой пробирки по 0,5 мл содержимого в две тщательно вымытые пробирки.

Оставшиеся опытную и контрольную пробы помещают в термостат (38 °С) на 2 часа, отбирая из них аликвоты по 0,5 мл через 30, 60, 90, 120 минут.

В отобранных аликвотах проводят реакцию на наличие свободных α-аминогрупп, для чего их помещают в кипящую водяную баню на 10 минут. Затем- охлаждают до комнатной температуры, после чего прибавляют по 0,5 мл дистиллированной воды, 0,5 мл ацетатного буфера (рН 5,4) и 0,5 мл нингидри-нового реактива. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и помещают для развития окраски в термостат (95 °С) на 7–10 минут. Затем, не вынимая пробирок из термостата, прибавляют в каждую из них по 5 мл 50% раствора изопропанола.

Оптическую плотность опытной пробы измеряют на ФЭКе против контроля при длине волны 507 нм (зеленый светофильтр).

Полученные результаты выражают графически, откладывая по оси абсцисс время инкубации, а по оси ординат значения оптических плотностей. Полученная прямая наглядно демонстрирует динамику высвобождения во времени свободных- аминогрупп в процессе гидролиза казеина в присутствии трипсина.

### **Вопросы и задания для самопроверки**

1. Какое место занимает обмен белков в метаболизме веществ? Почему?
2. Под влиянием каких ферментов происходит расщепление белков? Назовите класс, подкласс, подподкласс этих ферментов? Дайте характеристику от- дельным представителям.
3. Почему протеолитические ферменты находятся в желудочно-кишечном тракте в виде зимогенов? Каким образом происходит их активирование? Что такое аутокатализ?
4. Какие ферменты ускоряют гидролиз внутренних пептидных связей белка? Дайте краткую характеристику отдельным представителям этого подкласса.
5. Какие пептидные связи гидролитически расщепляются при участии химо- трипсина? Опишите механизм действия химотрипсина.
6. Укажите, каким образом действует химотрипсин на пептид: лей–тир–цис– фен–лиз–ала–три–арг–цис–фен–глу–ала–лей–иле.

7. Укажите, каким образом действует пепсин на пептид: лиз–ала–гли–асп–фен–гли–асп–ала–фен–глу–сер–арг–фен–ала–ада–гли.
8. Какие пептиды образуются при обработке трипсином приведенного ниже пептида: вал–лиз–глу–мет–арг–цис–глу–лиз–фен–вал–арг–иле–про–гли–лиз–сер–гли–тре?
9. Укажите, каким образом действуют карбоксипептидаза и аминопептидаза на пептид: ала–вал–гли–сер. К какому подклассу пептидаз они относятся?
10. Где локализованы дипептидазы? Какие из них хорошо изучены? В чем отличие пролил-дипептидазы и пролиндипептидазы? Напишите уравнения реакций гидролиза при участии этих ферментов.
11. Какие пищевые белки являются наиболее ценными для организма человека? Почему?
12. Может ли вегетарианская диета привести к отрицательному азотистому балансу?
13. Каковы потребности детей школьного возраста в пищевом белке?

### **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ АЗОТИСТОГО ОБМЕНА**

Аминокислоты после всасывания через стенки кишечника поступают через воротную вену в печень, где они подвергаются ряду превращений. Значительная часть аминокислот разносится кровью по всему организму и используется для физиологических целей. В печени аминокислоты используются не только для синтеза собственных белков и белков плазмы крови, но также для синтеза специфических- азотсодержащих соединений: пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов-, креатина, мочевой кислоты и др. Таким образом, всосавшиеся аминокислоты- в первую очередь используются в качестве строительного материала для синтеза специфических белков организма и других биологически активных азотсодержащих веществ. Некоторое количество аминокислот подвергается распаду с образованием конечных продуктов белкового обмена. Метаболизм аминокислот- белковых молекул включает общие пути обмена (катаболизм и анаболизм аминокислот) и индивидуальные пути превращения отдельных аминокислот. Общие пути превращения аминокислот включают реакции дезаминирования, трансаминирования, декарбоксилирования, реакции по радикалу аминокислот.

Аминокислоты, как и белки, не накапливаются и не откладываются в тканях наподобие гликогена и жиров. Количество аминокислот, подвергающихся распаду, зависит от характера питания и от физиологического состояния организма-. В организме человека распаду подвергается около 70 г аминокислот в сутки, при этом освобождается большое количество аммиака. Аммиак является клеточным ядом, при высоких концентрациях он повреждает главным образом нервные клетки. Концентрация аммиака в организме должна сохра-

няться на низком уровне и не превышать 60 мкмоль/л в крови. Аммиак должен быстро инактивироваться и выводиться из организма.

Одним из путей обезвреживания аммиака является биосинтез глутамина, протекающий в мозге, сетчатке, мышцах, почках, печени.

Основным механизмом обезвреживания аммиака в организме человека является биосинтез мочевины, которая выводится с мочой в качестве главного конечного- продукта белкового, соответственно, аминокислотного обмена. У разных видов позвоночных инактивация и выведение аммиака производится различными способами. Живущие в воде животные выделяют аммиак непосредственно- в воду: например, у рыб он выводится через жабры (аммиотелические организмы). Наземные позвоночные, в том числе человек, выделяют лишь небольшое- количество аммиака, а основная его часть превращается в мочевины (уреотелические организмы). Птицы и рептилии, напротив, образуют мочевую кислоту, которая в связи с экономией воды выделяется преимущественно в твердом виде (урикоотелические организмы).

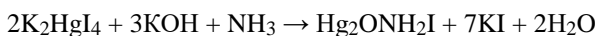
Местом синтеза мочевины является печень, пять биохимических реакций цикла мочевины разделены на два компартмента: митохондрии и цитозоль. Скорость цикла мочевины лимитируется первой реакцией, образованием карбонилфосфата при участии аммиака и АТФ. Биосинтез мочевины требует больших затрат энергии, необходимая энергия поставляется за счет расщепления макроэргических связей АТФ.

Под общим азотом мочи понимают сумму всех азотсодержащих соединений мочи: азот мочевины, креатин, мочевой кислоты, аммонийных солей и др.

Количество общего азота, выделяемого за сутки с мочой, у взрослого человека составляет 6–17 г, из него 80–90% составляет азот мочевины.

## **Работа 12. Определение общего азота мочи колориметрическим методом**

Для определения общего азота мочи сначала проводят сжигание органических веществ мочи с концентрированной серной кислотой. После сжигания (минерализации) органических веществ мочи концентрированной серной кислотой азот в виде аммиака всех исследуемых фракций связывается с серной кислотой, образуя сульфат аммония. Колориметрическое определение общего азота основано на том, что аммиак сульфата аммония образует с реактивом Несслера желто-оранжевое окрашивание при pH 12,0:



Реактив Несслера

Йодит меркураммония

Интенсивность окрашивания раствора прямо пропорциональна концентрации аммиака, а следовательно, и азота в моче.



### **Реактивы и оборудование:**

*Серная кислота (конц.); гидроксид натрия (50%); стандартный- раствор сульфата аммония: химически чистый сульфат аммония (массой 0,943 г) растворяют в 1 л воды (1 мл раствора содержит 0,2 мг азота); реактив-Несслера: 10 г йодида калия растворяют в 15 мл воды, добавляют 15 г йодида ртути (II), тщательно перемешивают и приливают 80 мл 50% раствора щелочи (не содержащей карбонатов). Перемешивают и общий объем доводят охлажденной прокипяченной дистиллированной водой до 500 мл. Оставляют на сутки, после чего фильтруют через стеклянную вату. Раствор должен быть прозрачным (хранить в темной склянке с притертой пробкой); моча; перекись водорода; лакмусовая бумага.*

*Колбы Кьельдаля, пробирки, штативы для пробирок, пипетки на 1 и 10 мл, мерные цилиндры на 20 мл, электроплитки, песчаные бани, фотоэлектро--колориметр.*

**Ход работы:** 1. Сжигание. В колбу Кьельдаля помещают 1 мл мочи, разведенной в 10 раз, добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты.

Одновременно готовят контрольную пробу, заменив мочу на дистиллированную воду. Обе колбы ставят в вытяжном шкафу в наклонном положении на песчаную баню. Содержимое колб нагревают в течение 40–60 минут, охлаждают, приливают по 1–2 капли пероксида водорода и сжигают до обесцвечивания реакционной смеси.

Минерализат сливают после охлаждения в мерный цилиндр, споласкивая колбу два раза по 3 мл дистиллированной водой, затем доводят дистиллированной водой в цилиндре до объема 10 мл. Получают минерализованную мочу, разведенную в 100 раз.

2. Фотоколориметрирование. В мерный цилиндр помещают 1 мл минерализованной мочи, приливают 10 мл дистиллированной воды, перемешивают и, используя лакмусовую бумагу, прибавляют по каплям 40% раствор гидроксида натрия до тех пор, пока лакмус не станет приобретать синеватый оттенок. Затем добавляют дистиллированную воду до 14 мл (в мерном цилиндре) и приливают 1 мл реактива Несслера. Необходимо строго соблюдать порядок приливания, тщательно перемешивая жидкость стеклянной палочкой. Одновременно таким же образом готовят контрольную пробу.

Появляется желто-оранжевое окрашивание, после чего сразу проводят колориметрирование при синем светофильтре.

3. Построение калибровочной кривой. Пока идет сжигание, необходимо приготовить серию стандартных рабочих растворов сульфата аммония с содержанием 0,01; 0,02; 0,05; 0,10; 0,16; 0,20 мг азота в 1 мл.

К 1 мл каждого стандартного раствора в мерном цилиндре приливают 13 мл дистиллированной воды и по 1 мл реактива Несслера при помешивании и фотометрируют. Находят показания оптической плотности при синем светофильтре

для каждого стандартного раствора. Затем приступают к построению графика, откладывая на оси ординат оптическую плотность, а на оси абсцисс — концентрацию азота. Через полученные точки проводят прямую линию, которая изображает зависимость оптической плотности от концентрации азота.

4. Расчет. Найдя разницу между значениями оптической плотности в опытной и контрольной пробах и, откладывая ее на калибровочной кривой, определяют содержание азота в 1 мл исследуемой мочи:

$$\text{Содержание общего азота в суточной моче, г/сут.} = \\ = C \cdot V \cdot \text{суточный диурез} / 1 \text{ мл} \cdot 10^3,$$

где  $C$  — концентрация азота, найденная по калибровочному графику;  $V$  — разведение мочи в 100 раз; 1 мл — количество минерализата, взятого для анализа;  $10^3$  — коэффициент перевода миллиграммов в граммы. Суточное выделение мочи в среднем 1 500 мл.

По количеству азота, выделенного с мочой за сутки, можно определить количество распавшегося в организме белка. Для этого полученную в результате расчета величину умножают на 6,25, исходя из того, что в белке в среднем содержится 16% азота ( $100 : 16 = 6,25$ ).

### Вопросы и задания для самопроверки

---

1. Каковы пути превращения аминокислот в организме млекопитающих?
2. Каковы метаболические пути новообразования аминокислот? Приведите уравнения реакций. Какие аминокислоты не могут синтезироваться в организме человека и должны поступать с пищей?
3. Какие аминокислоты синтезируются в организме млекопитающих реакцией восстановительного аминирования? Напишите уравнение реакции восстановления для одной из них, укажите фермент, катализирующий данный процесс.
4. Каковы метаболические пути деструкции аминокислот? Приведите уравнения реакций, назовите ферменты.
5. Какая реакция распада аминокислот по  $\alpha$ -аминогруппе преимущественно протекает в организме млекопитающих? Приведите уравнение реакции для глутаминовой кислоты, назовите фермент.
6. Напишите уравнение реакции декарбоксилирования для триптофана, назовите фермент. Каковы физиологические функции образующихся в результате декарбоксилирования аминокислот, биогенных аминов?
7. Какие основные метаболиты, включающиеся в цикл ди- и трикарбоновых кислот, образуются при деструкции радикалов аминокислот? Напишите структурные формулы этих веществ.
8. Каковы пути обезвреживания аммиака в организме, образующегося при дезаминировании аминокислот? Какие аминокислоты являются акцепторами аммиака в момент его образования в клетке? Напишите уравнение реакции образования глутамина, назовите фермент.

9. Каковы основные этапы цикла мочевины? Где он локализован? Почему его называют орнитинным циклом? Приведите уравнения реакций цикла мочевины-, назовите ферменты. Какое количество молекул АТФ затрачивается на синтез мочевины в орнитинном цикле?
10. Какие метаболиты цикла мочевины связаны с циклом лимонной кислоты? Покажите эту взаимосвязь при помощи уравнений реакций.
11. Какие типы азотистого обмена выработали живые организмы в процессе эволюции? Какое соединение является конечным продуктом азотистого обмена у млекопитающих? У птиц? У костистых рыб? Почему?
12. Под действием трансаминазы мышц крысы в реакции между  $\alpha$ -кетоглутаратом и аланином за один час образовалось 110 мг глутамата. Какое количество глутамата образуется за два часа под действием трансаминазы печени, активность которой к аланину в пять раз выше, чем у трансаминазы мышц? Напишите уравнение реакции трансаминирования между  $\alpha$ -кетоглутаратом и аланином. Каков механизм данной реакции? Каким образом- влияет на трансаминирование недостаток и отсутствие витамина В<sub>6</sub>?
13. Человек весом 70 кг ежедневно получает с пищей 3 000 ккал и выделяет 27,0 г мочевины. Какая доля его ежедневной потребности в энергии (%) компенсируется выделением 0,16 г азота в форме мочевины?

## ГЛАВА 2. ФЕРМЕНТЫ

Ферменты — катализаторы белковой природы, образующиеся и функционирующие во всех живых организмах. Ферменты являются необычайно мощными биокатализаторами, как правило, намного превосходящими по своей эффективности синтетические катализаторы. Они высоко специфичны по отношению к своим субстратам и ускоряют строго определенные химические реакции без образования побочных продуктов. Ферменты обеспечивают осуществление важнейших процессов жизнедеятельности: реализацию наследственной информации, биоэнергетику, синтез и распад биомолекул. Организованная последовательность процессов обмена возможна при условии, что каждая клетка обеспечена собственным генетически заданным набором ферментов. Только при этом условии осуществляется упорядоченная последовательность химических реакций, проходящих с высокой продуктивностью.

### НОМЕНКЛАТУРА И КЛАССИФИКАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

К настоящему времени идентифицировано свыше 2000 различных ферментов, каждый из которых катализирует какую-то определенную химическую реакцию. Первоначально ферментам давали названия, образуемые путем добавления окончания *-аза* к названию субстрата. Так, ферменты, гидролизующие крахмал (амилон), были названы *амилазами*, ферменты, гидролизующие жиры (липос), *липазами* и т. д. Позднее ферментам, катализирующим сходные по типу реакции, стали давать названия, указывающие тип соответствующей реакции.

Номенклатура, введенная Международным биохимическим союзом (IUB), состоит в том, что ферменты называют и классифицируют в соответствии с типом катализируемой химической реакции.

Все известные на сегодняшний день ферменты включены в «Каталог ферментов» под своим классификационным номером (КФ), состоящим из четырех цифр. Первая цифра указывает на принадлежность к одному из *шести классов*. Следующие две цифры определяют подкласс и подподкласс, а последняя — номер фермента в данном подподклассе. Например, лактатдегидрогеназа имеет КФ: 1.1.1.27 (класс 1 оксидоредуктаза, подкласс 1 донор электрона СН—ОН, подподкласс акцептор НАД<sup>+</sup>). Кроме научных систематических названий в ферментологии используются и тривиальные названия, например пепсин, трипсин, папаин, цитохромы и др.

Классификация ферментов строго научная и основана на типе реакции, подвергающейся каталитическому воздействию. По этому принципу все ферменты делятся на шесть классов. В каждом из шести классов объединены ферменты, обладающие одинаковой реакционной специфичностью. *Оксидоредуктазы* (класс 1) катализируют окислительно-восстановительные реакции. *Трансферазы* (класс 2) переносят ту или иную функциональную группу от од

ного субстрата на другой. *Гидролазы* (класс 3) также участвуют в переносе групп, однако акцептором- являются молекулы воды. *Лиазы* (класс 4) катализируют расщепление или образование химических соединений, при этом образуются или исчезают двойные связи. Поскольку ферменты 4-го класса участвуют в реакциях образования- химических соединений, их также называют *синта-зами*. *Изомеразы* (класс 5) перемещают группы в пределах одной молекулы без изменения общей формулы субстрата. *Лигазы*, или *синтетазы*, (класс 6) катализируют энергозависимые реакции синтеза (чаще всего за счет расщепления АТФ).

Таблица 7. Классы ферментов

| Класс                              | Тип реакции  | Важнейшие подклассы   |
|------------------------------------|--|---|
| 1. Оксидоредукторы                 | Окислительно-восстановительная<br>$S_{\text{окисл.}} + S'_{\text{восст.}} = S'_{\text{окисл.}} + S_{\text{восст.}}$  | Дегидрогеназы<br>Оксидазы<br>Пероксидазы<br>Редуктазы<br>Моноксигеназы<br>Диоксигеназы                          |
| 2. Трансферазы                     | Трансферазная — перенос функциональных- групп<br>$S-A + S' = S'-A + S$   | C <sup>1</sup> - трансферазы<br>Гликозилтрансферазы<br>Аминотрансферазы<br>Фосфаттрансферазы<br>Ацилтрансферазы |
| 3. Гидролазы<br>AB-субстрат        | Гидролиз связей<br>$AB + H_2O = A-H + B-OH$  | Эстеразы<br>Гликозидазы<br>Пептидазы<br>Амидазы   |
| 4. Лиазы (синтазы)<br>ABC-субстрат | Негидролитическое расщепление связей<br>$ABC = AB + C$<br>C: – CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O, NH <sub>3</sub>   | C–C-Лиазы<br>C–O-Лиазы<br>C–N-Лиазы<br>C–S-Лиазы  |
| 5. Изомеразы                       | Взаимопревращения структурных, геометриче- ских, оптических изомеров<br>$S = \text{изо-S}$   | Эпимеразы<br>Цис-, транс-изомеразы<br>Стереизомеразы  |
| 6. Лигазы (синтетазы)              | Реакции присоединения двух молекул,- сопря- женные разрывом фосфатных- связей АТФ<br>$S + S' + \text{АТФ} = SS' + \text{АДФ} + \text{H}_3\text{PO}_4$<br>$S + S' + \text{АТФ} = SS' + \text{АМФ} + \text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ | C–C-Лигазы<br>C–O-Лигазы<br>C–N-Лигазы<br>C–S-Лигазы  |

## СТРОЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ

По строению ферменты могут быть *однокомпонентными* — простые белки и *двухкомпонентными* — сложные белки. Во втором случае в составе ферментов обнаруживается добавочная группа небелковой природы. Белковую часть двухкомпонентных ферментов называют *апоферментом*, а небелковую часть — *кофактором*. Кофактор условно разделяют на *кофермент*, *легко диссоциирующий*-, и *простетическую группу*, *труднодиссоциирующую*. Кофермент легко присоединяется к различным апоферментам, а простетическая группа соединяется с одним и тем же апоферментом.

Функции и свойства апофермента и кофактора следующие: апофермент термолабилен-, определяет специфичность фермента, участвует в соединении фермента с субстратом активировывает кофактор; кофактор термостабилен, стабилизирует апофермент, участвует в катализе. Кофермент можно рассматривать как второй субстрат, или ко-субстрат, по двум причинам. Во-первых, в ходе реакции кофермент претерпевает химические изменения, в точности противоположные изменениям, которые происходят в субстрате. Например, в окислительно-восстановительных дегидрогеназных реакциях молекула субстрата окисляется, а молекула кофермента восстанавливается. Вторая причина, по которой кофермент можно считать равноправным участником реакции, заключается в том, что именно его участие может иметь фундаментальное физиологическое значение. Например, работа мышцы в анаэробных условиях сопровождается превращением пирувата в лактат. Но в этом случае важны совсем не лактат и не пируват: предназначением реакции является превращение НАДН в НАД<sup>+</sup>. В отсутствие НАД<sup>+</sup> гликолиз продолжаться не может и анаэробный синтез АТФ (а следовательно-, и работа мышцы) прекращается. Восстановление пирувата до лактата в анаэробных условиях обеспечивает окисление НАДН в НАД<sup>+</sup>, необходимый для синтеза АТФ.

Химическая природа коферментов достаточно хорошо изучена. Оказалось, что роль коферментов играет большинство витаминов (Е, К, Q, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, РР, Н и др.), многочисленная группа нуклеотидов и их производных, фосфорные эфиры моносахаридов, HS-глутатион и ряд других веществ.

Нуклеозидфосфаты являются не только исходными соединениями в биосинтезе нуклеиновых кислот, но и служат для запасания энергии, а так же обладают функциями коферментов. Метаболические интермедиаты часто становятся реакционноспособными (активированными) при присоединении фосфатсодержащих остатков. Так, например, аминокислота холин активируется в результате образования ЦДФ-холина (синтез фосфолипидов), глюкоза активируется в результате образования УДФ-глюкозы (синтез полисахаридов) и т. д. Остатки жирных кислот активируются путем переноса на кофермент А. Тиоэфир, каким является ацил-КоА, представляет собой активированную форму карбоновой кислоты, так как образующий ее ацильный остаток может легко

переноситься на другую молекулу-. Тиаминпирофосфат активирует альдегиды, кетоны и переносит их в виде- гидроксильных групп на другую молекулу.

Таблица 8. Некоторые коферменты и их биохимическая роль

| Кофермент |                              | Переносимые группы                                    | Ферменты   |
|-----------|------------------------------|---|--|
| Символ    | Название                     |   |  |
| АТФ       | Аденозинтрифосфат            | Фосфат-анионы   | Фосфаттрансферазы                                |
| УДФ       | Уридиндифосфат               | Гликозильные — остатки- (глюкоза и др.)               | Гликозилтрансферазы                              |
| ЦДФ       | Цитидиндифосфат              | Глицеролфосфаты, (холин и др.)                        | ЦДФ-диглицерид-синтаза<br>Холинтрансфераза       |
| НАД       | Никотинамидадениндинуклеотид | Гидрид-ионы (H <sup>+</sup> )                         | Дегидрогеназа                                    |
| ФАД       | Флавинадениндинуклеотид      | Атомы водорода  | Дегидрогеназа                                    |
| HS-КоА    | Кофермент А                  | Ацильные группы                                       | Ацилтрансфераза                                  |
| ТПФ       | Тиаминпирофосфат             | Альдегидные группы<br>Гидроксиалкильные<br>остатки    | Декарбоксилаза<br>Дегидрогеназа<br>Транскетолаза |
| ПФ        | Пиридоксальфосфат            | Аминогруппы   | Трансаминазы<br>Карбоксисинтетазы                |
| Н         | Биотин                       | СО <sub>2</sub>                                       | Транскарбоксилазы                                |
| ТНФ       | Тетрагидрофолат              | С <sub>1</sub> - группы:<br>формил,<br>метилен, метил | С <sub>1</sub> - трансферазы                     |

Пиридоксальфосфат является важнейшим коферментом в метаболизме белков-, участвуя в реакциях трансаминирования, декарбоксилирования, дегидратирования- аминокислот.

Все дегидрогеназы нуждаются в коферменте для переноса восстановитель- ных эквивалентов (НАД, НАДФ, ФАД, ФМН и др.).

Характерной особенностью двухкомпонентных ферментов является то, что ни белковая часть, ни добавочная группа в отдельности не обладают заметной каталитической активностью. Только их комплекс проявляет ферментативные свойства. При этом белок резко повышает каталитическую активность кофактора. Таким образом, хотя активным центром двухкомпонентных ферментов являются простетические группы — коферменты, их действия невозможны без участия апофермента.

Однокомпонентные ферменты формируют каталитический центр аминокислотными- остатками, имеющими в радикалах функциональные группы. Чаще всего в активных центрах однокомпонентных ферментов встречаются остатки сер, гис, тир, арг, цис, асп, глу, тре. Радикалы перечисленных аминокислот выполняют- ту же функцию, что и кофакторы в составе двухкомпонентного фермента-. Аминокислотные остатки, образующие активный центр однокомпонентного- фермента, расположены в различных точках еди-

ной полипептидной цепи, следовательно, каталитический центр возникает в тот момент, когда белковая молекула фермента приобретает присущую ей третичную структуру. Так, например, в активный центр химотрипсина входят *гис-57, асп-102, сер-195*, всего фермент состоит из 246 аминокислотных остатков. Химотрипсин, как и другие протеолитические ферменты, синтезируется в неактивной форме, в форме-профермента — химотрипсиногена. При активации химотрипсиногена трипсином и  $\pi$ -химотрипсином гидролизуются четыре пептидные связи, в результате чего происходит удаление дипептидных фрагментов и формирование активного центра, сближение 57-й, 102-й, 195-й аминокислот, участвующих непосредственно в акте катализа.

Аллостерический центр фермента представляет собой участок белковой молекулы, в результате присоединения к которому низкомолекулярного (редко высокомолекулярного) соединения изменяется третичная структура, вследствие этого либо увеличивается, либо снижается каталитическая активность фермента.

Молекулярные массы ферментов колеблются в широких пределах от нескольких тысяч до нескольких миллионов. Большинство ферментов имеют высокую молекулярную массу и построены из субъединиц. Например, каталаза, РНК-полимераза, глутаматдегидрогеназа построены из шести субъединиц. Мультимер проявляет максимальную каталитическую активность, диссоциация на субъединицы (протомеры) резко снижает каталитическую активность фермента.

## МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ФЕРМЕНТОВ

Действие большинства ферментов высоко специфично. Понятие специфичности относится не только к типам каталитических реакций, но и к природе субстратов. Ферменты специфически связывают субстраты в активном центре. При этом субстраты ориентируются таким образом, что приобретают оптимальное положение для образования переходного состояния (фермент-субстратного комплекса). Сближение и необходимая ориентация реагентов значительно повышает вероятность образования продуктивного комплекса.

Если обозначить фермент  $E$ , субстрат  $S$ , активированный субстрат  $S'$ , продукт реакции  $P$ , то механизм действия ферментов можно выразить достаточно простой схемой:



Эта схема первоначально была разработана В. Генри (1903 г.), затем Л. Ми-хаэлисом и М. Ментен (1913 г.) и подтверждена прямым выделением  $ES$ -,  $ES'$ -и  $EP$ -комплексов.

Связывание субстрата с активным центром фермента приводит к удалению гидратной оболочки субстрата. В результате удаления молекул воды в активном центре фермента во время катализа создаются совершенно другие условия, чем в растворе. Еще одним важным фактором является стабилизация переход-



ного состояния вследствие взаимодействия между аминокислотными остатками фермента и субстратом. Таким образом, переходное состояние в случае ферментативной- реакции требует меньшей энергии активации.

Большинство ферментов во время катализа переносят специфические группировки с субстрата на субстрат. Особенно часто осуществляется перенос протонов — *кислотно-основный катализ*. Этот ферментативный кислотно-основный катализ значительно более эффективен, чем обмен протонов с кислотами и основаниями- в растворе. Достаточно часто различные химические группировки ковалентно присоединяются к аминокислотным остаткам ферментов — *ковалентный катализ*.

На основе общих закономерностей ферментативного катализа можно рассмотреть механизм действия лактатдегидрогеназы. Активной формой лактатдегидрогеназы является тетрамер. Каждая из четырех субъединиц образована полипептидной цепью из 334 аминокислотных остатков, каждый мономер содержит- активный центр. Коферментом лактатдегидрогеназы является никотинамидадениндинуклеотид (НАД). В окислительно-восстановительных реакциях НАД-кофермента участвует только никотинамидное кольцо. На  $\text{НАД}^+$  переносится- только гидрид-ион ( $\text{H}^-$ , два электрона и один протон). Второй протон высвобождается в среду и, следовательно, правильное наименование восстановленной- формы кофермента  $\text{НАДН} + \text{H}^+$ .

Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует передачу восстановительного эквивалента от лактата на  $\text{НАД}^+$  или от  $\text{НАДН}$  на пируват:



Равновесие реакции смещено в сторону образования лактата. ЛДГ катализирует- реакцию в обоих направлениях, но подобно всем ферментам не влияет на положение химического равновесия.

В активном центре ЛДГ находятся *arg-171*, *arg-109*, *gic-195*. Arg-109, arg-171 протонированы постоянно, а гис-195 меняет свой заряд во время катализа. Положительно заряженная гуанидиновая группировка arg-171 связывается за счет электростатического взаимодействия с карбонильной группой субстрата. Arg-109 стабилизирует переходное состояние. Имидозольная группа гис-195 принимает участие в кислотно-основном катализе.

Кофермент НАДН связывается первым, за ним субстрат. Образование переходного- состояния облегчается вследствие оптимального расположения карбонильной- группы субстрата и никотинамидного кольца кофермента, а также сильно пониженной полярности активного центра фермента. В переходном состоянии гидрид-ион переносится с кофермента на карбонильный углерод субстрата. При этом временно образующийся энергетически невыгодный отрицательный- заряд на кислороде стабилизируется электростатическим взаимодействием- с arg-109. Одновременно осуществляется перенос протона с гис-195 на атом кислорода, приводя к образованию связанных с ферментом

лактата и НАД<sup>+</sup>. Лактат диссоциирует с фермента и временно незаряженная имидозольная- группа гис-195 снова присоединяет протон из окружающей воды. Затем освобождается окисленный кофермент НАД<sup>+</sup>, и снова достигается исходное состояние фермента. При окислении лактата в пируват протекают те же стадии, но в противоположном направлении.

### Работа 13. Изучение действия ферментов

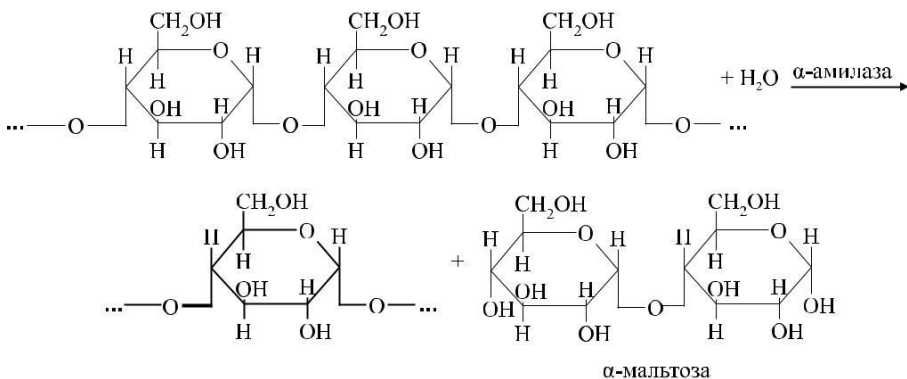
Ферменты в отличие от органических или неорганических веществ присутствуют в клетках в чрезвычайно малых количествах, и определение их содержания в тканевых экстрактах или биологических жидкостях представляет особую проблему.

Чтобы оценить количество фермента, измеряют скорость реакции, пропорциональной количеству присутствующего фермента. Поскольку трудно определить число молекул фермента, количественно определяют либо субстрат, либо продукт. Единицы активности фермента выражают в микромолях, наномолях, пикомолях израсходованного субстрата или образовавшегося продукта за единицу времени (в минуту).

Чтобы качественно оценить действие фермента, проводят качественные реакции на субстраты или продукты реакции, кроме того, ферментативный катализ можно оценивать по изменению окраски индикаторов, вносимых в реакционную среду.

#### *Действие α-амилазы (КФ 3.2.1.1)*

α-Амилаза (класс гидролаза, подкласс гликозидаза) катализирует гидролитическое расщепление внутренних α(1-4)-гликозидных связей без какого-либо порядка с образованием вначале олигосахаридов и затем α-мальтозы.



Ферментативный гидролиз крахмала происходит ступенчато через стадии образования декстринов. Наличие и динамику их образования легко устано-

вить, прослеживая изменение окраски с йодом: нерасщепленный крахмал дает с йодом- синее окрашивание, амилодекстрины — фиолетовое, эритродекстрины — красно-бурое, ахродекстрины и мальтоза — желтое.

*Крахмал + H<sub>2</sub>O → амилодекстрины → эритродекстрины → ахродекстрины → мальтоза.*

В природе найдены различные амилазы: α-амилазы, β-амилазы и γ-амилазы (глюкоамилазы), которые различаются по своим свойствам, распространению в природе и способу действия на крахмал.

α-Амилаза содержится в слюне, соке поджелудочной железы, проросших семенах- злаков, в плесневых грибах и бактериях, α-амилаза является эндоами-лазой, главным конечным продуктом является α-мальтоза.

β-Амилаза содержится в непроросших семенах пшеницы, ржи, ячменя, β-амилаза ускоряет реакции гидролиза амилозы, амилопектина, гликогена с нередуцирующего- конца, отщепляя остатки мальтозы. Конечным продуктом на 100% является β-мальтоза.

γ-Амилаза содержится в плесневых грибах. Глюкоамилаза (γ-амилаза) ускоряет- гидролиз α(1-4)-гликозидных связей в молекуле крахмала, олигосахаридов и даже мальтозы с нередуцирующего конца с образованием α-глюкозы.

Характерной особенностью амилаз является отсутствие абсолютной специфичности- действия. При их участии гидролизуются различные соединения: амилоза-, амилопектин, гликоген, олигосахариды и родственные им вещества, построенные- из остатков α-D-глюкопиранозы и содержащие α(1-4)-гликозидные связи.

Активные центры амилаз образованы радикалами гистидина, тирозина и дикарбоновых аминокислот (асп, глу).

В лабораторной практике удобно работать с α-амилазой, выделенной из слюны.

### **Реактивы и оборудование:**

*Крахмал (1%), йод (1% раствор в 3% растворе йодида калия), гидро- ксид натрия (10%), сульфат меди (5%), дистиллированная вода. Стаканы на 100 мл, мерные цилиндры на 50 мл, стеклянные воронки, вата, пипетки на 1 и 2 мл, стеклянные пластинки и палочки, пробирки.*

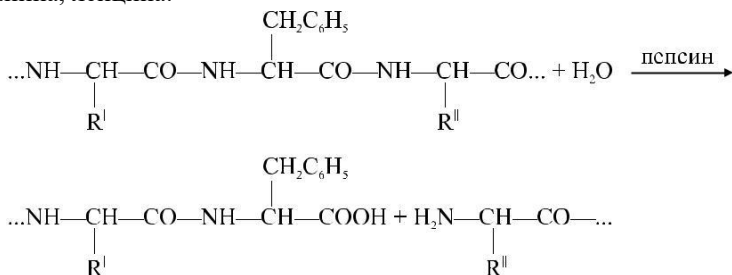
**Ход работы:** А. Приготовление препарата амилазы. Рот ополаскивают 2–3 раза водой. Отмеряют 50 мл дистиллированной воды и ополаскивают ею рот в течение 3–5 минут в несколько приемов. Собранную жидкость фильтруют через вату и фильтрат используют в качестве источника фермента.

Б. В две пробирки наливают по 2 мл 1% раствора крахмала. В первую пробирку добавляют 1 мл раствора слюны, во вторую — 1 мл дистиллированной воды (контроль). Содержимое пробирок перемешивают и помещают в термостат при 37 °С. Через одну минуту из каждой пробирки отбирают по 1 капле жидкости и смешивают на стеклянной пластинке с каплей йода. Повторяют взятие

проб через каждые 2 минуты и по окраске йодных проб делают вывод о гидролизе крахмала. Присутствие в гидролизате мальтозы и глюкозы устанавливают с помощью реакции Троммера (или Фелинговым реактивом), в основе которой лежит окислительно-восстановительная реакция. В пробирку наливают 1–2 мл гидролизата и равный объем 10% раствора гидроксида натрия. Затем по каплям при встряхивании прибавляют 5% раствор сульфата меди до появления не исчезающей мути гидроксида меди (II). Осторожно нагревают верхнюю часть содержимого пробирки, появляется желтое окрашивание, переходящее в красное, что указывает на положительную реакцию Троммера. О действии фермента судят по исчезновению субстрата или появлению продуктов реакции.

#### *Действие пепсина (КФ 3.4.23.1)*

Пепсин (класс гидролаза, подкласс пептидаза) ускоряет гидролитическое расщепление пептидных связей, образованных карбоксильными группами фенилаланина, лейцина:



Пепсин — эндопептидаза, т. е. ускоряет гидролиз внутренних пептидных связей белка с образованием полипептидов. В активном центре фермента находятся радикалы-дикарбоновых кислот. Пепсин содержится в желудочном соке животных и человека в неактивной форме (пепсиноген) и активируется в присутствии соляной кислоты по механизму аутокаталитического действия самого пепсина. Оптимальным-условием действия пепсина является pH 0,9–1. Если секреция HCl не обеспечивает-такой кислотности, гидролиз белков резко ухудшается.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Яичный белок, пепсин (или желудочный сок), 1 М соляная кислота. Стекло-вые трубки диаметром 2–3 мм, водяная баня.*

**Ход работы:** Две стеклянные трубки наполняют яичным белком и под-огревают (около 85 °С) до осаждения белка. Затем одну трубку опускают в рас-твор пепсина (желудочный сок), другую — в 1 М раствор соляной кислоты. Через некоторое время в первой трубке белок начинает растворяться, а в другой- не изменяется. Отмечают по секундомеру время реакции гидролиза белка.

### *Действие уреазы (КФ 3.5.1.5)*

Уреаза (класс гидролаза, подкласс амидгидролаза) обладает абсолютной субстратной специфичностью действия и ускоряет расщепление амидной связи только мочевины с образованием углекислого газа и аммиака:



Уреаза (карбамидгидролаза) — один из первых ферментов, полученных в кристаллическом- виде. Это однокомпонентный фермент, молекула его глобулярна, состоит из восьми равных субъединиц. О действии уреазы судят по смещению рН раствора в щелочную зону за счет образовавшегося аммиака.

#### **Реактивы и оборудование:**

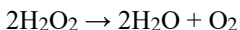
*Соевая мука, 0,1 М соляная кислота, толуол, дистиллированная вода, моче- вина (5%), фенолфталеин (1% спиртовой раствор). Пробирки, пипетки на 1 мл, стаканы, воронки, марля (фильтр).*

**Ход работы:** А. Приготовление препарата уреазы. К 8 г соевой муки прибавляют 46 мл дистиллированной воды, 2 мл 0,1 М раствора соляной кислоты перемешивают, вносят несколько капель толуола и оставляют на ночь, после чего- отфильтровывают.

Б. В две пробирки наливают по 1 мл 5% раствора мочевины и по 5 капель 1% спиртового раствора фенолфталеина. В одну из пробирок добавляют 5 мл препарата уреазы, в другую дистиллированную воду и перемешивают. Через некоторое время наблюдают в одной из пробирок (с уреазой) окрашивание в розовый- цвет.

### *Действие каталазы (КФ 1.11.1.6)*

Каталаза (класс оксидоредуктаза, подкласс пероксидаза) ускоряет реакцию расщепления пероксида водорода:



В этой реакции одна молекула пероксида водорода окисляется и служит донором- электронов, а другая восстанавливается и является акцептором электронов-. Процесс передачи электронов при окислении и восстановлении пероксида водорода осуществляется железом, входящим в геминую группировку каталазы. Каталаза — фермент двухкомпонентный, содержащий четыре гемовых группы, близких к гему гемоглобина. Биологическая роль каталазы заключается в предохранении организма от токсического действия пероксида водорода, образующегося вследствие процессов окисления. Каталаза широко распространена в растительном и животном мире. Особенно много ее содержится в эритроцитах крови и в тканях печени.

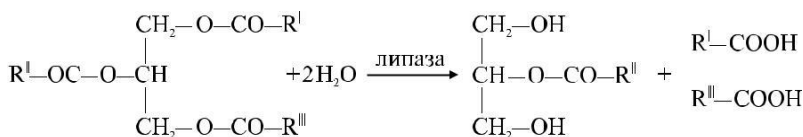
#### **Реактивы и оборудование:**

*Кровь, 3% свежеприготовленный раствор пероксида водорода, дистиллированная вода. Пробирки, секундомер.*

**Ход работы:** В две пробирки наливают по 5 мл 3% свежеприготовленного раствора пероксида водорода. В одну из пробирок добавляют 0,5 мл свежей крови и перемешивают, в другую — 0,5 мл H<sub>2</sub>O (дистиллированной). В пробирке с кровью появляются пузырьки. В пробирке без каталазы пузырьки газа не образуются. По секундомеру отмечают время протекания реакции (по выделению пузырьков кислорода).

#### *Действие липазы (КФ 3.1.1.3)*

Триацилглицеринлипаза (класс гидролаза, подкласс эстераза) ускоряет гидролиз триглицеридов (жиров) ступенчато, вначале быстро гидролизуются внешние сложноэфирные связи, а затем медленно идет гидролиз 2-моноглицерида.



Липазы широко распространены в растениях (семена, вегетативные органы), микроорганизмах, животных.

В активном центре панкреатической липазы находятся аминокислотные остатки: *гис*, *сер*, *иле*, *асп*, *глу*. Как и в случае других гидролаз *гис* служит для переноса- протонов, а *сер* для ацептирования ацильной группы, *иле* взаимодействует с углеводородным радикалом остатка высшей жирной кислоты и способствует- закреплению молекулы триглицерида в активном центре фермента. Активность- липаз регулируется путем их фосфорилирования — дефос-форилирования.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Препарат липазы (вытяжка из поджелудочной железы или 5–7% раствор панкреатина), растительное масло, гидрокарбонат натрия (1%), фенолфталеин- (1% спиртовой раствор). Пробирки, пипетки, термостат.*

**Ход работы:** В две пробирки вливают по 1 мл подсолнечного масла, 4 мл дистиллированной воды, 5 мл гидрокарбоната натрия и энергично встряхивают до образования эмульсии. Липаза ускоряет гидролиз только эмульгированных жиров. После эмульгирования прибавляют 5 капель фенолфталеина, затем в одну- из пробирок вливают 1 мл препарата липазы, перемешивают и помещают пробирки в термостат при 38 °С. Через некоторое время, в зависимости от активности- фермента, раствор в пробирке с липазой становится бесцветным, вследствие образования жирных кислот, а в пробирке без липазы розовая окраска не исчезает.

## **Работа 14. Изучение влияния различных факторов на скорость ферментативных реакций**

Скорость ферментативных реакций зависит от многих факторов: концентрации субстрата, концентрации фермента, рН среды, температуры, наличия активаторов и ингибиторов.

### *Влияние температуры на активность амилазы слюны*

Одним из характерных свойств ферментов является термоллабильность, т. е. чувствительность фермента к температуре, при которой протекает ферментативная реакция.

В некотором ограниченном интервале температуры скорость ферментативной реакции повышается с ростом температуры. Коэффициент, показывающий, во сколько раз повышается скорость реакции при повышении температуры на 10 °С, называется температурным коэффициентом. Для многих биохимических реакций при повышении температуры на 10 °С скорость удваивается и аналогично при понижении температуры на 10 °С уменьшается вдвое. Для большинства ферментов максимальная ферментативная скорость наблюдается при 38–40 °С. Эта температура называется температурным оптимумом. При дальнейшем повышении температуры происходит разрыв связей, поддерживающих вторичную и третичную структуру, т. е. происходит тепловая денатурация, сопровождающаяся потерей каталитической активности. Скорость расщепления крахмала под влиянием амилазы определяют по окрашиванию раствора крахмала и продуктов его гидролиза йодом.

### **Реактивы и оборудование:**

*Крахмал (1%), йод (7% раствор в 3% растворе йодида калия), препарат слюны, лед. Стеклянные пробирки, пластинки, палочки, пипетки на 1 и 5 мл, термостат, большие стаканы для льда, штативы для пробирок.*

**Ход работы:** В четыре пробирки наливают по 5 мл 1% раствора крахмала. Первую пробирку помещают в термостат при 100 °С, вторую — в термостат при 40 °С, третью — в лед, четвертую оставляют при комнатной температуре. Через 10 минут во все пробирки (оставляя их в тех же условиях) прибавляют по 1 мл раствора слюны и перемешивают стеклянной палочкой. Через 1 минуту из всех пробирок отбирают по одной капле и проводят на стеклянных пластинах йодные пробы. Отбор проб проводят через каждые 2 минуты. По изменению окрашивания йодных проб судят о степени гидролиза в каждой пробирке. Результаты опыта заносят в таблицу 9, пометчая буквой «С» (синяя окраска), буквой «К» (окраска красных тонов), буквой «Ж» (желтая окраска).

На основании опытных данных делают вывод о величине температурного оптимума для амилазы слюны, полученные результаты выражают графически, откладывая на оси абсцисс температуру в градусах Цельсия, а на оси ординат скорость реакции в обратных минутах.

Таблица 9. Результаты наблюдений

| № пробирок | Температура (°C) | Йодная проба (время указывается в минутах) |   |   |   |   |    |    |
|------------|------------------|--|---|---|---|---|----|----|
|            |                  | 1  | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 |
| 1          | 100              |  |   |   |   |   |    |    |
| 2          | 40               |  |   |   |   |   |    |    |
| 3          | 20               |  |   |   |   |   |    |    |
| 4          | 0                |  |   |   |   |   |    |    |

*Влияние рН на активность амилазы*

Для разных ферментов существует свой оптимум рН, при котором фермент наиболее активен. Например, для ферментов желудочного сока оптимум рН 1–2, для ферментов двенадцатиперстной кишки рН 7,7, для ферментов печени рН 9,5 и т. д. Большинство ферментов имеют максимальную активность в зоне рН ближе к нейтральной.

Зависимость активности фермента от рН определяется следующими факторами: во-первых, денатурацией фермента при очень высоких или низких значениях рН; во-вторых, изменением величины заряда молекул субстрата или фермента; в-третьих, конформационными изменениями фермента. Для поддержания активной третичной структуры может оказаться необходимым присутствие заряда на определенной группе, если заряд этой группы изменится, то может произойти частичное разворачивание белковой цепи или, наоборот, компактизация молекулы, или ее диссоциация на протамеры и во всех случаях с потерей активности. Оптимум рН для амилазы слюны можно определить при взаимодействии ее с крахмалом при различных значениях рН среды. Для амилазы слюны оптимум рН 6,8, а в кислой или щелочной среде активность амилазы снижается.

**Реактивы и оборудование:**

*Препарат слюны, 0,2 М раствор гидроортофосфата натрия, 0,2 М раствор дигидроортофосфата натрия, крахмал (1%), 1% раствор йода в 3% растворе йодида калия. Штатив с набором стеклянных пробирок, пипетки на 1 и 5 мл, капельные пипетки, термостат.*

**Ход работы: А.** Пользуясь данными таблицы 10, приготовить в шести пробирках буферные растворы с различными значениями рН.

Таблица 10. Приготовление фосфатных буферных растворов

| рН  | 0,2 М Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>(мл) | 0,2 М NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>(мл) | рН  | 0,2 М Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>(мл) | 0,2 М NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>(мл) |
|-----|--|--|-----|--|--|
| 5,8 | 0,40   | 4,60   | 7,2 | 3,60   | 1,40   |
| 6,2 | 0,92   | 4,08   | 7,6 | 4,35   | 0,65   |
| 6,8 | 2,45   | 2,55   | 8,0 | 4,73   | 0,27   |



**Б.** Затем приливают в каждую пробирку по 5 мл 1% раствора крахмала и по 1 мл раствора слюны, тщательно перемешивают содержимое пробирок. Пробирки помещают в термостат при 38 °С на 10 минут. После инкубации во все пробирки добавляют по 5 капель раствора йода, перемешивают, наблюдают окраску и отмечают активность. Для наглядности в каждую пробирку можно добавить немного дистиллированной воды и размешать. На основании опытных данных делают вывод о рН-оптимуме амилазы слюны.

#### *Влияние активаторов и ингибиторов на активность амилазы*

Активаторы и ингибиторы влияют на активный центр фермента, способствуют образованию его или блокированию. Активаторы и ингибиторы могут взаимодействовать с аллостерическим центром фермента и тем самым изменять его каталитическую активность. Например, сульфат меди оказывает тормозящее действие на активность амилазы, а хлорид натрия является ее активатором. О влиянии этих веществ на активность амилазы судят по степени гидролиза крахмала под влиянием фермента в присутствии хлорида натрия и сульфата меди.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Хлорид натрия (1%), сульфат меди (1%), препарат слюны, крахмал (0,5%), 1% раствор йода в 3% растворе йодида калия. Штатив с пробирками, пипет-ки на 1, 2, 5 мл, термостат.*

**Ход работы:** Готовят три пробирки. В первую наливают 2,5 мл воды, во вторую — 2 мл воды и 0,5 мл 1% раствора хлорида натрия, в третью — 2 мл воды и 0,5 мл 1% раствора сульфата меди. Во все пробирки вносят по 2,5 мл раствора слюны, перемешивают и добавляют по 2,5 мл 0,5% раствора крахмала, перемешивают и помещают в термостат при 38 °С. Через 5 минут во все пробирки прибавляют по 5 капель раствора йода, наблюдают окраску и определяют, каким образом изменяют активность амилазы хлорид натрия и сульфат меди.

#### **Работа 15. Специфичность действия ферментов**

Способность фермента катализировать одну и только одну специфическую реакцию является наиболее важным его свойством. Благодаря этому скорости метаболических процессов могут регулироваться путем изменения каталитической активности ферментов. Многие ферменты катализируют реакции одного типа (перенос фосфата, окислительно-восстановительные реакции и т. д.), субстратами при этом являются структурно сходные соединения. Реакции с альтернативными субстратами происходят в тех случаях, когда эти субстраты присутствуют в высоких концентрациях. Таким образом, понятие специфичности относится и к типам каталитических реакций (реакционная специфичность), и к природе субстратов (субстратная специфичность).

В общем случае ферменты действуют на специфические химические группировки, например, гликозидазы катализируют гидролиз гликозидных связей, они высокоспецифичны как к сахарному фрагменту, так и к характеру гликозидной связи ( $\alpha$  или  $\beta$ ). Протеолитические ферменты катализируют гидролиз пептидных связей. Действие этих ферментов распространяется на большое число субстратов, что позволяет организму обойтись небольшим числом пищеварительных ферментов. Однако отдельные пептидазы отличаются высокой групповой специфичностью, так, например, химотрипсин гидролизует преимущественно те пептидные связи, в которых карбоксильная группа принадлежит ароматическим аминокислотам (фен, три, тир).

Некоторые ферменты обладают абсолютной реакционной и субстратной специфичностью, так, например, уреазы катализируют только гидролиз мочевины. Однако таких ферментов немного. Большая часть ферментов обладает абсолютной оптической специфичностью (кроме эпимераз). Так, например, ферменты гликолитического и прямого окислительного пути углеводов катализируют превращения только D-, но не L-фосфосахаров, ферменты белкового обмена (в организме человека и животных) катализируют превращение только L-изомеров аминокислот.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Дрожжевая сахароза; сахароза (0,5%); 0,1 М фосфатный буфер: к 61,0 мл 0,2 М раствора  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  приливают 39 мл 0,2 М раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и доводят объем дистиллированной водой до 200 мл; препарат слюны; крахмал (0,5%); 1% раствор йода в 3% растворе йодида калия, реактив Фелинга: готовят два раствора. А. 134,6 г медного купороса в 500 мл раствора. Б. 173 г сегнетовой соли и 70 г гидроксида натрия в 500 мл раствора. Растворы хранят отдельно. Перед употреблением смешивают равные объемы растворов А и Б; препарат уреазы (см. работу 13); мочевины (5%); тиомочевина; 1% спиртовой раствор фенолфталеина. Стеклоянные стаканы, воронки, мерные цилиндры на 20 мл, штативы с пробирками, пипетки на 1 и 5 мл, бумажные фильтры, фарфоровые ступки с пестиком, кварцевый песок, термостат, спиртовки.*

#### *Специфичность действия сахаразы и амилазы*

Сахараза и амилаза — ферменты, относящиеся к классу гидролаз, подклассу гликозидаз, т. е. ускоряют реакции гидролитического расщепления сахаров. Гликозидазы высокоспецифичны как к сахарному фрагменту, так и к характеру гликозидной связи  $\alpha$  или  $\beta$ . Таким образом, гликозидазы обладают ярко выраженной пространственной специфичностью. Сахараза относится к  $\beta$ -гликозидазам и способна ускорять разрыв  $\beta$ -гликозидных связей в олигосахарах, амилаза — к  $\alpha$ -гликозидазам и расщепляет  $\alpha$ -гликозидные связи в полисахаридах.

**Ход работы: А.** Приготовление препарата сахаразы. 2 г прессованных или высушенных на воздухе дрожжей растирают в течение 20 минут с 4 г кварцевого песка и 5 мл фосфатного буфера (0,1 М, рН 7,0), затем добавляют 20 мл буфера-, нагретого до 60 °С. Через 30 минут фильтруют через складчатый бумажный-фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным, для чего первые порции мутного-фильтрата снова выливают в воронку для фильтрования.

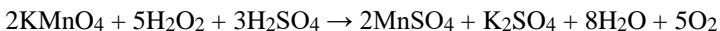
**Б.** В две пробирки наливают по 3 мл 0,5% раствора крахмала и прибавляют в первую пробирку 1 мл раствора слюны (амилаза), во вторую — 1 мл препарата сахаразы, перемешивают и ставят в термостат при температуре 38 °С. В две другие- пробирки наливают по 3 мл 0,5% раствора сахарозы и в первую пробирку 1 мл препарата сахаразы, во вторую — 1 мл раствора слюны и помещают в термостат- при 38 °С. Через 5 минут в первые две пробирки с крахма-лом добавляют по 5 капель раствора йода. В пробирке с амилазой наблюдают красно-бурое или желтое окрашивание, в другой пробирке — синее окрашивание. В пробирке с раствором сахарозы действие фермента обнаруживают с помощью реактива Фелинга. В пробирки прибавляют по 1 мл реактива Фелинга и нагревают до кипения-. Сахароза не обладает восстановительными свойствами, и поэтому в пробирке с амилазой изменения окраски не наблюдается. В пробирке с сахарозой (β-гликозидазой) произошло расщепление сахарозы и наблюдается красное окрашивание-. По результатам опыта делают вывод о специфичности амилазы и сахаразы.

#### *Специфичность действия уреазы*

Уреаза — фермент, относящийся к классу гидролаз, подклассу амидаз, т. е. ускоряет гидролиз амидных связей. Уреаза обладает абсолютной специфичностью и способна гидролитически расщеплять амидные связи только в моче-вине ( $\text{NH}_2\text{—CO—NH}_2$ ), незначительные изменения в структуре субстрата ( $\text{NH}_2\text{—CS—NH}_2$ ) приводят к тому, что фермент не оказывает действия на этот субстрат.

**Ход работы:** В две пробирки наливают по 5 мл препарата уреазы и по 5 капель- раствора фенолфталеина. В одну из них добавляют 1 мл 5% раствора мочевины-, а в другую — 1 мл 5% раствора тиомочевины. Обе пробирки оставляют на 20 минут при комнатной температуре. Содержимое пробирки с мочевиной окрашивается в розовый цвет вследствие образования аммиака при расщеплении- мочевины. Тиомочевина под действием уреазы не расщепляется, поэтому раствор во второй пробирке не окрашивается. По результатам опыта делают вывод о специфичности действия уреазы.

Метод основан на определении количества пероксида водорода, оставшегося после действия на него каталазы, титрованием раствора перманганата калия в кислой среде. Реакция протекает по уравнению:



1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия соответствует 1,7 мг пероксида водорода.

### Реактивы и оборудование:

*Свежий растительный материал (морковь или картофель), перманганат калия (0,1 н.), пероксид водорода (0,1 н.), серная кислота (10%), карбонат кальция-. Бюретки для титрования на 50 мл, пипетки на 5, 20, 25 мл, мерные цилиндры- на 10 и 25 мл, колбы мерные на 100 мл, колбы конические на 200 мл, фарфоровые- ступки с пестиком, кварцевый песок.*

**Ход работы:** 1. Приготовление препарата каталазы. 2 г сырого картофеля (или моркови) растирают с кварцевым песком в ступке, постепенно добавляя 2–3 мл воды. Для уменьшения кислой реакции на кончике шпателя добавляют карбонат кальция до прекращения выделения пузырьков углекислого газа. Растертую- массу количественно переносят в мерную колбу и доводят водой до 100 мл. Смесь оставляют на 30 минут, после чего фильтруют.

2. Ферментативный катализ. В две конические колбы помещают по 25 мл 0,1 н. раствора пероксида водорода, затем в первую добавляют 20 мл вытяжки фермента (опыт), во вторую — 20 мл инактивированного ферментативного раствора- (контроль). Для чего вытяжку каталазы кипятят в течение 5 минут. Обе колбы оставляют на 30 минут при комнатной температуре.

3. Титрование. По истечении времени инкубации приливают в обе колбы по 5 мл 10% раствора серной кислоты и титруют содержимое колб 0,1 н. раствором перманганата калия до образования устойчивого в течение 1 минуты розового окрашивания. Отмечают количество перманганата калия, пошедшего на титрование оставшегося пероксида водорода в опытной и контрольной пробках.

4. Расчет. По результатам эксперимента проводят расчет. По разности между контрольным ( $V$ , мл) и опытным ( $V$ , мл) титрованием находят количество перманганата калия, эквивалентное количеству разложенного ферментом пероксида водорода. Количество разложенного пероксида водорода ( $C$ ) находят умножением полученной цифры на 1,7 мг (см. уравнение).

Далее по количеству разложившегося пероксида водорода определяют активность, рассуждая следующим образом. В 1 г картофеля (или моркови) содержится количество каталазы, способное за 30 минут разложить:  $C \times 100 / 20 \times 2$  пероксида водорода, где  $C$  — количество разложившегося пероксида водорода (мг); 100 мл — объем приготовленной вытяжки фермента, 20 мл — объем вытяжки фермента, взятой для реакции, 2 г — количество биоматериала. Затем полученную цифру делят на 30 и находят количество разложившегося пероксида водорода- за 1 минуту (мг/мин). Поскольку активность фермента определяют, как правило, в мкмоль, то полученную величину делят на 0,034 мг и получают активность- каталазы в мкмоль/мин.

## Вопросы и задания для самопроверки

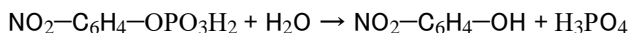
---

1. Дайте определение ферментам. Каковы отличия ферментов от небелковых катализаторов?
2. Что следует понимать под терминами апофермент, простетическая группа, кофермент, холофермент? Приведите примеры однокомпонентных и двухкомпонентных ферментов.
3. Дайте понятие об активном центре фермента. Какие вещества, атомы формируют активный центр двухкомпонентных ферментов? Напишите структурные формулы некоторых из них. Радикалы каких аминокислот формируют активный центр однокомпонентных ферментов?
4. Что следует понимать под механизмом действия ферментов? Рассмотрите механизм действия ацетилхолинэстеразы, амилазы, химотрипсина, лактатдегидрогеназы.
5. Перечислите факторы, влияющие на скорость ферментативной реакции.
6. Дайте определения понятиям: оптимум температуры, оптимум pH, активаторы-, ингибиторы.
7. Что понимают под специфичностью действия ферментов? Приведите примеры.
8. По каким признакам можно судить о действии фермента?
9. На чем основаны методы количественного определения активности ферментов-?
10. Что принимают за единицу активности фермента?
11. На чем основаны принципы классификации ферментов? На основании каких критериев делят классы ферментов на подклассы?
12. Какие принципы положены в основу номенклатуры ферментов? Каков смысл четырех чисел, составляющих классификационный номер (шифр) каждого- фермента?
13. Какие процессы катализируют в организме ферменты класса оксидоредуктаз? Приведите примеры. Напишите уравнения реакций.
14. Как называются ферменты, катализирующие реакцию дегидрирования? Какова- химическая природа этих ферментов? Назовите их коферменты и напишите- их структурные формулы.
15. Какова классификация и биологическая роль цитохромов? В какой последовательности располагаются цитохромы в митохондриальной цепи?
16. Какие подклассы входят в состав класса трансфераз? Перечислите важнейшие коферменты трансфераз и напишите уравнения реакций, катализируемых этими ферментами.
17. Каков механизм реакции переаминирования с участием пиридоксальфосфата в качестве кофермента?

18. Какие ферменты относятся к классу: а) гидролаз, б) лиаз, в) изомераз, г) синтетаз? На основании каких критериев делят на подклассы каждый из указанных – выше классов ферментов? Приведите примеры, напишите уравнения реакции.
19. Какова классификация протеолитических ферментов в соответствии с механизмом – их каталитического действия и строением активного центра?
20. Какова специфичность действия на пептидные связи пепсина, трипсина, химотрипсина?
21. Напишите уравнения реакций с использованием структурных формул всех компонентов. Определите класс, подкласс, назовите ферменты, катализирующие нижеприведенные превращения:
- а) крахмал + вода  $\rightarrow$   $\alpha$ -мальтоза б) гликоген + фосфорная кислота  $\rightarrow$  глюкоза-1-фосфат + гликоген (п-1)  
 в) сахароза + вода  $\rightarrow$  глюкоза + фруктоза  
 г) мальтоза + вода  $\rightarrow$  2 глюкоза  
 д) УДФ-глюкоза + фруктоза  $\rightarrow$  сахароза + УДФ  
 е) лизин  $\rightarrow$  кадаверин + CO<sub>2</sub> ж) пируват + НАД+Н<sup>+</sup>  $\rightleftharpoons$  лактат + НАД<sup>+</sup>  
 з) L-глутамат + оксалоацетат  $\rightleftharpoons$  L-аспартат +  $\alpha$ -кетоглутарат  
 и) глутаминовая кислота + NH<sub>3</sub> + АТФ  $\rightarrow$  глутамин + АДФ + H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
22. Напишите уравнения реакций, катализируемых ферментами:
- а) алкоголь: НАД<sup>+</sup> оксидоредуктаза б) лактат: НАД<sup>+</sup> оксидоредуктаза в) оксалоацетат: С-С-лиаза г) ацетилхолин: ацетилгидролаза

д) D-глюкоза-6-фосфат: фосфогидролаза

23. При определении активности кислой фосфатазы измеряют количество пара-нитрофенола, образующегося при гидролизе пара-нитрофенил-фосфата:



Рассчитайте активность кислой фосфатазы в исходном экстракте, если известно, что в результате образовалось 214 мкмоль п-нитрофенола, а инкубацию вели с 1 мл разведенного в 100 раз экстракта фермента в течение 30 минут при температуре 37° С.

24. Рассчитайте активность каталитических центров каталазы, лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы (молекулярная активность их, соответственно, равна  $5 \cdot 10^6$ ,  $3,7 \cdot 10^4$ ,  $2,7 \cdot 10^4$ ), если известно, что число их у первых двух ферментов – равно четырем, а у последнего – двум.
25. Рассчитайте концентрацию меди (%) в медьсодержащем ферменте аскорбатоксидазе (M 150000), если каждая молекула содержит 6 атомов меди.

### ГЛАВА 3. ВИТАМИНЫ

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.

Таблица 11. Содержание витаминов в некоторых продуктах (в мг/100 г продукта)

| Продукты                          | С    | В <sub>1</sub> | В <sub>2</sub> | В <sub>6</sub> | РР   | А    | Е     | Д   | Фолиевая кислота (мкг) |
|-----------------------------------|------|----------------|----------------|----------------|------|------|-------|-----|------------------------|
| Шиповник                          | 200  | 0,15           | 0,84           | —              | 1,5  | —    | —     | —   | —                      |
| Черная смородина                  | 200  | 0,02           | 0,02           | 0,13           | 0,3  | —    | —     | —   | 5,0                    |
| Апельсины                         | 60   | 0,04           | 0,03           | 0,06           | 0,20 | —    | —     | —   | 5,0                    |
| Облепиха                          | 200  | 0,10           | 0,05           | 0,11           | 0,60 | —    | 10,30 | —   | 9,0                    |
| Капуста белокочанная              | 50   | 0,06           | 0,05           | 0,14           | 0,40 | —    | —     | —   | 10,0                   |
| Лук зеленый                       | 30   | 0,02           | 0,10           | 0,15           | 0,30 | —    | —     | —   | 18,0                   |
| Свекла                            | 10   | 0,02           | 0,04           | 0,07           | 0,20 | —    | —     | —   | 13,0                   |
| Соя                               | 0    | 0,94           | 0,32           | 0,85           | 2,20 | —    | 17,3  | —   | 20,0                   |
| Горох                             | 0    | 0,81           | 0,15           | 0,27           | 2,2  | —    | 9,1   | —   | 16,0                   |
| Пшено                             | —    | 0,02           | 0,04           | 0,52           | 1,15 | —    | —     | —   | 40,0                   |
| Крупа гречневая                   | —    | 0,53           | 0,20           | 0,40           | 4,19 | —    | —     | —   | 32,0                   |
| Хлеб пшеничный                    | —    | 0,21           | 0,2            | 0,3            | 2,81 | —    | —     | —   | 32,0                   |
| Печень говяжья                    | 33   | 0,3            | 2,19           | 0,70           | 0,8  | 3,38 | 1,28  | —   | 240                    |
| Куры                              | —    | 0,07           | 0,15           | 0,61           | 3,60 | —    | —     | —   | 5,8                    |
| Творог жирный                     | 0,5  | 0,05           | 0,3            | 0,11           | 0,3  | —    | —     | —   | 35                     |
| Сыры твердые                      | 1,5  | 0,05           | 0,5            | —              | 0,2  | —    | —     | —   | 10–45                  |
| Яйца куриные                      | 0,35 | —              | —              | —              | —    | —    | —     | 4,7 | —                      |
| Масло сливочное                   | 0,50 | —              | —              | —              | —    | —    | —     | —   | —                      |
| Масло подсолнечное рафинированное | —    | —              | —              | —              | —    | —    | 67,0  | —   | —                      |
| Дрожжи прессованные               | —    | 0,60           | 0,68           | 0,58           | 11,4 | —    | —     | —   | 550                    |
| Чай черный                        | 10   | 0,07           | 1,0            | 8,0            | —    | —    | —     | —   | —                      |
| Кофе растворимый                  | —    | —              | 1,0            | —              | 24   | —    | —     | —   | —                      |

Суточная потребность в витаминах зависит от типа вещества, также от возраста, пола, состояния организма (период беременности, кормления ребенка, физические нагрузки). При нормальном питании суточная потребность организма в витаминах удовлетворяется полностью. Недостаточное и неполноценное питание (несбалансированная диета у пожилых людей, недостаточное

питание у неимущих людей, потребление полуфабрикатов) или нарушение процессов усвоения и использования витаминов могут быть причиной различных форм витаминной недостаточности, вплоть до авитаминозов.

Важная роль в обеспечении организма рядом витаминов (К, В<sub>12</sub>, Н) принадлежит микрофлоре пищеварительного тракта. Поэтому дефицит витаминов может- возникать вследствие медикаментозного лечения с использованием антибиотиков- . Витаминная недостаточность излечивается посредством полноценного- питания или с помощью витаминных препаратов. Явление гипервитаминоза касается лишь витаминов А и D. Избыточное количество других витаминов быстро выводится из организма с мочой.

Витамины были открыты в 1880 г. Н. И. Луниным, который считал их «необ- ходимым дополнительным фактором питания». В 1912 г. К. Функ предложил называть эти «дополнительные факторы питания» витаминами, т. е. аминами жизни. В настоящее время известно, что далеко не все из них содержат амино группу и вообще азот, однако термин «витамины» остался и прочно удержива- ется до сих пор.

Благодаря усилиям многих биохимиков и физиологов более чем за столетнюю историю витаминологии выделено около трех десятков витаминов, изучены их состав и строение, физиологическое действие и в подавляющем большинстве случаев осуществлен химический синтез соответствующих пре- паратов.

Современная классификация витаминов не является совершенной: она основана- на физико-химических свойствах (в частности, растворимости). В зависимости- от растворимости различают жирорастворимые и водораствори- мые витамины- . Помимо этих двух главных групп, различают группу разно- образных 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-аминобензой- ная кислота, карнитин, витамин U, комплекс ненасыщенных жирных кислот (витамин F).

В номенклатуре ферментов используют три названия: химическое — в соответствии с химическим строением молекулы, физиологическое — обозначающее основное биологическое свойство или указывающее на способность предотвращения соответствующего заболевания с приставкой «анти» и буквенное — обозначение буквами латинского алфавита, предложенное Мак-Коллумом.

Большинство витаминов является предшественниками коферментов, а не- которые витамины выполняют сигнальные функции.



Таблица 12. Витамины, их суточная потребность для человека, активная форма и биохимическая функция

| Витамин   | Суточная потребность для человека (мг) | Активная форма витамина или кофермент                                     | Биохимическая функция или тип катализируемой реакции  |
|---|--|---|---|
| А, ретинол, антиксерофтальмический                                      | 2,7                                    | Цис-ретиналь  | Зрительный процесс, участие в росте и дифференцировке эпителиальной, нервной, костной тканей                            |
| D, кальциферол, антирахитический  | 0,01–0,025                             | 1,25- диоксихоле- кальциферол   | Основной гормональный регулятор обмена кальция и фосфора в костях   |
| Е, токоферол, антистерильный  | 5,0                                    | Активная форма неизвестна-  | Выполняет функции антиоксиданта-(перенос электронов)  |
| К, филлохинон   | 1,0                                    | Активная форма неизвестна-  | Активирует факторы свертывания крови II, VII, IX, X путем карбоксилирования остатков                                    |
| В <sub>1</sub> , тиамин, антиневритный                                  | 1,2                                    | ТПФ — тиаминпиро- фосфат  | Окислительное декарбоксилирование α-кетокислот и перенос активного- альдегида (транскетолазы)                           |
| В <sub>2</sub> , рибофлавин, витамин роста                              | 1,7                                    | ФАД — флавина- денидинуклеотид<br>ФМН — флавин- мононуклеотид             | Реакции переноса водорода, дыхание-(дегидрогеназы)  |
| В <sub>3</sub> , пантотеновая кислота, антидерматитный                  | 3–5                                    | НС-КоА — кофер- мент А  | Реакции переноса ацильных групп (ациттрансферазы)   |
| В <sub>5</sub> (PP), никотинамид, ниацин, антипеллагрический            | 18                                     | НАД – никотин- амиддинуклеотид<br>НАДФ – никотин- амиддинуклео- тидфосфат | Дыхание, реакции переноса водорода-(дегидрогеназы)  |
| В <sub>6</sub> , пиридоксин, пиридоксаль, пиридоксамин, антидерматитный | 2                                      | ПФ – пиридоксаль- фосфат  | Трансаминирование и декарбоксилирование аминокислот   |
| В <sub>12</sub> , кобаламин, антианемический                            | 0,003                                  | Дезоксиаденозил (или метил-) коба- ламин                                  | Метилирование гомоцистеина в метионин, превращение метилмалонил- КоА в сукцинил-КоА                                     |
| В <sub>с</sub> , фолиевая кислота, антианемический                      | 1–2,2                                  | Тетрагидрофолие- вая кислота  | Реакции переноса одноуглеродных остатков (синтез нуклеотидов)   |
| Н, биотин, антисеборейный   | 0,25                                   | Биоцитин (Е-N – карбоксибиотинил- лизин)                                  | Реакции переноса CO <sub>2</sub> , осуществляемые коферментами карбоксилаз  |
| С, аскорбиновая кислота, антискорбутный                                 | 75                                     | Активная форма неизвестна-  | Выполняет функции антиоксиданта, участвует в биосинтезе коллагена, катаболизме тирозина                                 |
| Р, биофлавоноиды, рутин, капилляр- укрепляющий-                         | 50                                     | Активная форма неизвестна-  | Стабилизирует основную соединительной ткани путем ингибирования талуронидазы: совместно с С в окисл.- восст. процессах- |

## Работа 16. Качественные реакции на витамины

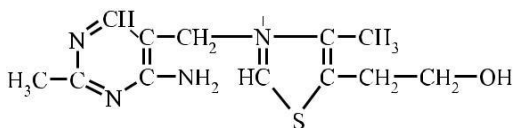
Для обнаружения витаминов в различных веществах или биологических жидкостях и определения их количества существуют качественные реакции, основанные на цветных реакциях, характерных для той или иной группировки, входящей в витамин.

### Реактивы и оборудование:

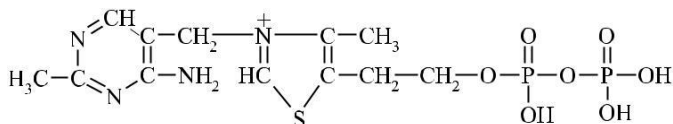
*Витаминные препараты: тиаминхлорид (кристаллический), тиамин (5%), рибофлавин (0,025%), никотиновая кислота (PP), пиридоксин (1%), витамин Р (насыщенный раствор), аскорбиновая кислота (1%), ретинол (0,05% хлороформный-раствор), 0,05% хлороформный раствор витамина D, рыбий жир, 0,1% спиртовой раствор α-токоферола, 0,1% спиртовой раствор витамина К; концентрированные кислоты: азотная, соляная, серная, уксусная; гидроксид калия (30%), гексациано-III-феррат калия (10%), нитрит натрия (5%), металлический-цинк, ацетат меди (5%), гидрокарбонат натрия (10%), гидросульфит натрия (свежеприготовленный 5%), хлорид железа (III) (1%), карбонат натрия- (10%), 0,01% раствор йода в 0,2% растворе йодида калия, трихлоруксусная сурьма (33%), сульфат железа (II), насыщенный ледяной уксусной кислотой, раствор брома в хлороформе (1:60), изобутиловый спирт, соляная кислота- (10%), гидроксид натрия (10%), тетраборат натрия (1%), моча, сульфаниловая кислота (1%), уксусная кислота (10%), метиленовая синь (0,01%), анилин, цистеин (0,025%). Штативы с пробирками, пипетки на 1, 2 мл, термостат, флюорометр.*

### Реакции на витамин В<sub>1</sub>

Тиамин имеет бициклическую природу, состоит из пиридинового и тиазольного кольца:



В животных тканях тиамин (В<sub>1</sub>) присутствует главным образом в виде кофермента — тиаминпирофосфата:



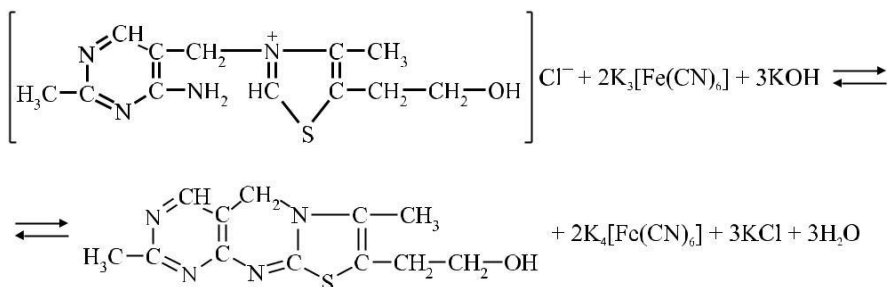
Тиаминпирофосфат является коферментом декарбоксилаз кетокислот. Тиаминпирофосфат катализирует также реакции переноса двухуглеродных фрагментов, будучи коферментом соответствующих ферментов.

Тиамин представляет собой мелкие бесцветные кристаллы горького вкуса, хорошо растворимые в воде. Растворы его в кислой среде устойчивы и выдерживают нагревание до высоких температур. В нейтральной и щелочной среде тиамин быстро разрушается.

При авитаминозе тиамина развивается заболевание, получившее название полиневрит. Кроме человека, заболеванию подвержены птицы, кролики, собаки, крысы, морские свинки и многие другие животные.

#### А. Реакция окисления

В щелочной среде тиамин окисляется под действием гексациано-III-феррата калия в тиохром — пигмент желтого цвета, который в изобутиловом спирте дает интенсивно синюю флюоресценцию:



**Ход работы:** К 2–3 мг тиаминхлорида добавляют 5–10 капель раствора гексациано-III-феррата калия и 2 мл 30% раствора гидроксида калия, содержащее пробирку тщательно перемешивают. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет, вследствие превращения тиамин в тиохром. Затем в пробирку добавляют 1 мл изобутилового спирта и содержимое интенсивно взбалтывают в течение 1 минуты. Прогрев флюорометр в течение 10 минут, наблюдают синюю флюоресценцию при облучении раствора ультрафиолетовыми лучами.

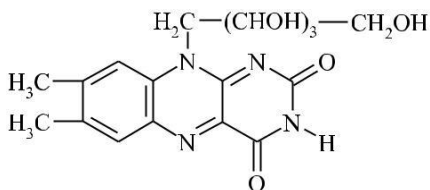
#### Б. Диазореакция

В щелочной среде В<sub>1</sub> с диазореактивом (смесь солянокислого или сернокислого раствора сульфаниловой кислоты с раствором нитрита натрия) образует сложное комплексное соединение оранжевого или красного цвета.

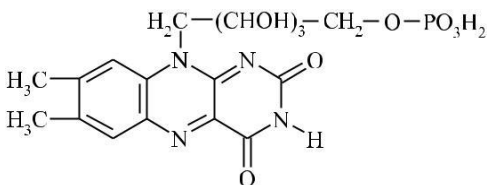
**Ход работы:** В пробирку наливают 1 мл 1% раствора сульфаниловой кислоты, 1 мл 5% раствора нитрита натрия. Образуется диазореактив, к нему добавляют небольшое количество (на кончике скальпеля) порошка тиамин или 0,5 мл 5% раствора его. И по стенке пробирки осторожно добавляют 1 мл раствора карбоната натрия. На границе двух жидкостей появляется кольцо оранжевого или красного цвета.

### Реакция на витамин B<sub>2</sub>

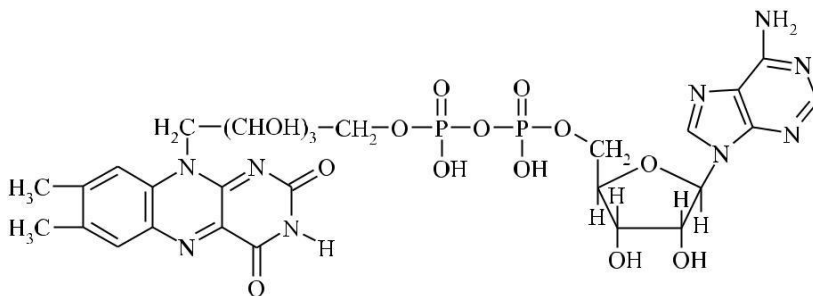
Основу молекулы рибофлавина составляет изоаллоксазин, в котором сочетаются бензольный, пиразинный, пиримидиновый циклы, в положении 9 имеется остаток пятиатомного спирта – рибита:



Рибофлавин входит в состав двух родственных коферментов флавиномононуклеотида (ФМН):



и флавинаденинуклеотида (ФАД):

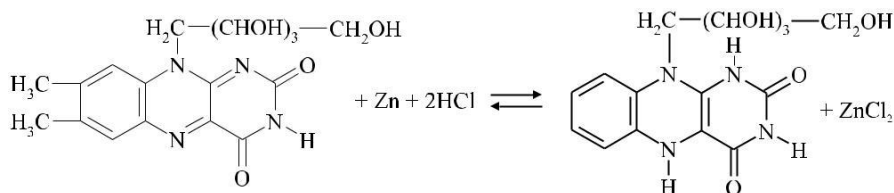


Эти коферменты функционируют в простетических группах ферментов дегидрогеназ. В катализируемых этими ферментами реакциях изоаллоксазино-вое кольцо флавиновых нуклеотидов служит промежуточным переносчиком атомов водорода, отщепляющихся в ходе реакции от молекулы субстрата.

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:



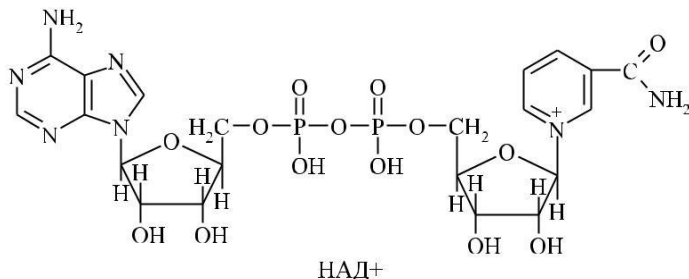
**Ход работы:** В пробирку приливают 1 мл 0,025% раствора рибофлавина, 0,5 мл концентрированной соляной кислоты и опускают кусочек металлического цинка. Выделяющийся водород реагирует с рибофлавином, восстанавливая его, и жидкость постепенно окрашивается в розовый цвет, а затем обесцвечивается. При взбалтывании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

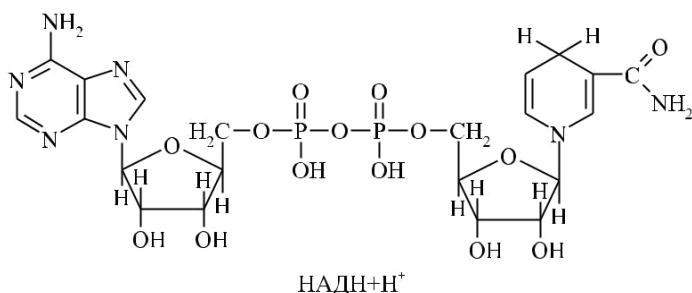
#### Реакции на витамин PP

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:



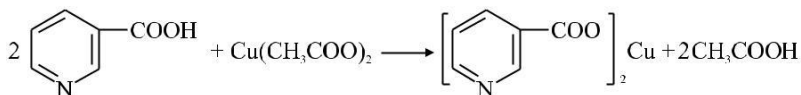


Никотиновая кислота — белое кристаллическое вещество, слабокислого вкуса-, хорошо растворимое в воде, устойчиво, не разрушается при действии обычных химических и физических агентов. Никотиновая кислота является провитамином-, а собственно антипелларгическим действием обладает амид никотиновой- кислоты.

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.

#### *А. Реакция с ацетатом меди*

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



**Ход 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 си-ний осадок- медной соли никотиновой кислоты.

#### *Б. Реакция с гидросульфитом натрия*

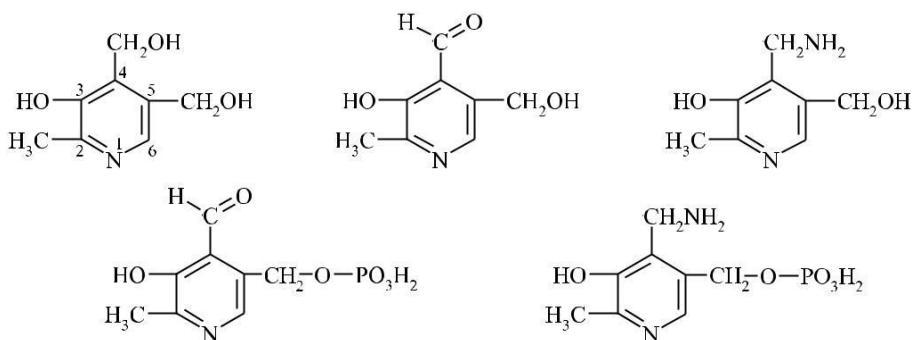
Витамин РР восстанавливается гидросульфитом натрия с образованием соединения желтого цвета.

**Ход 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 окрашивает- ся в желтый цвет.

### 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 В<sub>6</sub> является пиридоксальфосфат и пиридоксаминфосфат.

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

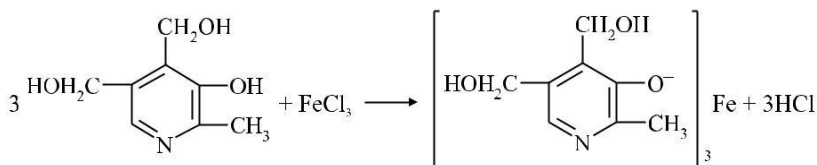


Из трех названных выше веществ, образующих пиридоксиновый комп- лекс, наиболее изучен пиридоксол, который представляет собой бесцветные кристаллы- с температурой плавления 160° С, горькие на вкус, хорошо раство- римые в воде и спирте. Растворы пиридоксола устойчивы к нагреванию с кис- лотами и щелочами,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

Отсутствие в пище витамина В<sub>6</sub> сопровождается резким нарушением об- мена белков, липидов, развивается атеросклероз, различного рода дерматиты, нарушается- кровотворение.

### А. Реакция с хлоридом железа (III)

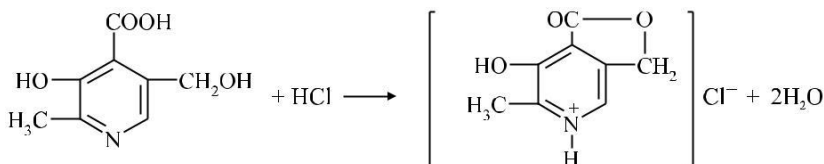
При взаимодействии витамина В<sub>6</sub> с раствором хлорида железа (III) жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования соли типа фенолята железа.



**Ход 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.

### Б. Обнаружение пиридоксидовой кислоты в моче

Витамин В<sub>6</sub> выделяется из организма в виде пиридоксидовой кислоты. Раствор лактона пиридоксидовой кислоты имеет синюю флюоресценцию в ультрафиолетовых лучах.



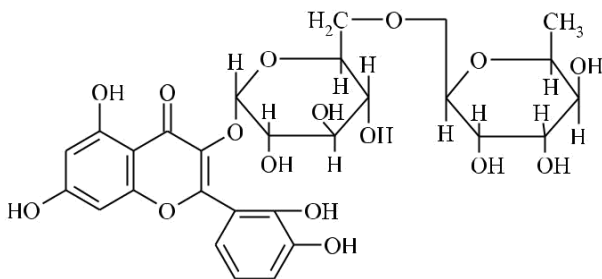
**Ход работы:** В пробирку наливают 0,5 мл мочи и 0,5 мл 10% раствора соляной кислоты, помещают на 20 минут в кипящую водяную баню для образования лактона пиридоксидовой кислоты. Пробирку охлаждают, прибавляют 3 капли 10% раствора гидроксида натрия (рН 9,0) и 1% раствор тетрабората натрия до половины объема пробирки, перемешивают. Наблюдают появление синей флюоресценции в ультрафиолетовых лучах.

### 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.

#### А. Реакция с хлоридом железа (III)

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

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

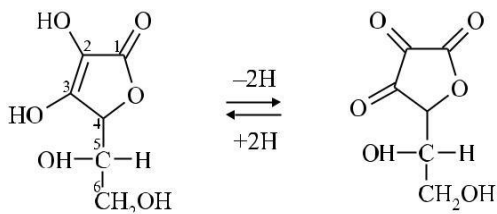
#### Б. Реакция с концентрированной серной кислотой

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

**Ход 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.

#### 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.

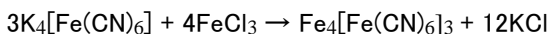
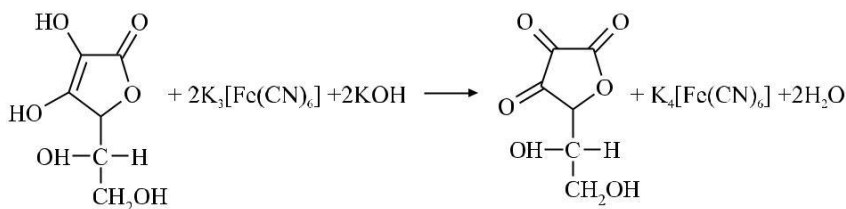
Аскорбиновая кислота содержит два асимметричных атома углерода в 4-м и 5-м положениях, что дает возможность образования четырех оптических изомеров-. Витаминной активностью обладают изомеры, относящиеся к L-ряду.

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 гидроксирования пролина, в результате которой образуется гидроксипролин – основной компонент коллагена.

#### A. Реакция с гексациано-III-ферратом калия

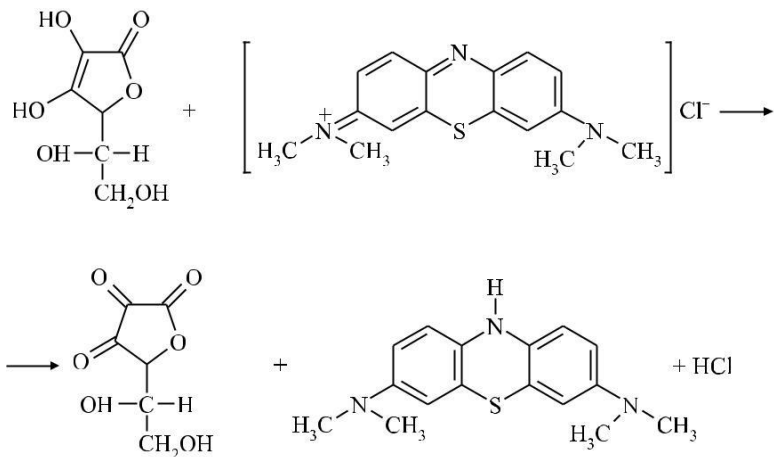
Аскорбиновая кислота легко вступает в окислительно-восстановительные реакции с гексациано-III-ферратом калия, который восстанавливается до гексациано-II-феррата калия, образующий с хлорным железом плохо растворимую в воде соль трехвалентного железа – берлинскую лазурь темно-синего цвета:



**Ход 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.

### Б. Реакция с метиленовой синью

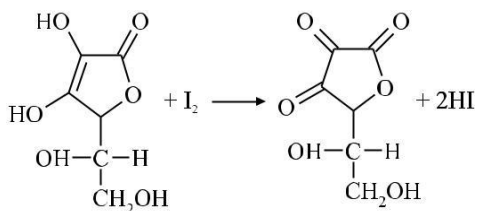
Метиленовая синь в присутствии аскорбиновой кислоты легко переходит в бесцветную лейкоформу:



**Ход работы:** В две пробирки вносят по одной капле 0,01% раствора метиленовой- сини и 10% раствора карбоната натрия. В первую пробирку вно-сят 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 пробир-ке с аскорбиновой- кислотой жидкость обесцвечивается.

### В. Реакция с йодом

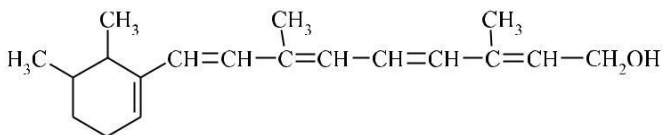
Раствор йода в йодиде калия при добавлении к нему раствора витамина С обесцвечивается за счет восстановления аскорбиновой кислоты йодом:



**Ход работы:** В две пробирки наливают по 10 капель дистиллированной во ды 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.

### Реакции на витамин А

Витамин А имеет несколько витамеров, из которых наиболее распространен витамин А, содержащий  $\beta$ -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 каротиназы 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-ретинале. 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.

#### А. Реакция с трихлоруксусной сурьмой

Хлороформный раствор витамина А (или рыбьего жира) в присутствии трихлоруксусной сурьмы окрашивается в специфический синий цвет. Аналогичное синее окрашивание дают все соединения с сопряженными двойными связями.

**Ход работы:** В сухую пробирку помещают 1–2 капли 0,05% хлороформного раствора ретинола, затем — 4–5 капель 33% раствора трихлоруксусной сурьмы в хлороформе и перемешивают. Появляется синяя окраска.

#### Б. Реакция с концентрированной серной кислотой

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

**Ход 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.

### *В. 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 зеленовато–голубое окрашивание.

**Ход 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.

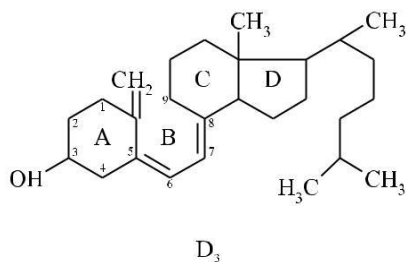
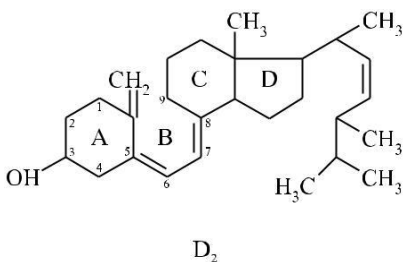
### *Реакции на витамин D*

Витамин D относится к стероидам и является производным циклопентанпергидрофенантрена. Как и витамин А, витамин D существует в виде нескольких витаминеров. Наиболее распространены витаминеры D<sub>2</sub> (эргокальциферол) и D<sub>3</sub> (холекальциферол).

Провитамин D<sub>3</sub> является 7-дегидрохолестерол, который под действием солнечной радиации переходит в витамин D<sub>3</sub>.

Витамины D<sub>2</sub> и D<sub>3</sub> — бесцветные кристаллы с т. пл. 115–116° С, нерастворимые в воде и хорошо растворимые в жирах, хлороформе, бензоле. Витамины D неустойчивы, легко разрушаются под действием окислителей и минеральных кислот.

При отсутствии в пище витамина D у детей развивается рахит. Причина его состоит в расстройстве фосфорно–кальциевого обмена и нарушении отложения фосфата кальция в костной ткани. Недостаток витамина D у взрослых проявляется в виде остеомаляции и остеопороза, возникающих вследствие вымывания из костей солей кальция и фосфора.



### А. Реакция с анилином

Витамин D с анилином в присутствии соляной кислоты образует соединения, окрашенные в красный цвет.

**Ход работы:** В сухую пробирку помещают 1–2 капли рыбьего жира (или раствор витамина D в хлороформе) и добавляют 1 каплю анилинового реактива (анилин с концентрированной соляной кислотой в соотношении 5:1). После перемешивания- образуется эмульсия желтого цвета, содержимое пробирки осторожно- нагревают при постоянном помешивании и кипятят 0,5 минуты. Наблюдают красное окрашивание. Через 1–2 минуты эмульсия разделяется на два слоя, из которых нижний окрашен в интенсивный красный цвет.

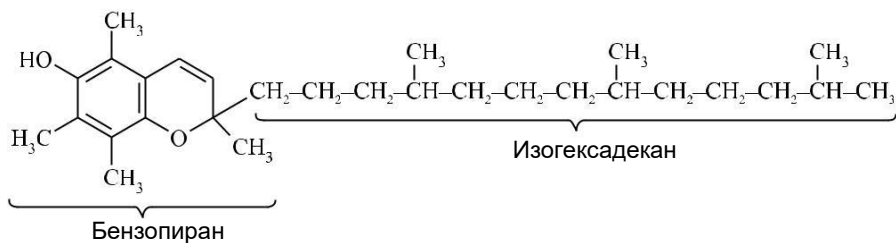
### Б. Реакция с бромом

Витамин D с раствором брома в хлороформе окрашивается в зелено-голубой цвет.

**Ход работы:** В сухую пробирку помещают 2–4 капли рыбьего жира, затем добавляют 4–5 капель раствора брома в хлороформе (1:60). Смесь в пробирке постепенно окрашивается в зелено-голубой цвет.

### Реакции на витамин E

Витамин E существует в виде нескольких изомеров:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -токоферолов. Изомеры отличаются друг от друга в основном порядком расположения метильных групп в бензольном кольце:



$\beta$ -Токоферол отличается от  $\alpha$ -токоферола тем, что лишен метильной группы в положении 7, а  $\gamma$ -токоферол — в положении 5.

Токоферолы — бесцветные маслянистые жидкости, хорошо растворимые в растительных маслах, спирте, эфире. Химически устойчивы, выдерживают нагревание до 170 °С, разрушаются под действием УВЧ.

E-авитаминоз выражается в нарушении структуры и нормального функционирования- многих тканей: развивается мышечная дистрофия, дегенерация спинного мозга, паралич конечностей, дегенеративные изменения репродуктивных органов.

Витамин Е тормозит свободнорадикальное автоокисление ненасыщенных липидов клеточных и субклеточных мембран, контролирует обмен и функции убихинона, участвует в регуляции биосинтеза некоторых ферментов на уровне транскрипции.

#### А. Реакция с хлоридом железа (III)

При взаимодействии с трихлорным железом  $\alpha$ -токоферол окисляется до  $\alpha$ -токоферилхинона, имеющего красный цвет.

**Ход работы:** В сухую пробирку помещают 0,5 мл 0,1% спиртового раствора  $\alpha$ -токоферола, затем 0,5 мл 1% раствора хлорида железа (III) и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдают появление красного окрашивания.

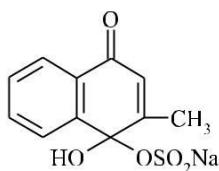
#### Б. Реакция с азотной кислотой

$\alpha$ -Токоферол в присутствии азотной кислоты окисляется до  $\alpha$ -токоферилхинона, окрашенного в красный или желтовато-красный цвет.

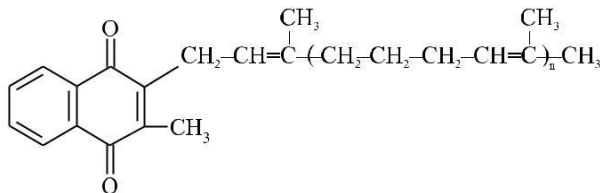
**Ход работы:** В сухую пробирку вносят 5 капель 0,1% спиртового раствора  $\alpha$ -токоферола, затем 1 мл концентрированной азотной кислоты. Пробирку интенсивно встряхивают и тщательно перемешивают содержимое пробирки. Наблюдают появление красного окрашивания.

#### Реакции на витамин К

Витамины группы К являются производными нафтохинона, отличающиеся строением боковой цепи, содержащей от 30 до 45 углеродных атомов и несущих, соответственно, от 6 до 9 двойных связей. Наиболее распространены витамины- К<sub>1</sub>, К<sub>2</sub>, К<sub>3</sub>. Широкое практическое применение имеет синтетический препарат- викасол — производное витамина К<sub>3</sub>.



Викасол



К<sub>2</sub>

Витамин К<sub>1</sub> — желтоватая маслянистая жидкость с т. пл. 115–145 °С. Нерастворим- в воде, растворим в жирах, бензине, спирте. Неустойчив при на-гревании в щелочной среде. Витамин К<sub>2</sub> — желтые кристаллы с т. пл. 54 °С — еще более неустойчив-, чем витамин К<sub>1</sub>. Витамин К<sub>3</sub> — желтый кристалличе-ский порошок с т. пл. 106 °С, растворим в спирте, эфире. Викасол — бесцветный мелкий кристаллический- порошок, растворим в воде.

К-витамины входят в состав простетической группы ферментов, участвующих в синтезе протромбина, который является необходимым компонентом в процессе свертывания крови. Витамин К содержится в митохондриях и регулирует процесс фосфорилирования.

При недостатке витамина К в пище могут возникать самопроизвольные кровотечения: носовые, внутренние, кровавая рвота.

#### **А. Реакция с анилином**

Витамин К взаимодействует с анилином, при этом образуется 1-метил-2-фениламинонафтохинон, окрашенный в красный цвет.

**Ход работы:** В пробирку к 1 мл 0,05% раствора витамина К<sub>3</sub> (или викасола) добавляют 2 капли анилина и тщательно перемешивают, содержимое пробирки окрашивается в красный цвет.

#### **Б. Реакция с цистеином**

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

**Ход работы:** В пробирку наливают 1 мл 0,2% спиртового раствора викасола, затем добавляют 5 капель 0,025% раствора цистеина и 2 капли 10% раствора гидроксида натрия. Появляется желтое окрашивание.

### **КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНОВ**

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

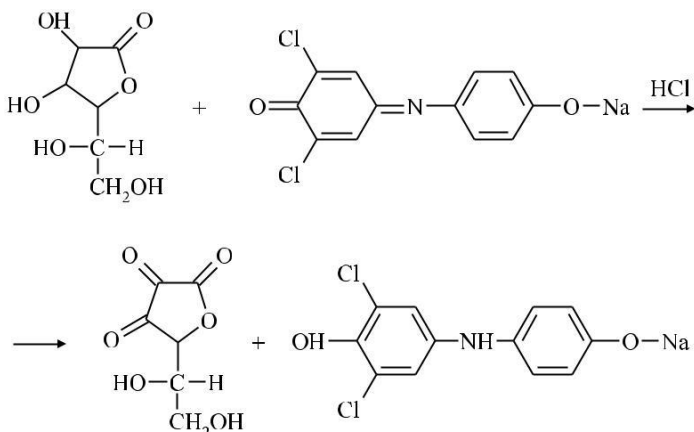
При взаимодействии витаминов с рядом химических соединений наблюдаются характерные цветные реакции, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации витаминов в исследуемом растворе. Поэтому витамины можно определять *фотокolorиметрически*. Эти методы позволяют судить как о наличии витамина, 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 фотокolorиметрические методы могут быть применимы не во всех случаях. Например, витамин А имеет специфическую полосу поглощения при 328–330 нм. Для определения витаминов А, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> 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.



## Работа 17. Определение витамина С в растительном материале

Метод основан на способности витамина С восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, 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:  $X = 0,088 \cdot A \cdot \Gamma \cdot 100 / B \cdot V$ , где X — содержание витамина С в миллиграммах на 100 г продукта, 0,088 — содержание аскорбиновой кислоты (мг), А — результат титрования 0,001 н. раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенолом (мл), В — объем экстракта, взятый для титрования (мл), V — количество продукта, взятого для анализа (г), Г — общее количество экстракта (мл), 100 — пересчет на 100 г продукта.

### Реактивы и оборудование:

*Растительный материал (ягоды шиповника, хвоя, капуста, морковь, картофель), соляная кислота (10%), 0,001 н. раствор натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола. Весы разновесы, фарфоровые ступки с пестиками, мерные цилиндры на 25 мл, мерные колбы на 25 мл, конические колбы, воронки стеклянные, пипетки на 1, 2, 5 мл, микробюретки на 4, 5 мл, кварцевый песок, бумажные фильтры.*

**Ход 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.

### Работа 18. Определение содержания витамина С в моче

Определение содержания витамина С в моче дает представление о запасах этого витамина в организме, так как наблюдается соответствие между концентрацией витамина С в крови и количеством этого витамина, выделяемого с мочой. Однако при гиповитаминозе С содержание аскорбиновой кислоты в моче не всегда понижено. Часто оно бывает нормальным, несмотря на большой недостаток этого витамина в тканях и органах.

У здоровых людей введение *per os* 100 мг витамина С быстро приводит к повышению его концентрации в крови и моче. При гиповитаминозе С ткани, испытывающие недостаток в витамине, задерживают принятый витамин С, и его концентрация в моче не повышается. Моча здорового человека содержит 20–30 мг витамина С или 113,55–170,33 мкмоль/сут. У детей уровень этого витамина понижается при цинге, а также острых и хронических инфекционных заболеваниях.

#### Реактивы и оборудование:

*Моча, соляная кислота (10%), натриевая соль 2,6-дихлорфенолиндофенола (0,001 н.). Конические колбы на 50–100 мл, мерные цилиндры на 10 мл или пипетки на 10 мл, микробюретки, капельные пипетки.*

**Ход работы:** В стаканчик или колбочку отмеривают 10 мл мочи и 10 мл дистиллированной воды, перемешивают, подкисляют 20 каплями 10% раствора соляной кислоты и титруют 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски. Расчет содержания аскорбиновой кислоты в моче проводят по формуле:  $X = 0,088 \cdot A \cdot B / B$ , где  $X$  — содержание аскорбиновой кислоты (мг/сут);  $A$  — результат титрования 0,001 н. раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола (мл);  $B$  — объем мочи, взятый на титрование (мл);  $B$  — среднее суточное количество мочи (для мужчин — 1 500 мл, для женщин — 1 200 мл).

## Работа 19. Определение витамина Р в чае — черном и зеленом

Рутин способен окисляться перманганатом калия, в качестве индикатора применяется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом калия, после того как окислится весь рутин. Экспериментально установлено, что 1 мл 0,1 н. раствора перманганата калия окисляет 6,4 мкг рутина.

### Реактивы и оборудование:

*Чай: черный и зеленый, индигокармин, 0,05 н. раствор перманганата калия. Весы разновесы, конические колбы, микробюретки, мерные цилиндры на 50 мл, пипетки на 10 мл, капельные пипетки.*

**Ход работы:** К 100 мг чая черного и отдельно зеленого приливают 50 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию в течение 5 минут. 10 мл экстракта черного и зеленого чая помещают в конические колбы, добавляют по 10 мл дистиллированной воды и 5 капель индигокармина, содержимое колб окрашивается в синий цвет. Титруют из микробюретки 0,05 н. раствором перманганата- калия до появления устойчивой желтой окраски.

Определяют процентное содержание витамина Р в чае по формуле:  $X = 3,2 \cdot A \cdot V_1 \cdot 100 / V_2 \cdot P \cdot 1\,000$ , где X — содержание витамина Р в чае (%), 3,2 — стан-дартный пересчетный коэффициент; А — результат титрования 0,05 н. раствором перманганата калия (мл);  $V_1$  — объем, в котором растворена взятая для анализа навеска (мл); 100 — общее количество вещества для расчета процентного содержания- (г);  $V_2$  — объем раствора, взятый для титрования (мл); Р — навеска (мг); 1 000 — перевод микрограммов в миллиграммы. Сравнивают содержание витамина- Р в черном и зеленом чае.

## Работа 20. Количественное определение тиамин (В<sub>1</sub>) в моче

Определение основано на окислении тиамин в тиохром, экстракции тиохрома органическим растворителем и изменении интенсивности голубой флюоресценции. Для количественного определения тиамин сравнивают флюоресценцию окисленных стандартных и испытуемых растворов тиаминхлорида на флюорометре.

### Реактивы и оборудование:

*Моча, раствор гексациано-(III)-феррата калия (10%), раствор гидроксида натрия (20%), рабочий стандартный раствор тиамин (10 мкг в 1 мл), эта- нол, изобутанол. Флюорометр, штатив с пробирками, пипетки, делительные воронки.*

**Ход работы:** В делительную воронку наливают 6–8 мл мочи, прибавляют равный объем изобутанола и встряхивают в течение 2 минут. Промытую мочу (нижний слой) сливают в две сухие делительные воронки (по 2 мл) и прибавляют по 1 мл раствора гидроксида натрия.

В опытную воронку по каплям вносят свежеприготовленный раствор гексациано-(III)-феррата калия до тех пор, пока окраска не сохранится в течение полминуты. В опытную и контрольную воронки прибавляют по 5 мл дистиллированной воды, по 10 мл изобутанола и интенсивно встряхивают в течение 2 минут. Нижний слой мочи сливают, а верхний (изобутанол) собирают в две сухие пронумерованные пробирки.

В третью делительную воронку вносят 1 мл рабочего стандартного раствора тиамин и 1 мл воды, в четвертую — 2 мл дистиллированной воды. В обе воронки прибавляют по 1 мл раствора гидроксида натрия, по 10 капель раствора гексациано-(III)-феррата калия, встряхивают, доливают по 5 мл воды и по 10 мл изобутанола, снова встряхивают в течение 2 минут. Нижний слой удаляют, а верхний собирают в две сухие пронумерованные пробирки.

Для просветления растворов во все четыре пробирки — опытную, стандартную и две контрольные — добавляют по 2 мл этанола. Проводят сравнение интенсивности флюоресценции исследуемой мочи и контроля. Содержание тиамин определяют на флюорометре по флюоресценции тioxрома.

Массовую концентрацию тиамин (мкг) в исследуемом материале находят по формуле  $X = C (E_{\text{оп}} - E_{\text{к}}) V_0 / E_{\text{ст}} V_1$ , где  $X$  — массовая концентрация тиамин в моче,  $C$  — концентрация тиамин в 1 мл рабочего стандартного раствора (10 мкг);  $V_1$  — объем мочи, взятой для анализа (2 мл);  $V_0$  — общий объем мочи за сутки (мл);  $E_{\text{оп}}$  — интенсивность флюоресценции опытной пробы;  $E_{\text{к}}$  — кон- трольной;  $E_{\text{ст}}$  — стандартной.

### Вопросы и задания для самопроверки

---

1. Какова биологическая роль витаминов?
2. На чем основана классификация витаминов?
3. На каких принципах основана номенклатура витаминов? Приведите примеры. В каком году принята Международная номенклатура витаминов?
4. Какая связь существует между витаминами и ферментами?
5. Что такое гипо-, гипер-, авитаминозы?
6. Почему недостаток в пище водорастворимых витаминов быстрее приводит к развитию гиповитаминоза, чем недостаток жирорастворимых?
7. Вследствие чего потребление жирорастворимых витаминов приводит к развитию гипервитаминоза, а повышенное потребление водорастворимых витаминов — нет?
8. Какой витамин содержит в качестве структурных элементов изопреновые фрагменты? Напишите его структурную формулу.
9. Отсутствие какого витамина в организме человека вызывает заболевание роговицы глаза — ксерофтальмию?
10. Приведите схему обмена витамина А при участии его в акте зрения и объясните причину перехода транс-формы ретиналя в цис-форму.

11. Какие витамины являются производными стеролов? Напишите его структурную формулу.
12. Какие нарушения в обмене веществ характерны для рахита? Какой витамин обладает антирахитическими свойствами?
13. Для каких витаминов характерно явление витаминерии? В чем оно проявляется? Дайте характеристику отдельным представителям.
14. Какой витамин является  $\alpha$ ,  $\gamma$ -дигидрокси- $\beta$ ,  $\beta$ -диметилбутирил- $\beta$ -аланином? Напишите его структурную формулу.
15. Какой витамин является составной частью кофермента А? Напишите структурную формулу HS-CoA. Каков механизм его действия?
16. Какой витамин является производным диметилгидроксиметилбензохинона? Напишите его структурную формулу.
17. Какой витамин оказывает влияние на проницаемость капилляров? Каков механизм процессов свертывания крови и роль этого витамина в нем?
18. Какой из витаминов является бисульфитным соединением метилнафтохинона? Кто и когда впервые его синтезировал?
19. Какой витамин является производным  $\beta$ -пиридинкарбоновой кислоты? Напишите его структурную формулу.
20. Коферментом пируватдегидрогеназы является производное одного из витаминов. Какого? Назовите кофермент и напишите его структурную формулу.
21. Какова химическая природа пиридоксина? Напишите структурные формулы всех витаминов В<sub>6</sub>.
22. Какой витамин входит в состав кофермента, участвующего в реакциях трансаминирования? Выразите схемой механизм реакции переаминирования аспартата и пирувата с участием кофермента трансаминаз.
23. Какова химическая природа аскорбиновой кислоты?
24. Для какого витамина характерна реакция с 2,6-дихлоролинодофенолом? Приведите уравнение реакции.
25. Производное какого витамина участвует в реакции декарбоксилирования кетокислот? Приведите схему уравнения реакций декарбоксилирования пирувата с участием тиаминпирофосфата.
26. Напишите уравнение реакции окисления витамина В<sub>1</sub> в тиохром гексациано-III-ферратом калия в щелочной среде.
27. Какие коферменты входят в состав витамина В<sub>2</sub>? Напишите структурные формулы. Приведите схему дегидрогеназной реакции с участием этих коферментов.
28. Напишите уравнение реакции окисления  $\beta$ -токоферола до  $\beta$ -токохинона.
29. С помощью какой реакции можно открыть рибофлавин? Приведите уравнение этой реакции.
30. Какие принципы лежат в основе количественного определения витаминов в биологических материалах?

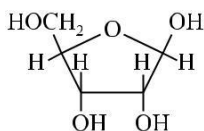
## ГЛАВА 4. НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Нуклеиновые кислоты играют основную роль в сохранении и реализации генетической информации. В каждом живом организме присутствуют два типа нуклеиновых кислот: *рибонуклеиновая кислота* (РНК) и *дезоксирибонуклеиновая кислота* (ДНК). В то же время вирусы содержат только один какой-нибудь тип нуклеиновых кислот: либо РНК, либо ДНК. Нуклеиновые кислоты определяют *вид, форму, состав* и т. д. живой клетки и ее *функции*. Роль нуклеиновых кислот в организме трудно переоценить. Все нуклеиновые кислоты представляют собой высокомолекулярные соединения, хотя размер их сильно варьирует: от 25 000 до 1 000 000 000.

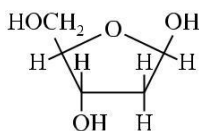
### СОСТАВ, СТРОЕНИЕ, СВОЙСТВА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

РНК и ДНК состоят из мономерных единиц — *нуклеотидов*, поэтому нуклеиновые кислоты называют также полинуклеотидами. Каждый нуклеотид содержит три химически различных компонента: *неорганический фосфат, моносахарид- (пентозу) и остаток пурина или пиримидина (азотистое основание)*. Эти составные части соединены друг с другом в следующем порядке: фосфат — остаток моносахарида — азотистое основание. Нуклеотиды связаны друг с другом посредством эфирной связи между моносахаридом одного и фосфатом другого нуклеотида, называемой *фосфодиэфирной*. Азотистые основания связаны с остатком моносахаридов *N-гликозидной связью*. Последовательность азотистых оснований вдоль сахарофосфатной цепи определяет уникальную структуру и функциональную индивидуальность молекул ДНК и РНК.

Нуклеотиды в составе РНК содержат  $\beta$ -рибозу, в ДНК —  $\beta$ -дезоксирибозу.

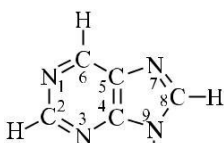


$\beta$ ,D-Рибоза

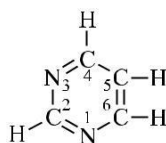


$\beta$ ,D-Дезоксирибоза

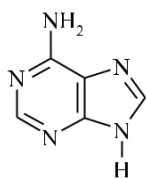
Азотистые основания, которые обычно встречаются в РНК и ДНК, — это *пурины* и *пиримидины*.



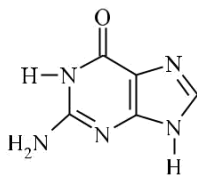
Пурин



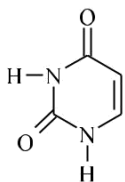
Пиримидин



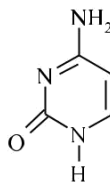
Аденин (А)  
(РНК+ДНК)



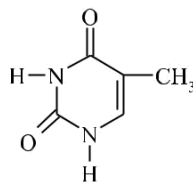
Гуанин (Г)  
(РНК+ДНК)



Урацил (У)  
(РНК)



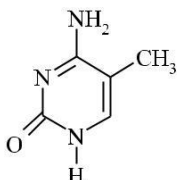
Цитозин (Ц)  
(РНК+ДНК)



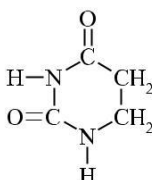
Тимин (Т)  
(ДНК)

Пурины и пиримидины — плоские молекулы, для Г, У, Ц, Т известна кето-сольная таутомерия, однако кетоструктуры гораздо более стабильны и доминируют при физиологических условиях.

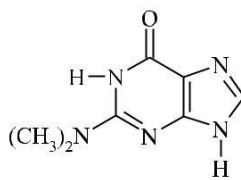
Кроме постоянных азотистых оснований в составе РНК и ДНК присутствуют минорные (редкие) азотистые основания, особенно это характерно для тРНК.



5-Метилцитозин  
(ДНК)

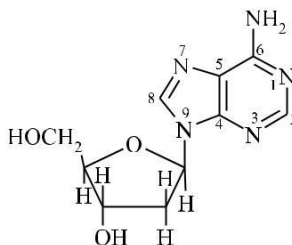
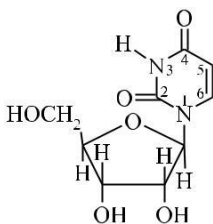


Дигидроурацил  
(т РНК)



2-N,N-Диметилгуанин  
(т РНК)

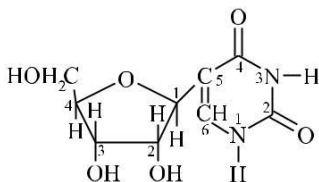
Фрагмент нуклеотида, представляющий собой азотистое основание с присоединенным к нему углеводным остатком, называют *нуклеозидом*. В нуклеозиде ковалентная связь, образованная С-атомом сахара и N-атомом азотистого основания, называется *N-гликозидной*.



Дезоксиаденозин

Для нуклеозидов наиболее распространены тривиальные названия: аденозин, гуанозин, уридин, цитидин, дезоксиаденозин, тимидин.

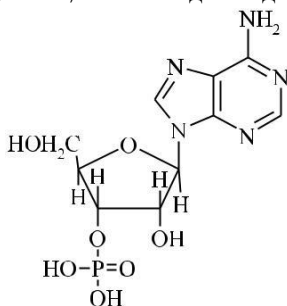
В состав некоторых РНК кроме основных входят и необычные нуклеозиды:



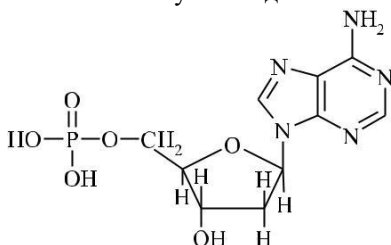
Псевдоуридин

*Нуклеотиды* — фосфорные эфиры нуклеозидов. Обычно у нуклеозидов этерифицируется гидроксильная группа С-5<sup>1</sup> или С-3<sup>1</sup> пентозного остатка. В зависимости от строения пентозы различают рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды. В зависимости от числа имеющихся остатков фосфорной кислоты различают нуклеозидмонофосфаты, нуклеозиддифосфаты, нуклеозидтрифосфаты.

Для нуклеотидов используют два вида названий: одно включает наименование нуклеозида с указанием положения фосфатного остатка (аденозин-3<sup>1</sup>-фосфат, дезоксиаденозин-5<sup>1</sup>-фосфат); другое строится с добавлением «-овая кислота» к названию остатков азотистых оснований (3<sup>1</sup>-адениловая кислота, 5<sup>1</sup>-дезоксиадениловая кислота). Сокращения АМФ, дАМФ, ГМФ, ГМФ и т. д. всегда относятся к 5<sup>1</sup>-нуклеотидам.



Адепозин-3<sup>1</sup>-фосфат  
(3<sup>1</sup>-адениловая кислота)



Дезоксиаденосин-5<sup>1</sup>-фосфат  
(5<sup>1</sup>-дезоксиадениловая кислота)  
дАМФ

Нуклеотиды связываются в длинные цепи с помощью фосфатных групп, образуя высокомолекулярные продукты поликонденсации — нуклеиновые кислоты. Рибонуклеотиды образуют РНК, дезоксирибонуклеотиды — ДНК. Фосфатная группа в полинуклеотидной цепи образует две сложноэфирные связи с участием 3<sup>1</sup> и 5<sup>1</sup> углеводных атомов пентозы и эту связь называют 3<sup>1</sup>, 5<sup>1</sup>-фосфодиэфирной связью.



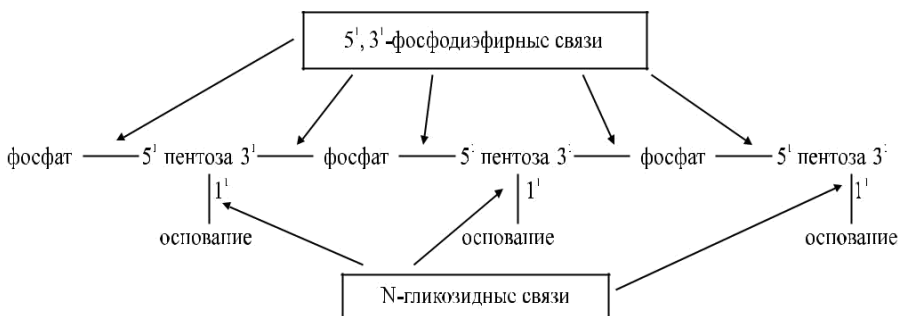
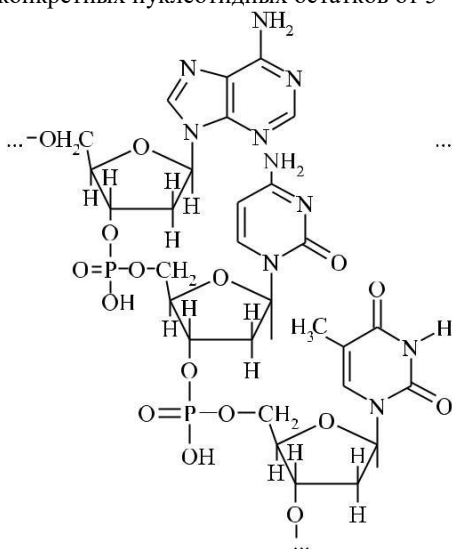


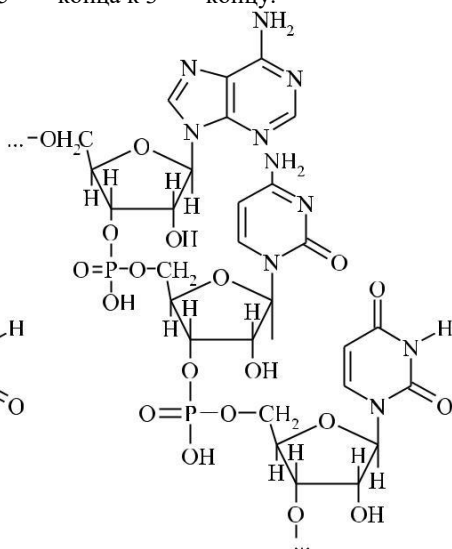
Схема построения нуклеотидной цепи

Полимерная цепь нуклеиновых кислот состоит из чередующихся пентозных и фосфатных остатков, а гетероциклические основания являются «боковыми» группами, присоединенными к пентозным остаткам. Концы линейной полинуклеотидной цепи обозначают  $5^1$  — конец (слева) и  $3^1$  — конец (справа), так как написание цепи начинают с  $5^1$  — конца ( $5 \rightarrow 3$ ). На  $5^1$  — конце находится фосфатная группа (ф), на  $3^1$  — конце цепи в пентозном остатке сохраняется свободной гидроксильная- группа у  $C - 3^1$  (ОН).

Для удобства записи полинуклеотидных цепей используются сокращенные обозначения, причем каждый мономер обозначается однобуквенным символом (А, Г, Ц, Т, У). Тогда полинуклеотид записывается как последовательный набор конкретных нуклеотидных остатков от  $5^1$  — конца к  $3^1$  — концу.



... $A_{\text{д}}$ - $C_{\text{д}}$ - $T_{\text{д}}$ ... (фрагмент ДНК)



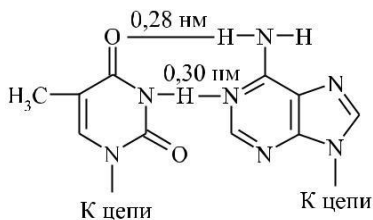
...АЦУ... (фрагмент РНК)

Для нуклеотидного состава ДНК (независимо от источника ее выделения) известны важные общие закономерности, известные как правила Чаргаффа:

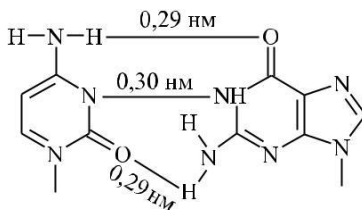
1. Число пуриновых оснований (А + Г) равно числу пиримидиновых оснований (Т + Ц), т. е. отношение пуринов к пиримидинам равно 1.
2. Число остатков аденина равно числу остатков тимина, т. е. отношение аденина к тимину равно 1.
3. Число остатков гуанина равно числу остатков цитозина, т. е. отношение гуанина к цитозину равно 1.

Кроме того, существенным для характеристики вида ДНК оказался так называемый- коэффициент специфичности, отражающий отношение Г + Ц/А + Т. Это отношение часто выражают в молях или процентах ГЦ-пар. ГЦ-тип ДНК характерен- для дрожжевых грибов, актиномицетов, ряда бак-терий, вирусов. АТ тип ДНК — для хордовых и беспозвоночных животных, высших растений, дрожжевых- организмов.

Основываясь на данных рентгеноструктурного анализа ДНК и правиле Чаргаффа, Уотсон и Крик предложили в 1953 году модель двухспиральной структуры- ДНК. Две цепи правозакрученной, двухспиральной модели удерживаются друг возле друга за счет водородных связей, образующихся между комплементарными- парами: А и Т, Г и Ц. В двухцепочечной молекуле ограничения обусловлены- заторможенностью вращения вокруг фосфодиэфирной связи, преимущественная- антиконфигурация гликозидных связей и преимущественные кетоформы четырех оснований создают условия, в которых А может образовать прочную пару только с Т, а Г только с Ц.



АТ-пара



ГЦ-пара

Две цепи двойной спирали являются антипараллельными, т. е. направление одной- цепи  $5^1 \rightarrow 3^1$ , другой —  $3^1 \rightarrow 5^1$ . Одну из двух комплементарных цепей ДНК, содержащую- информацию о структуре определенного гена в виде специфической последовательности нуклеотидных звеньев, обычно называют кодирующей (или матричной), другая комплементарная ей цепь носит название не-кодирующей.

ДНК может формировать несколько типов двойных спиралей. В настоящее- время известно шесть форм. Эти формы различаются числом пар азотистых оснований на один виток двойной спирали: расстоянием между плоскостями-

пар азотистых оснований и углом, который они образуют с осью спирали; диаметром спирали, направленностью (правозакрученная, левозакрученная-) двойной спирали.

Конформационные переходы форм ДНК друг в друга происходят при изменении концентрации соли и степени гидратации. При физиологических условиях- (низкая концентрация соли, высокая степень гидратации) доминирующим типом ДНК является В-форма. В условиях менее высокой гидратации и при более высоком содержании ионов  $\text{Na}^+$  или  $\text{K}^+$  возникает А-форма. Эта правоспиральная конфигурация имеет больший диаметр спирали, чем В-форма и большее число пар оснований на виток. Она сходна со структурой, характерной для РНК-ДНК-дуплексов.

Таблица 13. Параметры двойной спирали ДНК

|   | А ( $\text{Na}^+$ ) | В ( $\text{Na}^+$ ) | С ( $\text{Li}^+$ ) | Т      |
|---|---------------------|---------------------|---------------------|--------|
| Число комплементарных пар на шаг спирали      | 11                  | 10                  | 9,3                 | 8      |
| Шаг спирали (нм)                              | 2,81                | 3,36                | 3,10                | 2,72   |
| Расстояние между комплементарными парами (нм) | 0,255               | 0,336               | 0,332               | 0,34   |
| Угол между комплементарными парами- (градусы) | 32,73               | 36                  | 39                  | 45     |
| Угол наклона комплементарных пар (градусы)    | 20                  | 2                   | 6                   | 6      |
| Направленность двойной спирали                | правая              | правая              | правая              | правая |

При определенных условиях В-форма ДНК может переходить в Z-форму (Zigzag), представляющую собой левую двойную спираль. Z-ДНК — наименее скрученная, на виток приходится 12 пар оснований, она обладает только одним желобом (бороздкой). Z-ДНК выявляют в повторяющихся последовательностях чередующихся пуриновых и пиримидиновых дезоксирибонуклеотидов (ГЦ или АЦ) при наличии ряда других стабилизирующих факторов, к которым относятся высокие- концентрации солей или специфических катионов; связи-вание Z-ДНК со специфическими белками; метилирование атома углерода —  $5^1$  некоторых остатков- дезоксицитидина.

ДНК в Z-форме может участвовать в регуляции экспрессии генов. В ДНК человека имеются участки, потенциально способные переходить в Z-форму; она диспергирована в геноме. Есть основания предполагать, что в клетках человека могут реализоваться условия, необходимые для стабилизации Z-формы.

В структуре ДНК имеются большие и малые бороздки, закрученные вокруг оси молекулы параллельно фосфодиэфирному остову. В этих бороздках белки могут специфически взаимодействовать с определенными атомами азотистых оснований и, следовательно, «узнавать» конкретные нуклеотидные последовательности, не нарушая комплементарных взаимодействий в структуре двойной спирали. Именно за счет таких взаимодействий регуляторные белки могут осуществлять- конкретные экспрессии генов.

ДНК бактерий, бактериофагов и многие другие ДНК, содержащие вирусы животных, представляют собой замкнутую кольцевую структуру. Такая структура не нарушает полярность молекул, но в ней исчезают свободные 3<sup>1</sup> и 5<sup>1</sup> гидроксильные- и фосфатные группы. Замкнутые кольца могут существовать в релаксированной или суперспиральной формах. Суперспиральность проявляется тогда, когда замкнутое кольцо сворачивается вокруг собственной оси или когда скручивается участок линейной ДНК, концы которой зафиксированы. Этот требующий энергии процесс приводит к появлению внутримолекулярного напряжения структуры. При увеличении супервитков внутреннее напряжение возрастает. Супервитки ДНК, образованные за счет скручивания против часовой-стрелки (в направлении, обратном закручиванию правосторонней двойной спирали В-формы ДНК), называются отрицательными. Энергия перехода молекулы- ДНК к другому типу надмолекулярной структуры может понижаться за счет образования участков отрицательного скручивания. Один из таких переходов — разделение цепей при подготовке к репликации и транскрипции. Суперспирализация ДНК весьма выгодна в биологических системах.

Двухспиральную структуру ДНК можно «расплавить» в растворе, повышая температуру или понижая концентрацию соли. При «плавлении» происходит не только расхождение цепей ДНК, но и нарушается система стэкинг-взаимодействий азотистых оснований внутри данной цепи. Фосфодиэфирные связи при этом не разрываются.

*Денатурация* ДНК сопровождается усилением оптического поглощения пуриновых и пиримидиновых оснований. Это явление называют *гиперхромным эффектом денатурации* ДНК. При денатурации исчезает высокая вязкость, присущая растворам нативной ДНК, волоконноподобная структура. Разделение цепей данной молекулы ДНК происходит в пределах определенного интервала температур. Средняя точка этого интервала называется температурой плавления ДНК, значение которой зависит от нуклеотидного состава ДНК и концентрации соли в растворе. ГЦ-тип ДНК «плавится» при более высокой температуре, чем АТ-тип ДНК (80–90° С).

Генетическая информация, закодированная в последовательности нуклеотидов, служит двум целям. Во-первых, она необходима для синтеза белковых молекул, во-вторых, обеспечивает передачу самой себя в ряду клеточных поколений и поколения организмов. Обе функции основаны на том, что молекула ДНК служит матрицей, в первом случае для *транскрипции* — перекодирования информации- в структуру молекул РНК, во втором для *репликации* — копирования информации в дочерних молекулах ДНК.

ДНК и РНК имеют много общего, однако по ряду признаков они отличаются друг от друга. У РНК пентозой является β-рибоза, а не β-дезоксирибоза.

В РНК не содержится тимин, его место занимает урацил. РНК — *одноцепочечная молекула*,

в отличие от двухцепочечной ДНК, однако при наличии в цепи РНК участков с комплементарными последовательностями единичная цепь РНК способна сворачиваться с образованием структур, имеющих двухспиральные характеристики. Так как молекула РНК представляет собой одиночную цепь, содержание в ней гуанина не обязательно равно содержанию цитозина, а содержание аденина не обязательно равно содержанию урацила.

Информация, содержащаяся в одноцепочечной РНК, реализуется в виде определенной последовательности пуриновых и пиримидиновых оснований цепи.

Известно несколько видов РНК. Почти все они непосредственно вовлечены в процесс биосинтеза белка. Молекулы цитоплазматической РНК, выполняющие функции матриц белкового синтеза, называются матричными (мРНК); другой вид — рибосомная РНК (рРНК) выполняет роль структурных компонентов рибосом. Адапторные молекулы транспортных (тРНК) участвуют в трансляции (переводе) информации мРНК в последовательность аминокислот в белках.

Таблица 14. Свойства наиболее важных РНК

|   |                              | тРНК  | рРНК   | мРНК   |
|---|------------------------------|---|--|--|
| 1 | Число нуклеотидных остатков  | 74–95   | 120–1 500  | 400–6 000  |
| 2 | Количество подтипов в клетке | Более 50  | 4  | Более 1 000  |
| 3 | Содержание в клетке          | 10–20%  | 80%  | 5%   |
| 4 | Время жизни                  | Продолжительное   | Продолжительное  | Короткое   |
| 5 | Функция                      | Трансляция: кодирование, акцептирование, транспорт аминокислот- | Трансляция: структурные и функциональные части рибосом | Трансляция: переносит генетическую информацию из ядра в цитозоль |

Значительная часть РНК, образующихся в эукариотических клетках, включая и клетки млекопитающих, подвергается деградаци в ядре и не играет какой-либо структурной или информационной роли в цитоплазме. В культивирующихся клетках человека обнаружен класс малых ядерных РНК (мяРНК), которые непосредственно не участвуют в синтезе белка, но могут оказывать влияние на процессинг РНК и общую архитектуру клетки. Размеры этих относительно небольших молекул варьируют и могут содержать от 90 до 300 нуклеотидов.

РНК являются основным генетическим материалом у некоторых вирусов животных и растений. Некоторые РНК-содержащие вирусы никогда не проходят стадию обратной транскрипции РНК в ДНК. Однако для большинства известных вирусов, таких как ретровирусы, характерна обратная транскрипция их РНК-генома, направляемая РНК-зависимой ДНК-полимеразой с образованием двухспиральной ДНК-копии. Во многих случаях образующийся

двухспиральной- ДНК транскрипт встраивается в геном и в дальнейшем обеспечивает экспрессию- генов вируса, а также наработку новых копий вирусных РНК-геномов.

В ядрах клеток млекопитающих, включая человека, содержатся ядерные РНК (непроцессированные продукты транскрипции), такие ядерные РНК очень гетерогенны и достигают значительных размеров. Молекулы *гетерогенных ядерных РНК (гЯРНК)* могут иметь молекулярную массу более  $10^7$ , в то время как молекулярная масса мРНК обычно не превышает  $2 \cdot 10^6$ .

### **Работа 21. Выделение рибонуклеопротеинов (РНП) из дрожжей и качественное определение продуктов их гидролиза**

Нуклеиновые кислоты являются составной частью сложных белков (нуклеопротеинов), содержащихся во всех клетках животных, растений, бактерий, вирусов. Нуклеиновые кислоты — сильно кислые и при физиологических значениях рН несут отрицательный заряд. Этим объясняется способность нуклеиновых кислот взаимодействовать по типу ионной связи с основными белками (гистонами и негистонами), ионами металлов (преимущественно с  $Mg^{2+}$ ), а также полиаминами (спермином, спермидином). Поэтому для выделения нуклеиновых кислот из комплекса с белками необходимо прежде всего разрушить эти сильные и многочисленные электростатические связи между положительно заряженными молекулами белков и отрицательно заряженными- молекулами нуклеиновых кислот.

Для этого измельченный путем гомогенизации биоматериал обрабатывают крепкими солевыми растворами (10% раствор хлорида натрия) и затем этанолом. В настоящее время для выделения нуклеиновых кислот в нативном состоянии пользуются более мягким фенольным методом, основанном на обработке нейтрального забуференного раствора нуклеопротеидов фенолом. Обычно эту процедуру проводят в присутствии веществ, вызывающих денатурацию белкового компонента (например, додецилсульфата или салицилата натрия), затем смесь подвергают центрифугированию. При этом денатурированный- белок попадает в фенольную фракцию, а нуклеиновые кислоты остаются в водной, из которой их осаждают на холоде добавлением 2–3 объемов этанола. Этим методом удастся получить достаточно очищенные препараты нуклеиновых кислот.

В настоящее время применяют ряд усовершенствованных методов разделения нуклеиновых кислот на фракции из суммарного препарата, полученного описанным выше методом. В их числе хроматография на геле фосфата кальция, ионнообменная хроматография на адсорбентах ДЭАЭ-целлюлозе, ДЭАЭ-сефадексе и других, ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы, фильтрация через гели агарозы и сефарозы, гельэлектрофорез и др.

После получения нуклеиновых кислот в чистом виде их подвергают гидролизу для изучения химического состава.

## Реактивы и оборудование:

Пекарские дрожжи; гидроксид натрия (0,4% и 10%); уксусная кислота (10%); лакмусовая бумага; соляная кислота (конц.); сульфат меди (1%); аммиак (конц.); нитрат серебра (1%); диэтиловый эфир, серная кислота (10%); орциновый реактив: 50 мл  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  растворяют в 250 мл концентрированной соляной кислоты ( $\rho$  1,14 г/мл). Этот раствор хранят в склянке темного цвета под тягой не более одного месяца. Перед опытом к нему добавляют орцин, из расчета на 1 мл раствора 4,76 мг орцина; раствор флороглюцина: 0,2 г флороглюцина растворяют в 100 мл 30% соляной кислоты; Феллингова жидкость: готовят два раствора: А. — 34,6 г  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  в 500 мл раствора. Б. — 17,3 г сегнетовой соли и 70 г  $NaOH$  в 500 мл раствора. Растворы хранят раздельно. Перед применением смешивают равные объемы первого и второго раствора; молибдат аммония: смешивают 15% раствор молибдата аммония с концентрированной азотной кислотой в отношении 110:90; магниезиальная смесь: 100 г хлорида магния, 200 г хлорида аммония, 20 мл концентрированного раствора аммиака растворяют в воде и доводят до 1 литра. Центрифуга, колбы круглодонные на 100 мл с обратным воздушным холодильником, ступки с пестиком, кварцевый песок, стаканы с носиком на 200 мл, цилиндры мерные на 50 мл, воронки стеклянные, палочки стеклянные, пробирки, песчаные бани, фильтровальная бумага.

**Ход работы:** 1. Гомогенизация. 10 г дрожжей смешивают в ступке со смесью из 2 мл эфира и 2 мл воды, добавляют 5 г песка и тщательно растирают, приливая к растертой массе небольшими порциями 40–50 мл 0,4% раствора гидроксида натрия. Растирание продолжают в течение 15–20 минут.

2. Центрифугирование. После этого гомогенат помещают в центрифужные пробирки для центрифугирования. Центрифугат сливают в стакан и к нему прибавляют небольшими порциями (по 0,5 мл) 10% уксусную кислоту до слабокислой реакции по лакмусу (5–6 мл). Полученный осадок нуклеопротейдов отделяют центрифугированием.

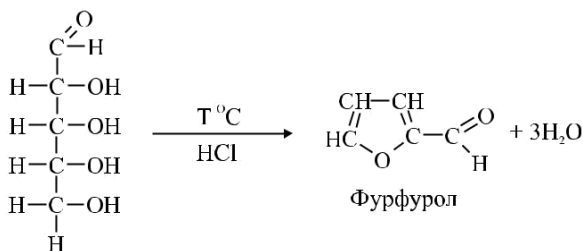
3. Гидролиз. Осадок из центрифужной пробирки помещают в колбу для гидролиза, приливают 20 мл 10% раствора серной кислоты. Колбу закрывают пробкой с проходящим через нее воздушным холодильником (стеклянная трубка длиной 70 см и диаметром 0,7–0,8 см), смесь кипятят на песчаной бане в течение 1 часа, поддерживая слабое кипение.

4. Анализ гидролизата. Гидролизат отфильтровывают и в прозрачном фильтрате определяют белки, пентозы, пуриновые основания, фосфорную кислоту.

**А.** Белки обнаруживают с помощью биуретовой реакции (см. работу 1). **Б.**

Рибозу обнаруживают по реакции с орцином или флороглюцином.

При нагревании с 20% соляной кислотой рибоза дегидратируется и превращается в фурурол:

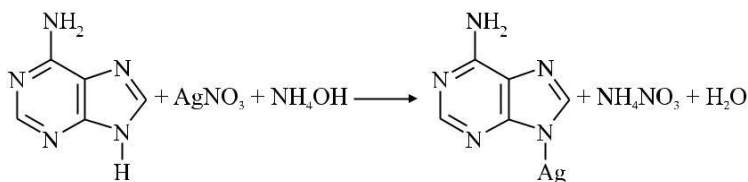


Фурфурол конденсируется с орцином или флороглюцином с образованием соединений зеленого (с орцином) и розово-красного (с флороглюцином) цвета. Дезоксирибоза не дает этой реакции.

К 1 мл реактива орцина (или флороглюцина) добавляют половинный объем гидролизата, 1 мл концентрированной соляной кислоты и нагревают до кипения. Наблюдают появление соответствующего окрашивания.

**В.** Пентозу (рибозу и дезоксирибозу) обнаруживают с помощью реактива Фелинга: к 0,5 мл гидролизата добавляют 1 мл 10% раствора щелочи, 0,5 мл реактива Фелинга, перемешивают, нагревают до кипения. Наблюдают появление осадка красного цвета.

**Г.** Пуриновые основания обнаруживают по их реакции с аммиачным раствором- нитрата серебра:



К 2 мл гидролизата приливают по каплям концентрированный раствор аммиака до щелочной реакции по лакмусу (приблизительно 10 капель) и затем добавляют- равный объем 2% аммиачного раствора нитрата серебра. Через 3–5 минут- образуется светло-коричневый осадок серебряных солей пуриновых оснований-, содержимое пробирки перемешивать не следует.

**Д.** Фосфорную кислоту обнаруживают с помощью молибдата аммония или магниезиальной смеси.

Молибденовая проба на фосфорную кислоту:



К 2 мл раствора молибдата аммония в азотной кислоте прибавляют 1 мл гидролизата. Смесь слегка нагревают. Образуется желто-зеленый осадок фосфоромолибдата- аммония.



## Вопросы и задания для самопроверки

1. Какие вещества являются мономерами нуклеиновых кислот? При помощи каких химических связей они соединены в полинуклеотидные цепи?
2. Чем отличаются нуклеозиды от нуклеотидов? Напишите структурные формулы нижеперечисленных соединений, укажите, какие из них относятся к нуклеозидам, к нуклеотидам: дезоксицитидин, 5<sup>1</sup>-фосфатаденозин, тимин-дин, 3<sup>1</sup>-фосфатуридин.
3. Какие постоянные и минорные азотистые основания встречаются в ДНК? Напишите структурные формулы их в кетоформе.
4. В чем состоит принцип комплементарности в строении нуклеиновых кислот? В чем суть правил Чаргаффа?
5. Какие взаимодействия обеспечивают удержание взаимозакрученных дезоксирибонуклеотидных- цепей в составе биспиральной молекулы ДНК?
6. Какие волокнисто-кристаллические структуры ДНК выявлены в настоящее время?
7. Каковы основные параметры (шаг, число пар нуклеотидных остатков на виток, расстояние между нуклеотидными остатками по высоте, диаметр) двойной-спирали ДНК, находящейся в В-форме?
8. Каковы различия в химическом составе молекул ДНК и РНК?
9. Каковы функции ДНК и РНК в клетке?
10. Какова классификация РНК? Дайте краткую характеристику наиболее важным РНК.
11. Напишите структурные формулы нижеперечисленных соединений: а) нуклеотидов: фУ, фдГ, дЦф, Аф, дайте им полные названия; б) фрагмента ДНК: фдЦфдТфдАфдГ, комплементарный ему фрагмент, покажите образование между ними водородных связей; в) фрагмент антикодонной ветви тРНК<sup>вал</sup> из дрожжей: фУфИфАфЦфАфЦ.
12. В-форма кристаллической ДНК устойчива в условиях 97% относительной влажности. Если влажность изменить до 76%, то происходит переход В-формы в А-форму. Вычислите, на какую величину (мкм) изменится длина фрагмента ДНК, молекулярная масса которого равна 1 млн Да, если из В-формы он перейдет в А-форму.
13. Осуществите нижеперечисленные превращения с использованием структурных- формул всех компонентов:
  - а) (ф) УГА (ОН) + Н<sub>2</sub>О →?
  - б) (ф) (дАдГдТдЦ (ОН)) + Н<sub>2</sub>О →?
  - в) 3<sup>1</sup>-фосфатгуанозин → гуанозин → гуанин г)
  - 5<sup>1</sup>-фосфатдезоксицитидин → дезоксицитидин → цитозин

## ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Распад нуклеиновых кислот в организме идет достаточно энергично, но разные– виды нуклеиновых кислот распадаются с разной скоростью. Медленно распадаются ядерные ДНК. Существуют долгоживущие РНК (до суток) и короткоживущие– РНК (от одного до нескольких часов), скорость распада мРНК оказывает сильное воздействие на скорость белкового синтеза.

Распад нуклеиновых кислот идет при посредстве ферментов – *нуклеаз*, которые– ускоряют реакции гидролитического разрыва 3<sup>1</sup>,5<sup>1</sup>-фосфодиэфирных связей– либо по 3<sup>1</sup>-эфирной связи (*5<sup>1</sup> нуклеазы*), либо по 5<sup>1</sup>-связи (*3<sup>1</sup> нуклеазы*).

Различают *эндонуклеазы*, гидролизующие связи внутри молекулы одновременно во многих точках с образованием олигонуклеотидов различной величины, и *экзонуклеазы*, которые катализируют гидролиз концевых связей, отделяя один нуклеотид за другим от одного из концов нуклеотидной цепи. В зависимости от специфичности к субстрату нуклеазы делят на две группы: *рибо- нуклеазы* и *дезоксирибонуклеазы* –.

Помимо этих ферментов, открыты еще *рестриктазы* ДНКазного типа действия, катализирующие распад чужеродной ДНК в строго определенных участках– молекулы, имеющих палиндромную структуру.

В живой клетке нуклеазы осуществляют различные важные функции на многих стадиях биохимических превращений ДНК и РНК, включая рекомбинацию генов.

Помимо гидролитических нуклеаз, имеются ферменты, катализирующие распад РНК посредством трансферазной реакции. Они катализируют перенос остатка фосфорной кислоты от 5<sup>1</sup>-углеродного атома рибозы одного мононуклеотида к 2<sup>1</sup>-углеродному атому соседнего мононуклеотида, сопровождающийся разрывом 3<sup>1</sup>,5<sup>1</sup>-фосфодиэфирной связи и образованием 2<sup>1</sup>,3<sup>1</sup>-фосфодиэфирной связи в одном мононуклеотиде.

Мононуклеотиды, представляющие собой конечные продукты ферментативного распада нуклеиновых кислот, принадлежат к наиболее сложным метаболитам.

Первая ступень распада мононуклеотидов состоит в отщеплении остатка фосфорной кислоты и образовании нуклеозида, который в свою очередь может распадаться до азотистого основания и пентозы или пентоза-1-фосфата.

Дальнейший распад азотистых оснований происходит в результате дезаминирования и окислительно-восстановительных процессов.

Распад пуринов и пиримидинов протекает различными путями. Пурины (аденин, гуанин) в результате реакций окисления превращаются в мочевую кислоту– (конечный продукт у человека, птиц, приматов), у большинства животных и растений мочевая кислота превращается в аллантаин. У костистых рыб – в аллантаиновую– кислоту, у амфибий, большинства растений – в мочевину и глиоксильную кислоту.

Пиримидины (урацил, цитозин, тимин) в процессе распада вначале восстанавливаются, затем происходит гидролитическое расщепление их циклической структуры с образованием углекислого газа, аммиака, β-аминокислот.

Деструкцию нуклеиновых кислот изучают выявлением активности нуклеаз. Чаще всего пользуются измерением экстинкции при 260 нм до и после ферментативного- гидролиза ДНК и РНК. Активность нуклеаз измеряют также по изменению- вязкости раствора ДНК в процессе гидролиза и по величине гиперхромного- эффекта.

Кроме того, пользуются методами измерения содержания фосфата, пентоз, а также конечных продуктов распада пуриновых и пиримидиновых оснований.

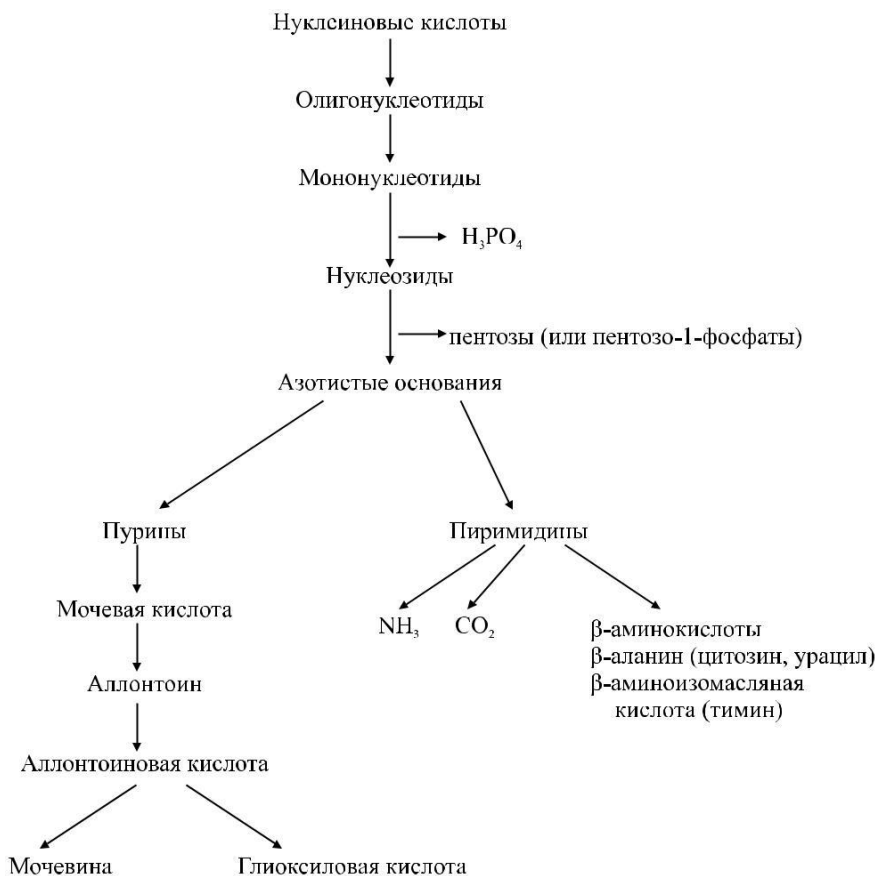


Схема распада нуклеиновых кислот

## Работа 22. Определение активности рибонуклеазы спектрофотометрическим методом

Под действием рибонуклеазы происходит расщепление молекулы РНК до олиго- и мононуклеотидов, количественное определение которых проводят спектрофотометрически при 260 нм (максимум поглощения нуклеотидов).

### Реактивы и оборудование:

*Раствор очищенной дрожжевой РНК (1 мг/мл) в 0,1 М растворе ацетата натрия: 5 г РНК растворяют в 50 мл 0,1 М ацетатного буфера (рН 5,2) и диа-лизуют в течение ночи на холоде против этого буфера. Затем РНК осаждают двойным объемом 96% этанола, центрифугированием при 1 800 оборотах в течение 45 минут отделяют осадок. Полученный осадок РНК промывают 96% этанолом и эфиром, затем высушивают в вакуумном эксикаторе: 0,2% водный раствор панкреатической РНК-азы; спиртово-магниевый осадитель (80% этанол-, содержащий 0,02 М  $MgCl_2$  в 1 л). Реактивы готовить непосредственно перед работой. Холодильник, центрифуга, спектрофотометр, термостат, пипетки- на 1 мл, пробирки.*

**Ход работы:** В центрифужные пробирки вносят 0,4 мл дрожжевой РНК и 0,2 мл водного раствора РНК-азы, перемешивают и ставят в термостат при 37 °С на 30–60 минут. По истечении времени реакцию останавливают, добавляя к содержимому- пробирки 1мл спиртово-магниевый осадителя и помещают на 1 час в ледяную баню. Затем проводят центрифугирование (8 000 g, 20 минут при охлаждении-) для удаления осадка РНК.

Из центрифугата отбирают пробы по 0,5 мл, прибавляют к каждой по 3 мл дистиллированной воды, перемешивают и измеряют оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре против дистиллированной воды. Параллельно обрабатывают контрольную пробу, в которую осадитель вносят до прибавления раствора РНК-азы.

Прирост поглощения в опытной пробе по отношению к контрольной служит показателем активности РНК-азы и используется для расчета активности фермента- по формуле:  $A = \Delta E_{260} \cdot V_1 \cdot V_2 / (V_3 \cdot t \cdot W)$ , где  $E_{260}$  — прирост экстинкции опытной- пробы по отношению к контрольной;  $t$  — время инкубации (в мин.);  $V_1$  — объем пробы после разбавления (мл);  $V_2$  — объем пробы после осаждения РНК спиртово--магниевым раствором (мл);  $V_3$  — объем пробы, взятой для разбавления (мл);  $W$  — масса- фермента (РНК-азы) в пробе (мг).

Вместо раствора панкреатической РНК-азы можно использовать слюну, разбавленную- в 10 раз мочу, кровь животных, разведенную в 100 раз.

## Работа 23. Определение содержания мочевой кислоты в моче

Определение мочевой кислоты основано на ее способности восстанавливать фосфорно-вольфрамовый реактив в фосфорно-вольфрамовую синь.

Количество фосфорно-вольфрамовой сини определяют путем титрования гексациано-(III)-ферратом калия. Этим методом мочевую кислоту определяют в образцах, не содержащих белка.

### **Реактивы и оборудование:**

*Трихлоруксусная кислота (20%); карбонат натрия (20%); гексациано-(III)-феррат калия: 1 г соли и 1 г NaOH растворяют в 50 мл воды; фосфорно-вольфрамовый реактив: 10 г вольфрамата натрия, 8 мл 85% фосфорной кислоты- и 90 мл воды кипятят в течение 2 часов в колбе с обратным холодильником, после охлаждения доводят объем до 100 мл водой; стандартный раствор мочевого кислоты: 100 мг чистой, хорошо высушенной мочевого кислоты заливают раствором, содержащим 200 мг гидрофосфата натрия и 400 мг дигидрофосфата- натрия. Смесь подогревают до растворения солей и после охлаждения доводят объем водой до 200 мл. Центрифуга, колбы конические на 50 мл, бюретки на 25 мл, пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл.*

**Ход работы:** 1. Приготовление безбелкового препарата мочи. К 5 мл мочи прибавляют- равный объем 20% раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивают; осадок белков отделяют центрифугированием (3 000 г, 10–15 мин.).

2. Качественная реакция на мочевую кислоту. К 5 мл безбелковой мочи приливают- 2 мл фосфорно-вольфрамового реактива и 10 мл 20% раствора карбоната натрия. Смесь тщательно перемешивают. При этом появляется синее окрашивание, интенсивность которого пропорциональна количеству мочевого кислоты.

3. Титрование. Полученную окрашенную пробу осторожно, по каплям, титруют- раствором гексациано-(III)-ферратом калия до обесцвечивания.

4. Определение количества мочевого кислоты (мг), соответствующей 1 мл гексациано-(III)-феррата калия. Смешивают 0,5 мл стандартного раствора (0,25 мг мочевого кислоты) с 2 мл фосфорно-вольфрамового реактива и 5 мл 20% раствора карбоната натрия. Образовавшуюся после перемешивания синь титруют- раствором гексациано-(III)-феррата калия до обесцвечивания. 1 мл гексациано-(III)-феррата калия соответствует (0,25, деленному на объем пошедшего на титрование гексациано-(III)-феррата калия) количеству (мг) мочевого кислоты-. Например, на титрование стандартной пробы (содержащей 0,25 мг мочевого кислоты в 0,5 мл) пошло 3,4 мл гексациано-(III)-феррата калия, следовательно, 1 мл реактива соответствует  $(0,25 : 3,4) 0,073$  мг мочевого кислоты.

5. Расчет. Массовую концентрацию мочевого кислоты (мг) в суточной моче вычисляют по формуле:  $C = m \cdot A \cdot B / V$ , где  $m$  — количество мочевого кислоты, соответствующее- 1 мл гексациано-(III)-феррата калия (мг);  $A$  — количество гексациано-(III)-феррата калия, затраченное на титрование пробы (мл);  $B$  — суточное количество мочи (1 500);  $V$  — объем мочи, взятой для исследования (мл).

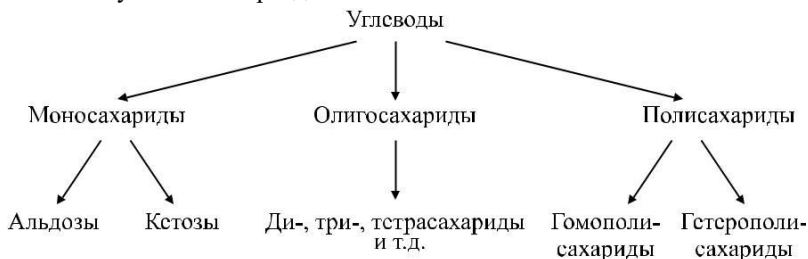
## Вопросы и задания для самопроверки

1. Каковы пути распада нуклеиновых кислот? Какие ферменты участвуют в деструкции РНК и ДНК? Дайте им краткую характеристику.
2. На какие фрагменты распадается олигорибонуклеотид (ф) АЦЦУТГГУУАА (ОН) под действием а) 5<sup>1</sup>-эндорибонуклеазы, б) экзонуклеазы.
3. Какие соединения образуются в результате действия на олигодезоксирибонуклеотид (ф) ЦТГААЦАТЦГА (ОН): а) ДНК-азы I, б) ДНК-азы II?
4. К какому классу относятся ферменты, участвующие в превращении: а) аденина в гипоксантин; б) гуанина в ксантин? Напишите уравнения реакций этих превращений.
5. Какие соединения образуются при превращении мочевой кислоты в мочевины у большинства животных и растений? Напишите уравнения реакций, укажите ферменты.
6. Каким путем и с помощью каких ферментов осуществляется превращение урацила в β-аланин, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>?
7. Осуществите нижеперечисленные превращения с использованием структурных формул всех компонентов; назовите ферменты, участвующие в этих превращениях:
  - а) 5<sup>1</sup>-фосфатаденозин → аденозин → аденин → гипоксантин → ксантин → мочевая кислота;
  - б) тимин → дигидротимин → N-карбамил-β-аминоизомасляная кислота → β-аминоизомасляная кислота; в) оротовая кислота → оротидин-5<sup>1</sup>-фосфат → уридин-5<sup>1</sup>-фосфат.
8. Каковы основные этапы биосинтеза пиримидиновых нуклеотидов и какие ферменты участвуют в этом процессе?
9. Какие соединения используются в качестве исходных при биосинтезе пуриновых оснований?
10. В чем состоит роль 5<sup>1</sup>-фосфорибозил-1<sup>1</sup>-пирофосфата в реакциях биосинтеза пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов?
11. Каков механизм воспроизведения первичной структуры при биосинтезе нуклеиновых кислот?
12. Каковы основные этапы биосинтеза ДНК и к чему сводится роль белковых факторов при репликации? Каков механизм ДНК-полимеразной реакции?
13. Какие ферменты принимают участие в биосинтезе РНК? Дайте характеристику основным этапам транскрипции.
14. В чем состоит отличие пре-мРНК от мРНК? Какие процессы происходят при образовании зрелой мРНК?
15. Какой процесс называют обратной транскрипцией? Как называют фермент, ускоряющий обратную транскрипцию?

## ГЛАВА 5. УГЛЕВОДЫ

Углеводы входят в состав клеток и тканей всех растительных и животных организмов. По массе углеводы составляют основную часть органического вещества на земле. Углеводы в живой природе имеют большое значение как источники запасной энергии в метаболических процессах: крахмал — в растениях; гликоген — в животных. Углеводы служат строительным материалом для многих организмов: целлюлоза — клеточные стенки растений, мурамин — бактерий, хитин — грибов и т. д. Углеводы являются составными частями важнейших веществ, таких как нуклеиновые кислоты, липиды, белки, выполняющих в организме сложные и важные функции.

Углеводы составляют обширную группу соединений, которая делится на *моносахариды* (простые сахара) и продукты их конденсации *олиго- и полисахариды* (сложные сахара). Моносахариды — это простейшие углеводы, не подвергающиеся гидролизу. Сложные углеводы способны гидролизироваться. Олигосахаридами называются углеводы, гидролизующиеся с образованием 2–10 молекул моносахаридов. Полисахариды — высокомолекулярные углеводы, при гидролизе которых образуются сотни и тысячи молекул моносахаридов.



### СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА УГЛЕВОДОВ

#### 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.

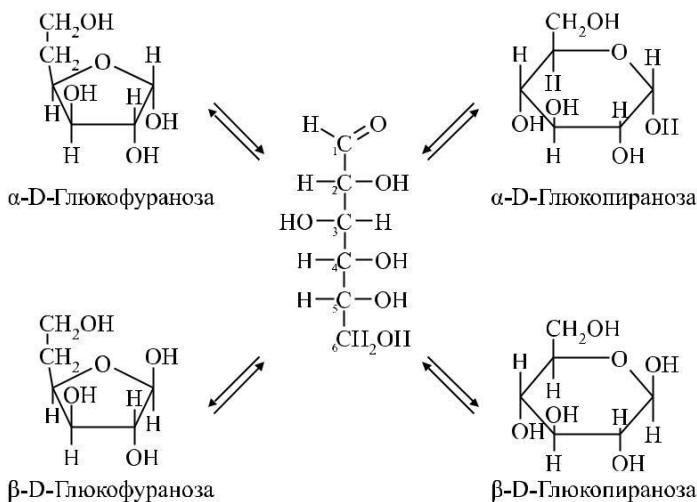
Важнейший природный моносахарид *D-глюкоза* является альдозой, содержащей шесть углеродных атомов, пять из которых имеют гидроксильные группы. Четыре углеродных атома (C-2 — C-5) являются хиральными центра-

ми, кроме D-глюкозы существует 15 изомерных альдогексоз, лишь немногие из них встречаются в природе. У большинства природных моносахаридов С-5 имеет конфигурацию глициринового 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 циклической полуацетала, образованной взаимодействием карбонильной группы с одной из гидроксильных групп. В альдогексозах реакция идет главным образом с гидроксильной группой С-5, с образованием шестичленного пиранозного цикла. Если в реакцию вступает гидроксильная группа С-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 (проекция Хеурса). 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 Хеурса) 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).

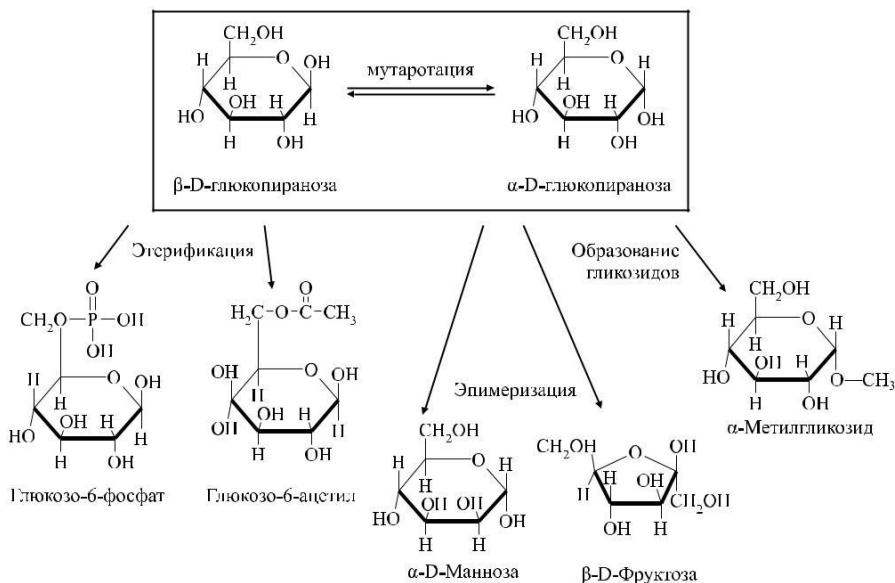
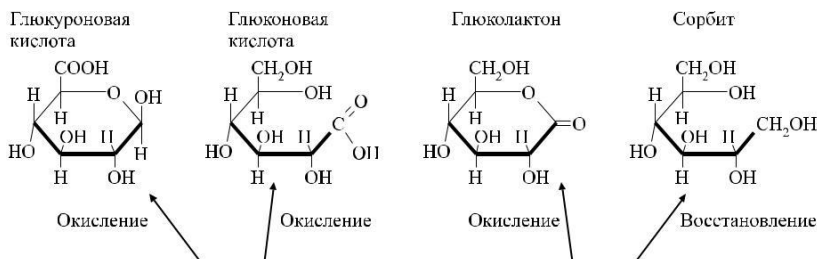
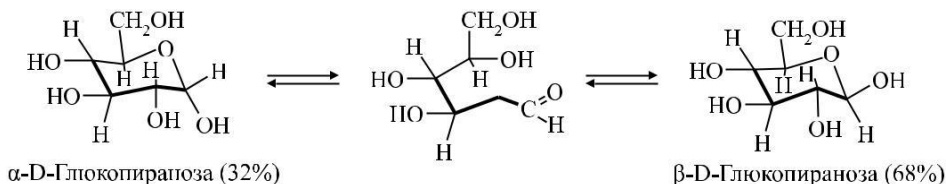


Схема химических превращений D-глюкозы

Конформационное строение D-глюкопиранозы объясняет уникальность этого моносахарида.  $\beta$ -D-Глюкопираноза — единственный моносахарид с полным экваториальным расположением заместителей. Обусловленная этим вы-сокая термодинамическая устойчивость — основная причина широкой распространенности D-глюкозы в природе.

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. Так, водный раствор D-глюкозы после добавления к нему известковой воды через 5 суток имеет состав: D-глюкозы (63,5%), D-маннозы (2,5%) и D-фруктозы (31%).

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, дифениламином и др. с образованием окрашенных продуктов. Цветные реакции на моносахариды используются в количественном анализе, а также в хроматографии.

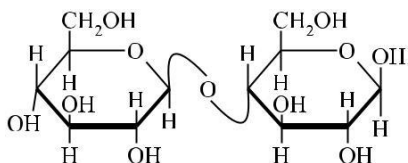
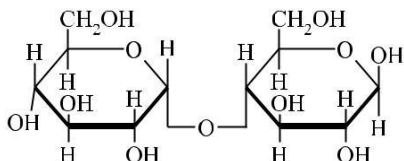
## Дисахариды

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*).

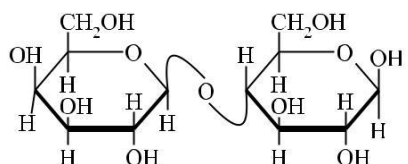
В природе в виде самостоятельно существующих дисахаридов встречается ограниченное число, основные из них мальтоза, целлобиоза, лактоза, сахароза. Значительно шире распространены дисахаридные фрагменты, входящие в состав гликозидов растительного и бактериального происхождения.

$\beta$ -Мальтоза (солодовый сахар) — основной продукт гидролиза крахмала под действием фермента  $\beta$ -амилазы.

В мальтозе остатки двух молекул D-глюкопиранозы связаны  $\alpha$ -1,4-гликозидной связью, которая образуется полуацетальным гидроксилом в  $\alpha$ -положении со спиртовым гидроксилом С-4 второй молекулы, а свободный полуацетальный гидроксил может иметь как  $\alpha$ - ( $\alpha$ -мальтоза), так и  $\beta$ -конфигурацию ( $\beta$ -мальтоза).



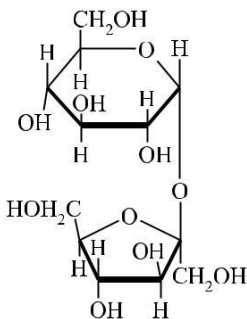
$\beta$ -Целлобиоза, как и мальтоза, состоит из двух D-глюкопиранозных остатков, связанных 1,4-гликозидной связью, однако она имеет  $\beta$ -конфигурацию.



$\beta$ -Лактоза (молочный сахар) — важнейший углеводный компонент молока млекопитающих. В коровьем молоке содержится до 4,5% лактозы, в женском молоке — до 7,5%.

Лактоза состоит из остатков  $\beta$ -D-галактопиранозы и D-глюкопиранозы, связанных  $\beta$ -1,4-гликозидной связью, в образовании которой принимают участие аномерный атом галактопиранозы, имеющий  $\beta$ -конфигурацию, и спиртовой гидроксил С-4 D-глюкопиранозы. Аномерный атом глюкопиранозного фрагмента может иметь как  $\alpha$  ( $\alpha$ -лактоза), так и  $\beta$ -конфигурацию ( $\beta$ -лактоза).

Сахароза состоит из  $\alpha$ -D-глюкопиранозы и  $\beta$ -D-фруктофуранозы.



В сахарозе обе аномерные ОН-группы связаны гликозидной связью, и, следовательно, сахароза относится к невосстанавливающим дисахаридам. В растениях сахароза является растворимым резервным сахаром.

Дисахариды вступают во многие реакции, характерные для моносахаридов, образуют простые и сложные эфиры, окисляются (восстанавливающие дисахариды), гидролизуются, растворы восстанавливающих дисахаридов мутаротируют.

Сахароза (невосстанавливающий дисахарид) не проявляет восстанавливающих свойств и ее растворы не мутаротируют.

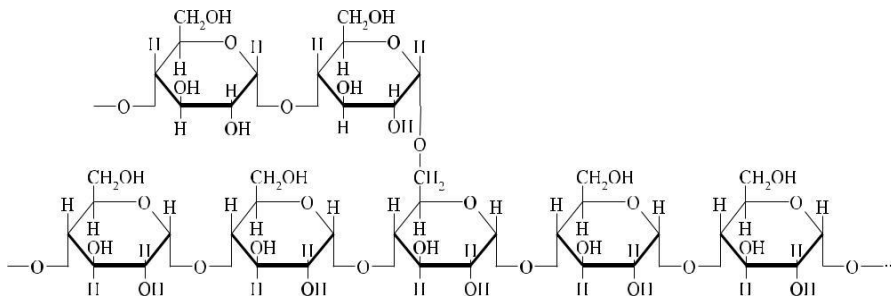
## Полисахариды

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.

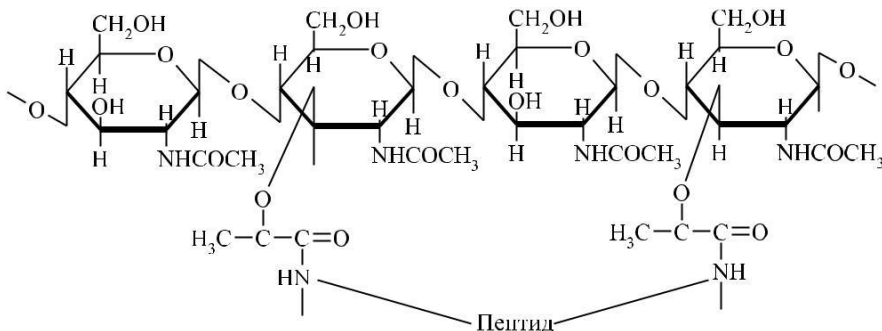
Полисахариды, построенные из моносахаридных звеньев одного типа, называются- *гомогликанами*, а построенные из различных моносахаридных звеньев — *гетерогликанами*. К группе гомогликанов относятся многие полисахариды растительного- (крахмал, целлюлоза, пектиновые вещества), животного (гликоген, хитин),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

Полисахариды могут быть линейными и разветвленными.

В качестве примера разветвленного гомогликана можно представить фрагмент молекулы гликогена.



Гликоген построен из остатков D-глюкопиранозы, связанных в положении  $\alpha$ -1,4. В гликогене точки ветвления располагаются в среднем через каждые 8–10 остатков глюкозы. Связи в точках ветвления находятся в положении  $\alpha$ -1,6.



Сложную структуру имеет линейный гетеропептидогликан муреин. В муреине чередуются остатки двух различных моносахаридов, связанных в положении  $\beta$ -1,4: N-ацетилглюкозамин и N-ацетилмурановая кислота.

Таблица 15. Важнейшие представители полисахаридов

| Полисахарид          | Моносахарид 1             | Моносахарид 2              | Тип связи                    | Тип связи в точках ветвления- | Источник   |
|----------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|--|
| Мурамин              | N-ацетил-глюкозамин       | N-ацетил-мурановая кислота | $\beta$ -1,4                 | —                             | Клеточные стенки бактерий  |
| Декстран             | $\alpha$ -D-глюкопираноза | —                          | $\alpha$ -1,6                | $\alpha$ -1,3                 | Слизи бактерий   |
| Крахмал              | $\alpha$ -D-глюкопираноза | —                          | $\alpha$ -1,4                | $\alpha$ -1,6                 | Хлоропласт листьев, плоды, семена, клубни растений                       |
| Целлюлоза            | $\beta$ -D-глюкопираноза  | —                          | $\beta$ -1,4                 | —                             | Клеточные стенки растений  |
| Агароза              | D-галактоза               | 3,6-ангидро-галактоза      | $\beta$ -1,4                 | $\beta$ -1,3                  | Красные водоросли (агар)   |
| Инулин               | D-фруктоза                | —                          | $\beta$ -2,1                 | —                             | Запасные клетки растений   |
| Гликоген             | D-глюкопираноза           | —                          | $\alpha$ -1,4                | $\alpha$ -1,6                 | Печень, мышцы человека, животных   |
| Хитин                | N-ацетил-глюкозамин       | —                          | $\beta$ -1,4                 | —                             | Наружный скелет насекомых, ракообразных, клеточные стенки мицелия грибов |
| Гиалуроновая кислота | N-ацетил-глюкозамин       | Глюкуроновая кислота       | $\beta$ -1,4<br>$\beta$ -1,3 | —                             | Соединительные ткани человека и животных                                 |

На конце полисахаридных цепей находится восстанавливающий остаток моносахарида. Поскольку доля концевого остатка относительно всей макромолекулы весьма невелика, то полисахариды проявляют очень слабые восстанавливающие свойства.

Гликозидная природа полисахаридов обуславливает их легкий гидролиз в кислой среде и высокую устойчивость в щелочной среде.

Полисахаридам присущ характерный для высокомолекулярных веществ более высокий уровень организации макромолекул. Наряду с первичной структурой, т. е. определенной последовательностью мономерных остатков, важную роль играет вторичная структура, определяемая пространственным расположением макромолекулярной цепи.

## Работа 24. 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 биологических жидкостях (моче, крови).

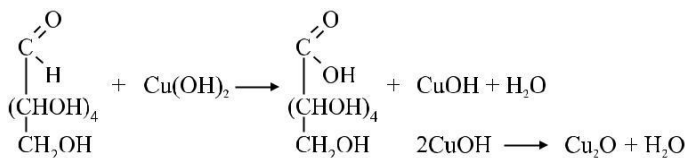
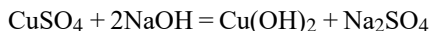
В зависимости от условий окисления моносахаридов образуются различные продукты. В щелочной среде альдозы способны восстанавливать катионы металлов- (меди, серебра, висмута), соли при этом окисляются с образованием различных продуктов окисления.

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

### **Реактивы и оборудование:**

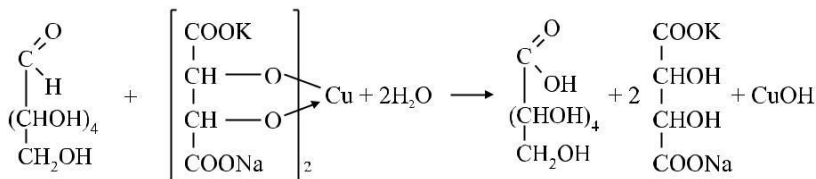
Глюкоза (5%); гидроксид натрия (5%); сульфат меди (5%); нитрат серебра (5%); водный раствор аммиака (10%); реактив Фелинга: А. 200 г сегнетовой соли и 150 г гидроксида натрия растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1 л; Б. 40 г перекристаллизованного сульфата меди растворяют в дистиллированной воде и доводят объем до 1 л. Равные объемы растворов А и Б смешивают перед началом работы. Штативы с пробирками, стеклянные палочки, пипетки градуированные, горелки, термостат.

### **А. Реакция Троммера**



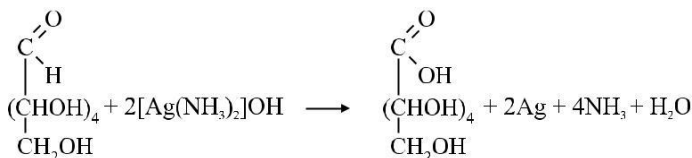
**Ход работы:** К 3 мл 5% раствора глюкозы приливают 1мл 5% раствора щелочи и 5 капель 5% раствора сульфата меди. Содержимое пробирки окрашивается в голубой цвет. Осторожно нагревают содержимое пробирки до кипения. Наблюдают выпадение желтого осадка гидроксида меди (I) или красного осадка оксида меди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

## Б. Реакция Фелинга



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

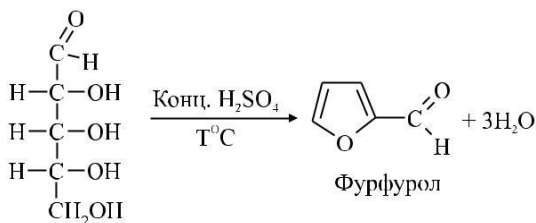
## В. Реакция серебряного зеркала по Толленсу



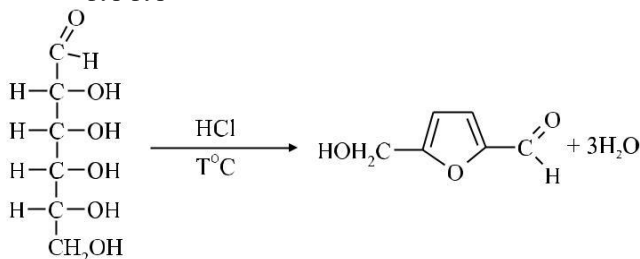
**Ход работы:** В пробирку наливают 1 мл раствора нитрата серебра, 1 мл раствора гидроксида натрия и по каплям водный раствор аммиака до растворения образующегося серого осадка. Затем к содержимому пробирки добавляют 3 мл раствора глюкозы, перемешивают и осторожно нагревают в пламени горелки до появления 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 HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> дают 5-гидроксиметил-фурфурол:



Фурфурол и 5-гидроксиметилфурфурол 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-гидроксиметилфурфурол — красное окрашивание с резорцином. Некоторые из этих химических реакций используют в количественном анализе, а также в хроматографии.

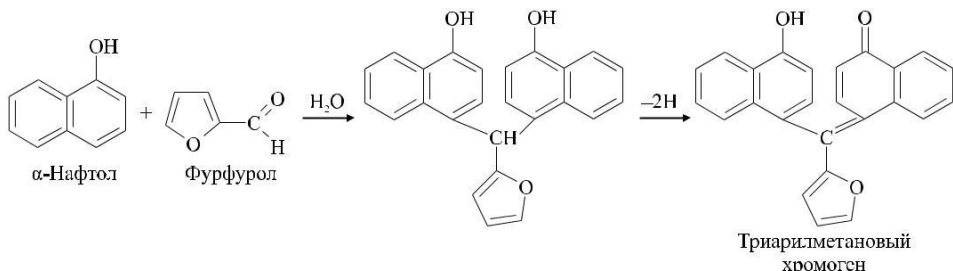
#### Реактивы и оборудование:

Глюкоза (1%); рибоза (0,1%); спиртовой раствор  $\alpha$ -нафтола (1%); серная кислота (конц.); фруктоза (1%); реактив Селиванова: 0,05 г резорцина растворяют в 100 мл разбавленной (1:1) соляной кислоты; соляная кислота (конц.); кристаллический орцин. Штатив с пробирками, стеклянные палочки, термостат, градуированные пипетки, часы.

#### А. Реакция Подобедова — Молиша

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

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

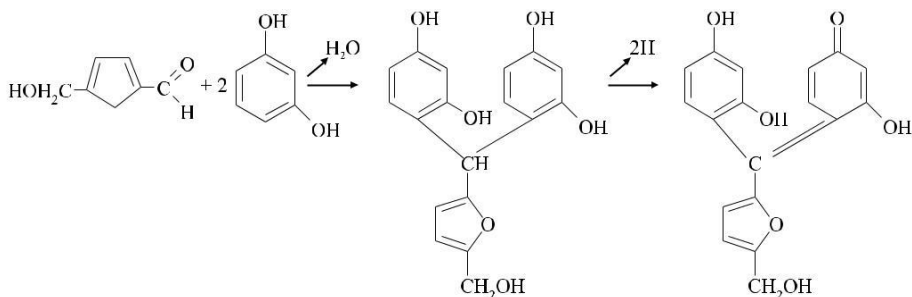




**Ход работы:** Берут две пробирки: в одну приливают 5 мл 0,1% раствора рибозы, в другую — 5 мл 1% раствора глюкозы и в обе пробирки добавляют по 2 мл 1% спиртового раствора  $\alpha$ -нафтола и осторожно по стенке каждой про-бирки приливают по 3 мл концентрированной серной кислоты, которая опуска-ется на дно пробирок. На дне или на границе раздела жидкостей образуются красно-фиолетовые кольца.

### Б. Реакция Селиванова

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

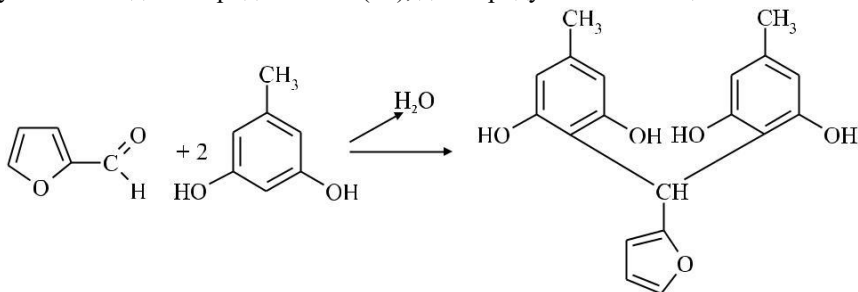


Альдозы также дают эту реакцию, но она у них протекает значительно медленнее, что обуславливает специфичность реакции Селиванова на кетогексозы.

**Ход 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  $80^\circ\text{C}$  и остав-ляют на 8 минут. За это время в пробирке с фруктозой появляется вишнево-красное окрашивание.

### В. Реакция Биля

Фурфурол (продукт дегидратации пентоз), конденсируя с орцином в при-сутствии следов хлорида железа (III), дает продукт зеленого цвета.



**Ход работы:** В пробирку приливают 2 мл 1% раствора рибозы, 2 мл концентрированной соляной кислоты, затем помещают несколько кристаллов орцина и тщательно перемешивают. Помещают пробирку в термостат при 100 °С и вы-держивают 6 минут. По истечении времени наблюдают образование зеленого окрашивания.

### ***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 невосстанавливающих дисахаридов используют методы, в основе которых лежит гидролиз дисахаридов с последующим обнаружением продуктов гидролиза.

### **Реактивы и оборудование:**

*Мальтоза (5%), лактоза (5%), сахароза (5%), соляная кислота (конц. и 25%), гидроксид натрия (5%), кристаллический резорцин, кристаллический бикарбонат натрия. Штатив с пробирками, пипетки градуированные, капельницы, термометр, термостат, горелки, часы.*

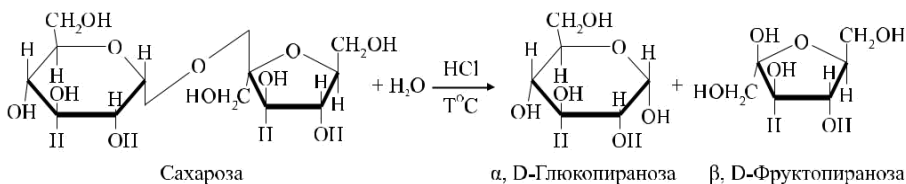
#### ***А. Восстанавливающая способность лактозы и мальтозы***

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.

**Ход работы:** В одну пробирку наливают 2 мл 5% раствора лактозы, в дру-гую — 2 мл 5% раствора глюкозы. В обе пробирки затем приливают по 1 мл рас-твора гидроксида натрия и по 5 капель раствора сульфата меди. Пробирки осто-рожно нагревают в пламени горелки и наблюдают образование красного осадка.

#### ***Б. 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.



**Ход 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.

### *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.

### **Реактивы и оборудование:**

*Крахмал (0,1% и 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; соляная кислота (конц.); вата (источник клетчатки); серная кислота (80% и 3%); реактив Фелинга; гидроксид натрия (5%); сульфат меди (5%); кристаллический гидрокарбонат натрия. Штативы с пробирками, стеклянные палочки, градуированные пипетки-, капельницы, термостат.*

### **А. 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.

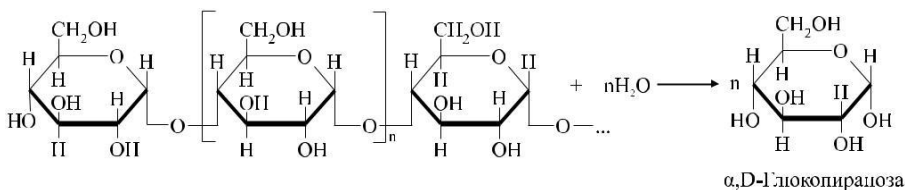
При нагревании окраска исчезает, но появляется опять при охлаждении, что свидетельствует об образовании нестойких комплексов крахмала и гликогена с йодом.

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.

**Ход 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.

### ***Б. Гидролиз крахмала и обнаружение продуктов гидролиза***

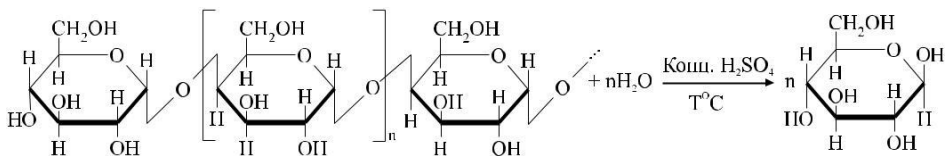
При нагревании крахмала с минеральными кислотами происходит полный гидролиз с образованием глюкозы, которую можно обнаружить качественными реакциями.



**Ход 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 или Фелинга. Наблюдают- изменение окраски в пробирке с гидролизатом и отсутствие таковой в контрольной пробе.

### ***В. Гидролиз целлюлозы и обнаружение продуктов гидролиза***

Целлюлоза не расщепляется ферментами желудочно-кишечного тракта человека. Гидролиз целлюлозы минеральными кислотами происходит значительно- но медленнее, чем крахмала, и требует предварительной обработки целлюлозы 80% раствором серной кислоты.



**Ход работы:** Небольшое количество ваты (100–200 мг) помещают в пробирку, заливают 3% раствором серной кислоты и кипятят 10–15 минут. В другой пробирке- такое же количество ваты обрабатывают небольшим количеством 80% раствора серной кислоты (около 0,5 мл) до полного растворения ваты, за-

тем добавляют– дистиллированную воду (примерно 0,5–1 мл) и кипятят 5 минут. После охлаждения содержимое пробирок нейтрализуют бикарбонатом натрия и проводят– реакцию Фелинга.

Положительная реакция Фелинга свидетельствует о том, что произошел гидро-лиз целлюлозы и образовался восстанавливающий продукт –  $\beta$ , D-глюкопираноза.

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ УГЛЕВОДОВ

Для количественного определения моносахаридов в крови используются редуктометрические, фотоколориметрические, энзиматические методы.

Редуктометрические методы основаны на восстановительных свойствах моносахаридов. Недостаток этих методов состоит в том, что они неспецифичны, так как присутствующие в крови редуцирующие вещества, не являющиеся углеводами, также обладают восстанавливающими свойствами, и полученные результаты включают всю сумму восстанавливающих соединений в крови.

Фотоколориметрические методы основаны на определении степени интенсивности окраски соединений, образующихся при взаимодействии моносахаридов с определенными веществами. Метод специфичен и точен.

Энзиматические методы основаны на доставке фермента глюкозооксидазы, окисляющей глюкозу до глюконовой кислоты кислородом воздуха. Этот метод специфичен и широко применяется в клинико-диагностических лабораториях.

### Работа 25. Определение содержания фруктозы в сыворотке крови фотоколориметрическим методом

Определение фруктозы основано на превращении фруктозы в 5-гидроксиметилфурфурол (см. работу 24), образующий с резорцином окрашенный продукт. Хотя реакцию Селиванова дают также и альдогексозы (например, глюкоза), скорость образования оксиметилфурфуrolа из фруктозы во много раз больше, что и обуславливает специфичность этой реакции для фруктозы.

Содержимое фруктозы вычисляют на основе измерения оптической плотности окрашенных растворов продуктов конденсации оксиметилфурфуrolа и резорцина при 490–510 нм на фотоэлектроколориметре. В крови взрослого человека содержится 0,1–0,5 мг/100мл (5,55–27,75 мкмоль/л) фруктозы.

#### Реактивы и оборудование:

*Сыворотка крови; резорцин (0,1% в 95% этаноле); соляная кислота (10 н.); стандартный раствор фруктозы: 0,25 г фруктозы, взятые с точностью  $10^{-4}$  г, растворяют в 100 мл воды в мерной колбе; хлорная кислота 0,1 н. Фотоэлектроколориметр-, центрифуга, пробирки, воздушные обратные холодильники, колбы мерные на 100 мл, пипетки на 2, 5, 10 мл, микропипетки, термостат.*

**Ход работы:** В центрифужную пробирку вносят 0,1 мл сыворотки крови, затем– 2,5 мл 1 н. раствора хлорной кислоты ( $\text{HClO}_4$ ), перемешивают, выдерживают 15 минут, после чего центрифугируют 5 минут при 5 000 об./мин.

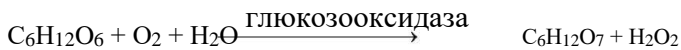
Берут три пробирки: в первую пробирку вносят 1 мл центрифугата; во вторую пробирку — 1 мл смеси, состоящей из 0,1 мл стандартного раствора фруктозы и 2,5 мл 1 н. раствора хлорной кислоты; в третью пробирку (контроль) — 1 мл смеси, состоящей из 0,1 мл дистиллированной воды и 2,5 мл 1 н. раствора хлорной кислоты.

Во все пробирки приливают по 1 мл 0,1% спиртового раствора резорцина и 3 мл 10 н. раствора соляной кислоты, закрывают пробками с воздушным холодильником и ставят в термостат при 80 °С. Через 8 минут быстро охлаждают водопроводной водой. Выдерживают при комнатной температуре 5 минут, затем измеряют оптическую плотность содержимого пробирок № 1 и 2 против контроля- (пробирка № 3) при 490–510 нм в кювете шириной 1 см (или 0,5 см).

Содержание фруктозы в сыворотке крови рассчитывают по формуле:  $C = E_1 \cdot a / E_2$ , где  $E_1$  — оптическая плотность сыворотки крови,  $E_2$  — оптическая плотность стандартного раствора фруктозы, а — количество фруктозы в пробе стандартного раствора (в мкг).

### Работа 26. Определение глюкозы энзиматическим методом

Метод основан на каталитическом действии глюкозооксидазы, ускоряющей окисление глюкозы кислородом воздуха до глюконовой кислоты:



Образующийся в эквимольном количестве пероксид водорода под действием пероксидазы разлагается, а выделившийся атомарный кислород окисляет добавленный к реакционной смеси хромогенный кислородный акцептор (о-толидин). Количественное определение глюкозы сводится к измерению оптической плотности образовавшегося в опыте, окрашенного в синий цвет соединения.

Этот метод предназначен для специфического определения содержания глюкозы в биологических жидкостях после удаления белков в присутствии других сахаров и редуцирующих веществ неуглеводной природы.

#### Реактивы и оборудование:

*Сульфат цинка (5%); гидроксид натрия (0,3 н.); хлорид натрия (0,9%); о-толидин (1%, перекристаллизованный в абсолютном этаноле); ацетат-ный буфер (0,25 н., рН 4,8): 4 части уксусной кислоты (0,25 н.) смешивают с 6 частями ацетата натрия (0,25 н.); стандартный раствор глюкозы (50, 100, 200 мкг/мл), приготовленный на насыщенном водном растворе бензойной кислоты; рабочий реактив: к 70–80 мл 0,25 н. ацетатного буфера (рН 4,8) добавляют 2 мг препарата глюкозооксидазы и 1 мг сухой кристаллической пероксидазы. Смесь перемешивают, приливают 1 мл 1% раствора о-толидина и доводят объем до 100 мл ацетатным буфером. Реактив готовят за 1–2 часа*

до употребления. Рабочий реактив можно хранить в темной склянке с притертой пробкой в холодильнике- в течение 1,5–2 месяцев. Фотоэлектроколориметр, центрифуга, секундомер-, пипетки, градуированные на 1 и 5 мл, пробирки химические и центрифужные.

**Ход работы:** Осаждают белок из анализируемой биологической жидкости (кровь, сыворотка крови, гемолимфа). С этой целью в центрифужной пробирке смешивают 0,4 мл 5% раствора сульфата цинка, 0,4 мл 0,3 н. раствора гидроксида натрия и 1,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия, затем добавляют 0,1 мл исследуемой- биологической жидкости. Содержимое пробирки тщательно перемешивают- и центрифугируют при 5 000 об./мин. в течение 10–15 минут.

Из центрифужной пробирки переносят в химическую- пробирку 1 мл надосадочной жидкости и приливают 3 мл рабочего реактива для определения глюкозы. Одновременно в три пробирки приливают по 1 мл стандартного раствора глюкозы- соответственно 50, 100, 200 мкг/мл и в две пробирки (контрольные) — по 1 мл воды. Затем во все пробирки с интервалом в 2 минуты приливают- по 3 мл рабочего реактива. Эту последовательность следует соблюдать (интервал 2 минуты) и при измерении оптической плотности растворов.

Через 10 минут после добавления рабочего реактива измеряют оптическую плотность исследуемого и стандартных растворов против контроля на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре (620 нм).

На основании полученных величин оптической плотности для всех стандартных растворов глюкозы строят стандартную кривую, по которой рассчитывают количество глюкозы в исследуемой биологической жидкости.

### Вопросы и задания для самопроверки

---

1. На чем основана классификация углеводов?
2. Докажите некорректность термина «углеводы», приведите примеры.
3. Напишите в ациклической и циклической форме моносахариды: D-рибозу, D-глюкозу, D-маннозу, D-галактозу, D-фруктозу.
4. Напишите проекционные формы по Хеуорсу для  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномерных форм глюкозы, фруктозы, галактозы. В чем состоит основное различие между этими формами?
5. С помощью каких реакций можно доказать наличие в молекуле глюкозы альдегидной группы и пяти гидроксильных групп?
6. С помощью каких реакций можно осуществить следующие превращения: а) сахароза  $\rightarrow$  глюкоза  $\rightarrow$  глюконовая кислота;  
б)  $\text{CO}_2 \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow (\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_5)_n \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ .
7. На чем основаны качественные реакции на углеводы? Каково их практическое значение?
8. На чем основаны методы количественного определения углеводов? Какие методы количественного определения углеводов наиболее достоверны?

9. Напишите уравнения реакций, с помощью которых можно различить глюкозу и фруктозу.
10. Какие моносахариды можно открыть реакцией Селиванова? Напишите уравнения реакций.
11. Какое явление называют реакцией серебряного зеркала? Напишите уравнение реакции.
12. Напишите уравнения реакций дегидратации рибозы и фруктозы в присутствии концентрированной соляной кислоты.
13. В каких условиях протекает гидролиз ди- и полисахаридов? Напишите уравнения реакций гидролиза мальтозы и целлюлозы.
14. Почему дисахарид сахароза не может существовать в двух аномерных формах, тогда как дисахарид мальтоза может существовать в двух  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномерных формах. Изобразите проекционные формы Хеуорса для аномерных форм лактозы и сахарозы.
15. Какими особенностями строения обусловлены различия в свойствах гликогена и целлюлозы? Изобразите схемы строения молекул гликогена и целлюлозы. Каковы биологические функции гликогена и целлюлозы?

### ОБМЕН УГЛЕВОДОВ

Гликолиз — катаболический путь обмена углеводов в цитоплазме, протекает почти во всех организмах и клетках независимо от того, живут они в аэробных или анаэробных условиях. В аэробных условиях молекулы глюкозы деградируют до двух молекул пирувата. В анаэробных условиях пируват претерпевает дальнейшие превращения, при этом образуются продукты брожения, такие как лактат или этанол (анаэробный гликолиз).

Сахара подвергаются метаболическим превращениям преимущественно в виде сложных эфиров фосфорной кислоты.

Глюкоза в АТФ-зависимой реакции, катализируемой гексокиназой, превращается в *глюкозо-6-фосфат*. После изомеризации глюкозо-6-фосфата во *фруктозу-6-фосфат* вновь происходит фосфорилирование с образованием *фруктозо-1,6-дифосфата*. Фосфофруктокиназа, катализирующая эту стадию, является важным ключевым ферментом гликолиза. *Фруктозо-1,6-дифосфат* расщепляется далее альдозой на два фосфорилированных фрагмента:

*глицеральдегид-3-фосфат* и *дигидроксиацетонфосфат*, которые превращаются один в другой триозофосфатизомеразой. *Глицеральдегид-3-фосфат* затем окисляется глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой с образованием НАДН·Н<sup>+</sup>. В этой реакции в молекулу включается неорганический фосфат с образованием *1,3-дифосфоглицерата*. Такое промежуточное соединение содержит смешанную ангидридную связь, расщепление которой является высокоэкзоэргическим процессом.

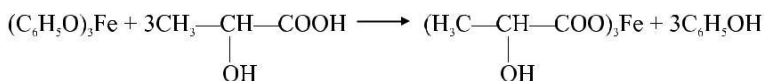
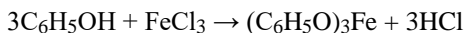


Следующий промежуточный продукт, гидролиз которого может быть сопряжен с синтезом АТФ, образуется в реакции изомеризации *3-фосфо-глицерата* и последующего отщепления воды с образованием *фосфоенолпирувата*. На последней стадии, катализируемой пируваткиназой, образуется *пируват* и АТФ.

При гликолизе на активацию одной молекулы глюкозы потребляется 2 молекулы АТФ, в то же время при метаболическом превращении каждого *C<sub>3</sub>-фрагмента* образуется две молекулы АТФ. В результате выигрывается энергия составляет 2 моля АТФ на моль глюкозы.

### Работа 27. Качественная проба на молочную кислоту

Анаэробный гликолиз в тканях животных завершается образованием молочной кислоты-, которую можно обнаружить с помощью реактива Уффельма-на: комплексный фенолят железа фиолетового цвета в присутствии молочной кислоты превращается в молочнокислое железо желтовато-зеленого цвета.



#### Реактивы и оборудование:

*Фенол (1%), хлорид железа (III) (1%), молочная кислота (0,5–1%), мыши-цы лягушки (свежие), лед. Термостат, воронки, фильтры (марля, бумажные), ступки с пестиком, стеклянные лопаточки, кварцевый песок, штативы с сухими-пробирками.*

**Ход работы:** Мышечную ткань (свежую) измельчают при охлаждении, затем 2–3 г ее растирают с кварцевым песком, добавив 5–7 мл воды, в фарфоровой ступке. Полученную мышечную кашу фильтруют через двойной слой марли. Фильтрат кипятят 1 минуту, охлаждают, затем фильтруют через влажный бумажный-складчатый фильтр.

В три пробирки наливают по 5 мл 1% раствора фенола и по каплям прибавляют 1% раствор хлорида железа (III) до появления интенсивного фиолетового окрашивания (реактив Уффельмана).

Затем в одну пробирку приливают 1 мл 0,5% раствора молочной кислоты, во вторую — вытяжку из мышечной ткани, а в третью — 1 мл дистиллированной воды- (контроль). Содержимое пробирок перемешивают. Наблюдают переход фиолетового окрашивания в первой и второй пробирках в зеленовато-желтый, в третьей — цвет раствора не меняется.

## Вопросы и задания для самопроверки

1. Каково биологическое значение фосфорилирования свободных моносахаридов? Напишите уравнение реакции фосфорилирования глюкозы при участии АТФ.
2. Какой процесс называется гликолизом? Напишите суммарные уравнения аэробного гликолиза и анаэробного спиртового и молочнокислого брожения.
3. В чем состоит различие между гликолизом и гликогенолизом? Приведите схемы этих процессов.
4. Какие реакции гликолиза связаны с процессом субстратного фосфорилирования? Напишите уравнения этих реакций.
5. Каково значение дихотомического и апотомического путей распада глюкозо-6-фосфата в обмене веществ?
6. Какие ферменты катализируют превращение: глюкозо-1-фосфат → глюкозо-6-фосфат → фруктозо-6-фосфат → фруктозо-1,6-дифосфат? Напишите уравнения реакций, протекающих по приведенной выше схеме.
7. Почему при исчерпании запаса неорганического фосфата прекращается процесс брожения, даже если еще не использована вся глюкоза? Укажите, какой гексозодифосфат накапливается при брожении, если ингибировать фермент альдолазу.
8. Какие конечные продукты образуются при аэробном гликолизе, спиртовом и молочнокислом брожении, окислительном декарбоксилировании пирувата? Напишите структурные формулы этих веществ.
9. Каков механизм действия и структура пируватдегидрогеназного комплекса? Приведите уравнения реакций с написанием структурных формул всех компонентов.
10. Напишите уравнения реакций с использованием структурных формул всех компонентов, назовите ферменты, катализирующие процессы, протекающие по приведенным ниже схемам:
  - а) фруктозо-1,6-дифосфат → А+Б; б) 3-фосфоглицерат → 2-фосфоглицерат → 2-фосфоенолпируват → енол-пируват → пируват; в) пируват ↔ лактат;
  - г) пируват → А → этанол.
11. В цикле ди- и трикарбоновых кислот (цикл Кребса) для расщепления ацетил-КоА используются ферменты: цитратсинтаза, аконитаза, изоцитратдегидрогеназа, α-кетоглутаратдегидрогеназа, сукцинил-КоА-синтетаза, сукцинилдегидрогеназа, фумараза, малатдегидрогеназа.
  - а) Напишите уравнения реакций, катализируемых каждым из этих ферментов.
  - б) Для каждого из этих ферментов укажите, к какому типу принадлежит катализируемая ими реакция.

- в) Напишите суммарное уравнение химического баланса цикла лимонной кислоты.
12. Цикл лимонной кислоты (цикл Кребса) часто рассматривают как основной путь аэробного метаболизма, то есть как кислородзависимый процесс расщепления. Однако ни в одной из реакций цикла кислород не принимает участия – в качестве реагента. Почему же тогда этот путь является аэробным, а не анаэробным?
13. Рассчитайте число молекул АТФ, образующихся при полном окислительном расщеплении одной молекулы указанных ниже веществ до диоксида углерода и воды: а) фруктозо-6-фосфат; б) ацетил-КоА; в) глицераль-3-фосфат; г) глюкоза.
14. Во что обходится организму хранение глюкозы в форме гликогена? Напишите ряд последовательных реакций и суммарную реакцию, которые позволяют определить число молекул АТФ, расходуемых на превращение цитоплазматического – глюкозо-6-фосфата в гликоген и гликогена обратно в глюкозо-6-фосфат. Какую часть это число составляет от максимального числа молекул АТФ, образующегося при полном расщеплении глюкозо-6-фосфата?
15. В процессе гликолиза на 1 моль глюкозы высвобождается 199 080 Дж при спиртовом брожении на 1 моль распавшейся глюкозы высвобождается 235 620 Дж. В каждом случае 61 200 Дж высвободившейся энергии запасается – в макроэргических связях 2 моль АТФ. Рассчитайте коэффициенты полезного действия спиртового брожения и гликолиза.

## ГЛАВА 6. ЛИПИДЫ

Липиды объединяют большую и относительно разнородную группу веществ, содержащихся в животных и растительных тканях, нерастворимых в воде и растворимых в малополярных органических растворителях (ацетоне, бензоле, хлороформе, петролейном эфире). Общее в строении липидов — это присутствие в их молекулах одновременно полярных (гидрофильных) и неполярных (гидрофобных) группировок. Это придает им сродство как к воде, так и к неводной фазе. Липиды относятся к биофильным веществам, что позволяет им осуществлять свои функции на границе раздела фаз.

Липиды — наиболее важный из всех питательных веществ источник энергии. В количественном отношении липиды — основной *энергетический резерв* организма. В основном жир содержится в клетках в виде жировых капель, которые служат метаболическим «топливом». Липиды окисляются в митохондриях с образованием большого количества АТФ.

Ряд липидов принимает участие в образовании клеточных мембран, т. е. выполняет *структурные функции*. Типичными мембранными липидами являются фосфолипиды, гликолипиды, холестерин.

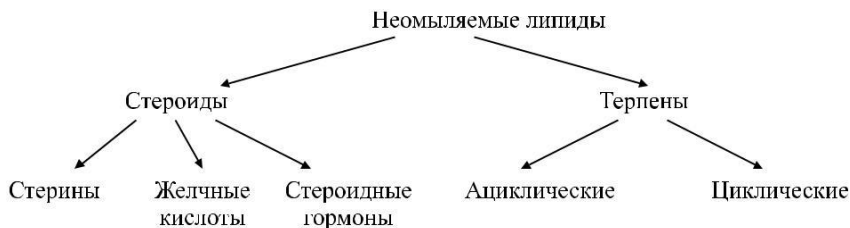
Жировые отложения в подкожной ткани и вокруг различных органов обладают высокими *теплоизолирующими* свойствами. Как основной компонент клеточных мембран липиды изолируют клетку от окружающей среды и за счет своих гидрофобных свойств обеспечивают формирование *мембранных потенциалов*.

Некоторые липиды выполняют в организме специальные функции. Стероиды, эйкозаноиды и некоторые метаболиты фосфолипидов выполняют сигнальные функции. Они служат в качестве *гормонов, витаминов, медиаторов* и *вторичных переносчиков*. Отдельные липиды выполняют роль «якоря», удерживающего на мембране белки и другие соединения.

Некоторые *липиды* являются *кофакторами*, принимающими участие в ферментативных реакциях.



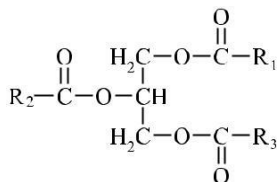
Липиды делят на *омыляемые* и *неомыляемые* в зависимости от их способности к гидролизу с образованием в щелочной среде солей высших карбоновых кислот, т. е. мыл. Неомыляемые липиды однокомпонентны в том смысле, что представляют собой производные одного негидролизующегося класса соединений. Омыляемые липиды могут состоять из двух, трех компонентов и более.



### ПРОСТЫЕ ЛИПИДЫ

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 —CH<sub>2</sub>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).

В жире человека, плавящемся при 15 °С (при температуре тела он жидкий), содержится 70% олеиновой кислоты.

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.

## **Работа 28. Физико-химические свойства жиров**

### **Реактивы и оборудование:**

*Растительное масло; сало; сливочное масло; прогорклый жир; этанол; хлороформ-; диэтиловый эфир; бензол; желчь; яичный белок (1%); карбонат натрия- (1%); 1% раствор мыла; гидроксид калия (50% спиртовой раствор); гидроксид- натрия (10%); гидроксид калия (0,5 М и 0,1 М); фенолфталеин (1% спиртовой раствор); соляная кислота (0,5 М); ледяная уксусная кислота; свежеприготовленный- насыщенный раствор йодида калия; тиосульфат на-трия (0,005 М и 0,1 н.); крахмал (1%); йод (0,1 н. спиртовой раствор и 0,001 н. хлороформный- раствор). Весы аналитические, штативы с пробирками, пипетки градуированные на 1, 5, 10, 20 мл, бюретки на 25 мл, микробюретки, обратные воздушные холодильники с притертыми пробками, водяные бани.*

### **А. 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 сре-ды, 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.

**Ход работы: А.** 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.

**Б.** 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.

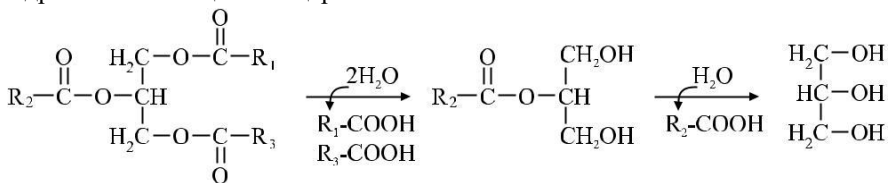
Во всех пробирках, кроме первой, образуются эмульсии. Отмечают различия стойкости эмульсий.

### **Б. Гидролиз жира и обнаружение продуктов гидролиза**

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

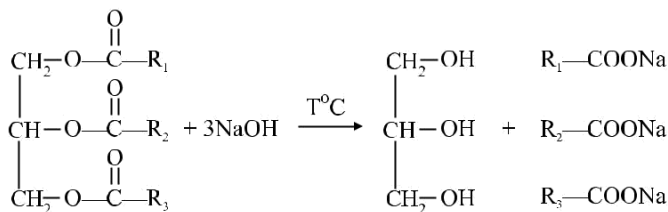
Гидролиз — первая стадия утилизации и метаболизма пищевых жиров в организме–. Расщепление жиров, входящих в состав пищи, происходит у человека и млекопитающих преимущественно в верхних отделах тонкого кишечника, где имеются благоприятные условия для эмульгирования жиров. Наиболее мощное эмульгирующее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

Гидролиз эмульгированных триацилглицеринов под действием панкреати– ческой липазы происходит постадийно: сначала быстро гидролизуются сложноэфирные– связи С1 и С2, а потом медленно идет гидролиз 2-моноацил–глицерина:



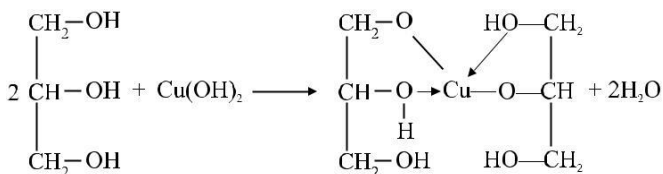
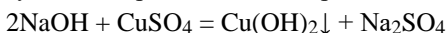
Таким образом, основными продуктами, образующимися при распаде жиров в кишечнике, являются моноацилглицерины, жирные кислоты, глицерин.

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.

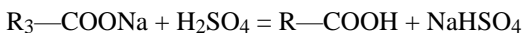


**Ход работы:** 1. В колбу емкостью 50 мл помещают 1 мл растительного масла-, добавляют 20 мл 50% спиртового раствора гидроксида калия или гидроксида натрия, содержимое тщательно перемешивают. Колбу с обратным воздушным холодильником нагревают на кипящей водяной бане 30–60 минут до образования однородного 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.

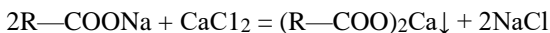
2. В пробирку наливают 2–3 мл гидролизата, добавляют равный объем 10% раствора гидроксида натрия и 3–5 капель 2% раствора сульфата меди. Содержимое- пробирки тщательно перемешивают. Наблюдают образование си-ней окраски- в результате образования глицерата меди.



3. 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 хло-рида кальция. Пробирку встряхивают. Наблюдается появление осадка — не- растворимой кальциевой соли высших жирных кислот.





### ***В. 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.

**Ход 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 фенолфта леина, 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:  $ЧО = (V_1 - V_2) \cdot 28,5 / m$ , 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).

### ***Г. Определение кислотного числа***

Кислотностью жира, или кислотным числом, называется число миллиграммов гидроксида калия, необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот-, содержащихся в 1 г жира. При длительном хранении масла наблюдается гидролиз триацилглицеринов, который приводит к накоплению свободных жирных кислот, т. е. к возрастанию кислотности. Повышенная кислотность жира указывает на снижение его качества.

**Ход работы:** Берут две конические колбы на 50 мл: в первую помещают 1 г свежего масла, во вторую — 1 г прогорклого масла. В каждую колбу наливают по 1 мл смеси эфира и спирта (1:1), тщательно перемешивают до полного растворения масла. Затем добавляют 1–2 капли фенолфталеина и оттитровывают 0,1 М спиртовым раствором гидроксида калия до слабо-розового окрашивания (окраска- не должна исчезать в течение 1 минуты). Кислотное число вычисляют по формуле:  $КЧ = V \cdot 5,61 / m$ , где  $V$  — объем 0,1 М раствора КОН, израсходованного на титрование- (мл); 5,61 — количество КОН (мг), эквивалентное 1 мл 0,1 М раствора КОН;  $m$  — навеска жира (г). Сравнить кислотное число свежего и прогорклого жиров.

#### Д. Определение эфирного числа

Эфирным числом называется число миллиграммов гидроксида калия, образующихся при омылении триацилглицеринов, содержащихся в 1 г жира. Это число определяют как разницу между числом омыления данного жира и его кислотным- числом:  $\text{ЭЧ} = \text{ЧО} - \text{КЧ}$ .

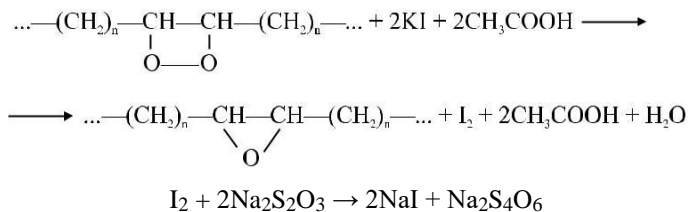
#### Е. Определение перекисного числа

Окислительные процессы с участием липидов и их структурных компонентов достаточно разнообразны. В частности, окисление ненасыщенных триацилглицеринов при хранении за счет кислорода воздуха, сопровождаемое гидролизом, является частью процесса, известного как прогоркание жира.

Ненасыщенные кислоты и липиды с остатками ненасыщенных кислот в мягких- условиях окисляются, образуя гликоли, а в жестких условиях с разрывом углерод-углеродных связей окисляются, образуя соответствующие кислоты.

Пероксидное окисление жиров — наиболее важная из окислительных реакций. Она является основной причиной повреждения клеточных мембран. Пероксидное окисление представляет собой типичный свободнорадикальный цепной процесс, инициирующийся радикалами  $\text{HO}^\bullet$  или  $\text{HO}_2^\bullet$ .

Перекисное число служит показателем окислительного изменения жира. Перекисным числом называется число миллилитров раствора тиосульфата натрия, которое необходимо для титрования свободного йода, который выделится при окислении йодида калия пероксидной группировкой 1 г жира. Пероксидные группировки жира в кислой среде способны реагировать с йодидом калия, с выделением свободного йода. Выделившийся йод оттитровывают раствором тиосульфата- натрия:



По количеству тиосульфата натрия, затраченному на связывание йода, вычисляют перекисное число. Поскольку возможно образование йода при окислении йодида калия кислородом воздуха, необходимо проводить контрольные пробы.

**Ход работы:** Берут две конические колбы емкостью 50 мл: в первую колбу помещают навеску 1 г прогорклого жира, во вторую — 1 мл воды (контроль). Затем- в обе колбы прибавляют по 5 мл ледяной уксусной кислоты, по 6 мл хлороформа- и по 1 мл свежеприготовленного насыщенного раствора йодида калия. Содержимое колб интенсивно встряхивают в течение 6 минут, затем титруют 0,005 М раствором тиосульфата натрия, добавляя 10 капель 1% раствора крахмала- в качестве индикатора.

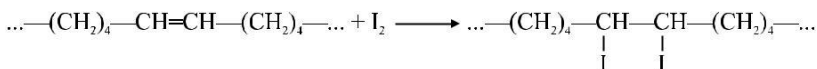
Перекисное число вычисляют по формуле:  $\text{ПЧ} = V_2 - V_1$ , где  $V_2$  — объ-ем 0,005 М раствора тиосульфата натрия, израсходованный на титрование йода (мл),  $V_1$  — то же, израсходованное в контроле.

### **Ж. 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 доста точно 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:



**Ход 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 тиосуль-

фата 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; К — коэффициент поправки на титр 0,1 н. раствора тиосульфата натрия; 100 — коэффициент пересчета на 100 г жира; m — навеска жира (г).

### **Работа 29. Количественное определение свободных жирных кислот в сыворотке крови**

Медные соли жирных кислот способны образовывать с диэтилдитиокарбаматом натрия окрашенные комплексные соединения, интенсивность окраски которых пропорциональна концентрации свободных жирных кислот.

В крови человека содержится свободных жирных кислот 640–880 мкмоль/л. Концентрация свободных жирных кислот в сыворотке крови увеличивается при сахарном диабете, после введения адреналина, при голодании, поскольку идет мобилизация жира из жирового депо и свободные жирные кислоты транспортируются в комплексе с альбуминами.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Стандартный раствор пальмитиновой кислоты: 25,6 мг растворяют в хлороформе и доводят объем до 100 мл, в 1 мл раствора содержится 0,256 мг  $C_{15}H_{31}COOH$ ; хлороформ; сыворотка крови; натрий диэтилдитиокарбамат (0,1% раствор в перегнанном n-бутаноле); медный реактив: готовят из 10 объемов 6,45% раствора  $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ , 9 объемов 1 М раствора триэтанолamina и 1 объема 1 н. раствора уксусной кислоты. Центрифуга, ФЭК, пробирки с притертыми пробками, пробирки центрифужные, пипетки на 1, 5, 10 мл, стеклянные палочки, шприцы.*

**Ход работы:** Берут две пробирки с притертыми пробками: в одну из них вносят 0,5 мл сыворотки крови, в другую — 1 мл стандартного раствора пальмитиновой кислоты в хлороформе. В опытную пробу приливают 5 мл, а в стандарт — 4,5 мл хлороформа и добавляют по 2,5 мл медного реактива. Контрольную пробу готовят параллельно: к 5 мл хлороформа добавляют 2,5 мл медного реактива. Пробирки закрывают пробками и встряхивают в течение 3 минут. Содержимое переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3 000 об./мин. в течение 15 минут.

Смесь в пробирках разделяется на три слоя: хлороформ, белок, вода.

Верхнюю (водную) фазу, содержащую избыток медного реактива, удаляют шприцом, белковую пленку сдвигают стеклянной палочкой на стенки пробирок, хлороформный слой с экстрагированными в нем жирными кислотами переносят в сухие пронумерованные пробирки, куда добавляют по 0,5 мл 0,1% раствора диэтилдитиокарбамата натрия в бутаноле и перемешивают. Опытную и стандартную пробы фотоколориметрируют на ФЭКе с синим светофильтром в кюветах толщиной 5 мм против контрольной пробы.

Содержание свободных жирных кислот рассчитывают по формуле:  $D_1 \cdot 1000 / D_2 \cdot V$  (мкмоль/л), где  $D_1$  — оптическая плотность опытной пробы,  $D_2$  — оптическая плотность стандарта, 1000 — коэффициент пересчета,  $V$  — объем сыворотки крови (мл).

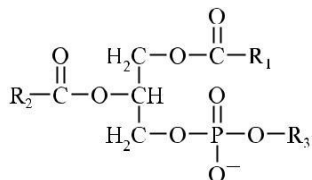
### Вопросы и задания для самопроверки

1. Какие соединения относятся к липидам? Что положено в основу классификации липидов?
2. В чем отличие простых липидов от сложных? Какова их классификация?
3. Какие соединения называются жирами? Чем отличаются растительные жиры от животных? Напишите структурные формулы трипальмитина и триолеина.
4. Дайте краткую характеристику высшим жирным кислотам (предельным и непредельным), которые чаще всего входят в состав жиров.
5. Дайте характеристику основным физико-химическим свойствам жиров.
6. Какова сущность процесса эмульгирования жиров, его физиологическое значение-?
7. В чем заключается процесс омыления? Какие вещества называются мылами? Напишите уравнения реакций гидролиза тристеарина в присутствии гидроксида калия и качественных реакций на продукты гидролиза.
8. Что такое йодное число и для чего его применяют? Напишите уравнение реакции- присоединения йода к линолевой кислоте.
9. Напишите структурные формулы следующих соединений: а) моностеарин, б) пальмитодиолеин, в) олеопальмитостеарин, г) геометрические изомеры олеиновой кислоты.
10. Осуществите нижеперечисленные превращения с использованием структурных- формул всех компонентов с указанием ферментов и продуктов реакции:
  - а) тристеарин  $\xrightarrow{\text{липаза}}$ ?
  - б) глицерин  $\rightarrow \alpha$ -фосфатглицерин  $\rightarrow$  диоксифосфатацетон  $\rightarrow$  фосфатглицераль; в) пальмитиновая кислота  $\rightarrow$  пальмитил-КоА  $\rightarrow$  дипальмитилфосфатидная кислота  $\rightarrow$  дипальмитин  $\rightarrow$  трипальмитин.
11. Приведите схему превращений стеариновой кислоты по  $\beta$ -окислению, В чем отличие  $\beta$ -окисления от  $\alpha$ -окисления высших жирных кислот?
12. Посредством каких реакций осуществляется регенерация HS-КоА из ацетил-КоА?
13. В чем заключается специфическая роль  $\text{CO}_2$  в биосинтезе жирных кислот? Ответ обоснуйте, приведите уравнение реакции.

14. Напишите суммарное уравнение биосинтеза пальмитиновой кислоты, начиная с митохондриального ацетил-КоА, цитозольного НАДФ • Н, АТФ и CO<sub>2</sub>.
15. Определите энергетическую эффективность (выраженную в АТФ) полного распада трипальмитина до CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O.

### СЛОЖНЫЕ ЛИПИДЫ

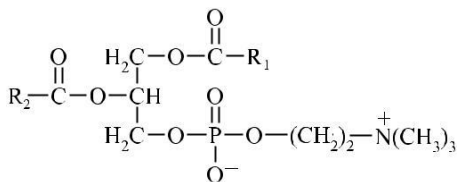
Фосфолипиды являются производными фосфатидной кислоты: в их состав входят глицерин, жирные кислоты, фосфорная кислота и азотсодержащие соединения.



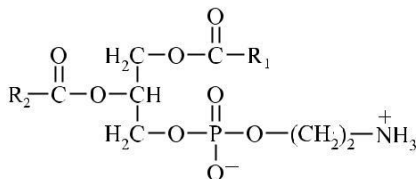
R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> — радикалы высших жирных кислот

R<sub>3</sub> — радикалы азотистого соединения

Наиболее широко распространены фосфатидилхолины (лецитины) и фосфатидилэтаноламины (кефалины). Эти две группы фосфатидилглицеринов метаболически связаны друг с другом и являются главными компонентами клеточных мембран.

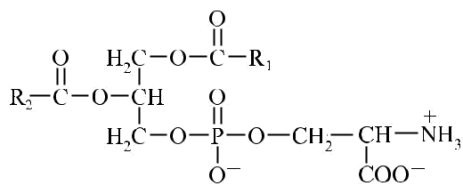


Фосфатидилхолин (лецитин)



Фосфатидилэтаноламин (кефалин)

Фосфатидилсерины распространены гораздо менее широко, чем лецитины и кефалины, их значение определяется в основном тем, что они участвуют в синтезе фосфатидилэтаноламинов.



Фосфатидилсерин

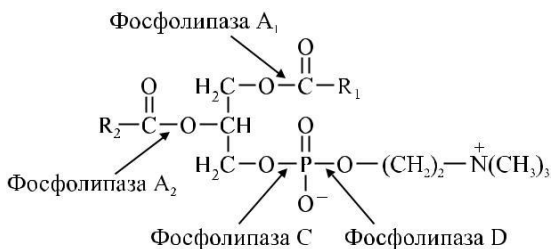
В природных фосфолипидах в положении С-1 глицериновой цепи находится остаток насыщенной кислоты, в положении С-2 — ненасыщенной.

В нейтральной среде остаток фосфорной кислоты во всех фосфатидах заряжен отрицательно, кроме того, остатки азотистых оснований могут нести один или несколько электрических зарядов. Таким образом, фосфоглицериды содержат группировки двух разных типов, а именно полярные (гидрофильные-) и неполярные (гидрофобные). Вследствие этого фосфолипиды обладают амфипатическими (двусторонними) свойствами, что очень важно для мембранных липидов.

Фосфолипиды — твердые вещества жироподобного вида, бесцветны, но быстро темнеют на воздухе вследствие окисления по двойным связям ненасыщенных кислот. Хорошо растворяются в бензоле, эфире, хлороформе, не растворяются в воде, однако могут образовывать стойкие эмульсии. Растворимость в спирте, ацетоне у разных групп фосфолипидов различна.

При нагревании с кислотами и щелочами фосфолипиды гидролизуются, распадаясь на основные структурные компоненты: глицерин, жирные кислоты-, фосфорную кислоту и азотсодержащие соединения.

В организме человека вводимые с пищей фосфолипиды подвергаются в кишечнике воздействию специфических фосфолипаз, катализирующих гидролитический разрыв эфирных связей между компонентами, входящими в состав фосфолипидов:



Накопление образовавшихся под действием фосфолипазы A<sub>2</sub> лизофосфолипидов может быть устранено, если одновременно на фосфолипиды действуют A<sub>1</sub>- и A<sub>2</sub>-фосфолипазы.

Показано, что существует фосфолипаза D, которая способна гидролизовать одновременно эфирные связи в положении 1 и 2 глицериновой цепи. Последовательность реакций расщепления фосфолипидов на отдельные компоненты еще не выяснена.

### **Работа 30. Выделение лецитина из яичного желтка и изучение его растворимости**

Название свое лецитины получили потому, что были выделены из желтка куриного яйца (lecitos — желток). В их состав входят глицерин, жирные кислоты, фосфорная кислота, аминоспирт — холин. Холинфосфолипиды — составные компоненты клеточных мембран, особенно много их содержится в мозгу, сердце, эритроцитах, надпочечниках млекопитающих. Лецитины животного и растительного происхождения отличаются главным образом природой входящих в них жирных кислот и положением остатка фосфорной кислоты. Различают  $\alpha$ - и  $\beta$ -лецитины, когда остаток фосфорной кислоты расположен у С-1 или С-3 глицерина ( $\alpha$ ) или С-2 глицерина ( $\beta$ ).

Природные холинфосфатиды в основном являются  $\alpha$ -лецитинами, которые хорошо растворяются в спирте и не растворяются в ацетоне.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Желток вареного яйца, диэтиловый эфир, этиловый спирт, ацетон. Ступки с пестиком, воронки, фильтры, фарфоровые чашки, пробирки, пипетки на 2 и 10 мл, мерные цилиндры, водяная баня, плоскодонные конические колбы.*

**Ход работы:** *Работа проводится в вытяжном шкафу, все горелки и электронагревательные приборы должны быть выключены!*

**А.** Желток вареного яйца тщательно растирают в ступке с 4 мл эфира. Затем эфир сливают на воронку со складчатым фильтром. Остаток в ступке дважды промывают порциями эфира по 5 мл, сливая их на фильтр. Фильтрат переливают из колбы в фарфоровую чашу и на водяной бане выпаривают досуха. (*Огонь под водяной баней должен быть погашен!*)

В сухом остатке содержится смесь жиров и фосфолипидов, для удаления жиров — сухой остаток дважды обрабатывают кипящим этиловым спиртом порциями по 8 мл. Спиртовые вытяжки после охлаждения отфильтровывают через сухой фильтр, фильтрат должен быть прозрачным, 2 мл фильтрата переносят в пробирку, а из остального спирт осторожно выпаривают на водяной бане. Остаток представляет собой сырой (неочищенный) лецитин. Лецитин растворяют в 10 мл эфира и к полученному раствору при помешивании приливают 30 мл абсолютного ацетона. Лецитин выпадает в осадок. Жидкость из стакана осторожно сливают, остаток лецитина — переносят на фильтровальную бумагу.

**Б.** Наливают в пробирку 0,5 мл спиртового раствора лецитина и добавляют по каплям воду, сильно взбалтывают. Наблюдают образование устойчивой эмульсии лецитина.

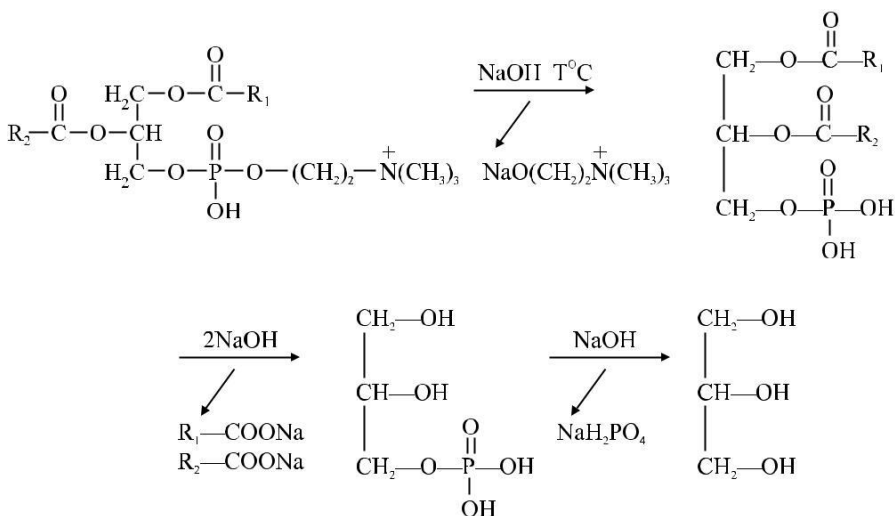


**В.** В сухую пробирку приливают 0,5 мл спиртового раствора лецитина и 0,5 мл ацетона, тщательно перемешивают. Наблюдают помутнение раствора и выпадение в осадок лецитина.

**Г.** К 1 мл спиртового раствора лецитина добавляют 0,5 мл насыщенного спиртового раствора хлорида кадмия. Выпадает белый хлопьевидный осадок комплексного соединения лецитина с хлоридом кадмия. Растворы холестерина и растительных масел не осаждаются спиртовыми растворами хлорида кадмия.

На основании опыта делают вывод о растворимости лецитина.

### Работа 31. Гидролиз лецитина и определение продуктов его гидролиза

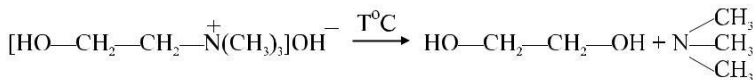


#### Реактивы и оборудование:

Лецитин (полученный в работе 30); гидроксид натрия (10% спиртовой раствор); красная и синяя лакмусовые бумаги; соляная кислота (10%); фенолфталеин; гидросульфат калия; нитрат натрия; карбонат калия; азотная кислота (конц.); молибденовый реактив: смешивают 15% раствор молибдата аммония с концентрированной азотной кислотой в отношении 110:90. Пробирки, воронки, конические колбы, фильтровальная бумага, фарфоровые тигли, шпатели, водяные бани.

**Ход работы:** В сухую пробирку помещают небольшое количество лецитина, полученного в работе № 30, добавляют 2–3 мл 10% раствора гидроксида натрия и кипятят на водяной бане в течение 5 минут.

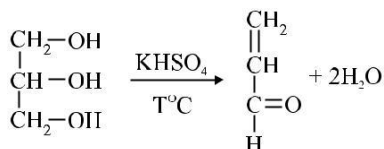
**А.** Открытие холина. При кипячении ощущается запах селедочного рассола, характерный для триметиламина, который образуется из холина:



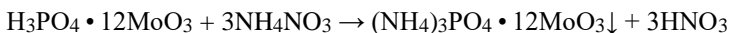
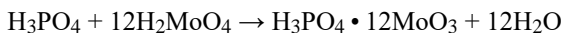
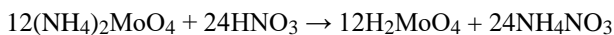
Триметиламин можно обнаружить по посинению влажной красной лакмусовой- бумаги, которую держат у отверстия пробирки.

**Б.** Открытие жирных кислот. После окончания гидролиза пробирку вынимают- из бани, охлаждают. Гидролизат подкисляют 10% раствором соляной кислоты- до покраснения синей лакмусовой бумаги. В кислой среде из растворимых- натриевых солей выделяются нерастворимые жирные кислоты, всплывающие- вверх, их отфильтровывают и фильтрат используют для открытия глицерина- и фосфорной кислоты.

**В.** Открытие глицерина. Прозрачный фильтрат в сухой пробирке нейтрализуют 10% раствором гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина до появления слабо-розовой окраски. Затем фильтрат переносят в фарфоровый тигель и осторожно выпаривают. Половину сухого остатка из тигля переносят в сухую пробирку, добавляют немного гидросульфата калия и нагревают до сплавления. Глицерин теряет воду, превращаясь в акролеин, имеющий резкий характерный запах «кухонного чада».



**Г.** Обнаружение фосфорной кислоты. К оставшемуся в тигле сухому остатку добавляют шпателем нитрат натрия и карбонат калия в соотношении 1:2, перемешивают стеклянной палочкой и сплавляют до полного обесцвечивания-. После охлаждения содержимое тигля растворяют в 2 мл концентрированной- азотной кислоты. Раствор сливают в пробирку и нагревают с двойным объемом молибденового реактива. Наблюдают образование желтого осадка фос-формолибдата аммония.



## Вопросы и задания для самопроверки

---

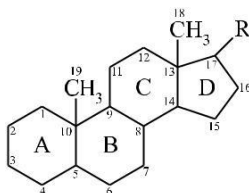
1. В чем отличие простых липидов от сложных?
2. Какова классификация сложных липидов?
3. Какова структура фосфолипидов и их роль в строении и проницаемости клеточных- мембран?
4. Напишите структурные формулы серинфосфатида, холинфосфатида, коламинфосфатида. Обозначьте лиофобную и лиофильную части молекул.
5. Напишите структурную формулу исходного липида, соответствующего составу каждой из следующих смесей, полученных при полном гидролизе липидов:
  - а) глицерин, олеиновая кислота, стеариновая кислота, неорганический фосфат, холин; б) глицерин, пальмитиновая кислота, линолевая кислота, этаноламин, неорганический- фосфат; в) стингозин, глюкоза, олеиновая кислота.
6. Осуществите нижеперечисленные превращения с использованием структурных формул всех компонентов с указанием ферментов и продуктов реакций:
  - а) лецитин  $\rightarrow$  диглицерид  $\rightarrow$  моноглицерид; б) лецитин  $\rightarrow$  лизолецитин  $\rightarrow$   $\alpha$ -глицеролфосфохолин  $\rightarrow$  фосфоглицерин  $\rightarrow$  глицерин;
  - в) кефалин  $\rightarrow$  лизокефалин  $\rightarrow$   $\alpha$ -глицеролфосфоколамин; г) ЦМФ  $\rightarrow$  ЦДФ  $\rightarrow$  ЦТФ  $\rightarrow$  ЦДФ-холин.
7. Каково биологическое значение распада фосфолипидов? Какие ферменты принимают участие в распаде фосфатидов?
8. Напишите уравнение реакций превращения нижеуказанных веществ, назовите ферменты:
  - а) холин  $\rightarrow$  ацетилхолин;
  - б) холин  $\rightarrow$  бетаин; в) глицерин  $\rightarrow$  акролеин.
9. Каким образом ЦТФ принимает участие в синтезе серинфосфатида? Приведите уравнения реакций с указанием ферментов.
10. Напишите последовательные этапы и суммарное уравнение для биосинтеза фосфатидилхолина из олеиновой и пальмитиновой кислот,  $\alpha$ -глицеролфосфата и холина. Сколько молекул АТФ потребуется для синтеза фосфатидилхолина этим способом?

## ПРОИЗВОДНЫЕ ЛИПИДОВ

Стероиды обнаружены во всех организмах, где они выполняют различные функции. К настоящему времени описано около 20 000 стероидов. Три наиболее важные группы стероидов составляют стеарины, желчные кислоты, стероидные гормоны.

Кроме того, к стероидам относятся соединения растительного происхождения, обладающие ценными фармакологическими свойствами; стероидные ал-калоиды, гликозиды дигиталиса, стероидные сапонины.

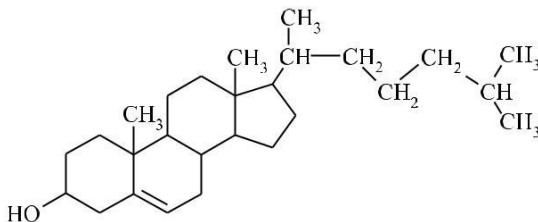
Стероиды — сложные жирорастворимые вещества, обладающие сходной структурой, в основе которых лежит конденсированная система *циклопентан-пергидрофенантрен*.



A, B, C — конденсированные циклогексановые кольца; D — циклопентан

Характерная особенность большинства природных стероидов — наличие кислородсодержащего заместителя в положении C-3, метильных групп — C-18 и C-19 и алифатического заместителя R в положении C-17. По величине углеводородной- цепи R стероиды делятся на различные группы: андростен, эстран, прегнан, холан, холестеран и др.

В организме животных наиболее важным стероином является холестерин (холестерол).



Холестерин присутствует практически во всех животных тканях, крови, особенно широко в нервных тканях. Он является важнейшей составной частью клеточных мембран. Запасной и транспортной формами холестерина служат его эфиры с жирными кислотами. Наряду с другими липидами холестерин и его эфиры присутствуют в составе липопротеидных комплексов плазмы крови. Холестерин входит в состав желчи и многих желчных камней.

Нарушение обмена холестерина играет важную роль в развитии атеросклероза — заболевания, связанного с отложением холестерина (бляшек) на стенках

кровеносных сосудов из-за повышенного уровня холестерина в крови. Для предупреждения атеросклероза важно, чтобы в пищевом рационе преобладали продукты растительного происхождения, для которых характерно низкое содержание холестерина. Напротив, пищевые продукты животного происхождения содержат много холестерина, особенно яичный желток, мясо, печень, мозги.

Очищенный холестерин — белое кристаллическое вещество с температурой плавления  $150^{\circ}\text{C}$ , оптически активен ( $\alpha_{\text{D}} 20\text{--}39^{\circ}$ ). Холестерин растворим в органических растворителях, особенно хорошо в хлороформе, в воде нерастворим, но легко набухает с образованием стойких эмульсий.

Холестерин устойчив к действию щелочей, даже концентрированных. При извлечении липидов из мозга или других тканей холестерин переходит в неомыляемую фракцию, на которую щелочи не оказывают никакого действия.

### **Работа 32. Выделение холестерина из мозга и качественные реакции на него**

Холестерин легко можно получить из тканей мозга. Препарат холестерина из мозга получают путем экстрагирования хлороформом.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Мозговая ткань, гипс, хлороформ, серная кислота (конц.), формалин. Стекланные- воронки, фарфоровые ступки с пестиком, пробирки, стеклянные палочки-, пипетки на 1 и 2 мл, стеклянные пластинки.*

**Ход работы:** А. Выделение холестерина. Тщательно растирают 3–5 г мозговой ткани в фарфоровой ступке с 6–10 г гипса до гомогенной ткани. Гомогенант распределяют тонким слоем стеклянной палочкой или скальпелем на стеклянной пластинке и высушивают в сушильном шкафу ( $60^{\circ}\text{C}$ ).

Высушенную гомогенную массу соскабливают со стекла и мелко измельчают в ступке, затем переносят в пробирку. К сухому порошку в пробирке добавляют 5–6 мл хлороформа и экстрагируют в течение 5–10 минут. Полученный экстракт в хлороформе фильтруют в сухую пробирку и используют для проведения качественных реакций на холестерол.

**Б.** Реакция Шиффа. В пробирку помещают 1 мл холестерина в хлороформе и по стенке пробирки осторожно приливают 1 мл концентрированной серной кислоты. На границе между серной кислотой и раствором хлороформа образуется кольцо красного цвета.

**В.** Реакция Уайтби. В сухую пробирку с 2 мл раствора холестерина в хлороформе прибавляют 2 мл смеси концентрированной серной кислоты с формалином (50:1) и встряхивают. Верхний слой окрашивается в вишнево-красный цвет, а нижний — в буро-красный. Если верхний слой, содержащий холестерин, слить в сухую пробирку и прибавить 2–3 капли уксусного ангидрида, то образуется синее окрашивание, медленно переходящее в зеленое.

## Вопросы и задания для самопроверки

---

1. Какова классификация неомыляемых липидов?
2. Какие соединения называются стероидами? На какие группы разделяются стероиды? Приведите примеры.
3. Какова структурная организация стероидов?
4. Каковы биологические функции стероидов?
5. Напишите структурные формулы пергидрофенантрена, циклопентанпергидрофенантрена, холестерина, пальмитохолестерида, холевой кислоты, мужского и женского половых гормонов. Укажите генетическую связь между перечисленными соединениями.
6. Каковы структура и физиологические функции холестерина?
7. На чем основано выделение холестерина из биологических объектов?
8. С помощью каких реакций можно обнаружить холестерин? С помощью какой реакции и каким методом можно количественно определить холестерин в крови, в сыворотке крови?
9. Какой витамин относится к стероидам? Напишите его структурную формулу, укажите биологическую роль в организме человека.
10. Осуществите нижеперечисленные превращения с использованием структурных формул всех компонентов, укажите ферменты:
  - а) пальмитохолестерид  $\rightarrow$  холестерин  $\rightarrow$  дигидрохолестерин; б) стеарил-КоА + холестерол  $\rightarrow$  HS-КоА + стеарохолестерид;
  - в)  $\beta$ -окси- $\beta$ -метилглутарил-КоА  $\rightarrow$  HS-КоА + мевалоновая кислота;
  - г) мевалоновая кислота  $\rightarrow$  фосфомевалоновая кислота  $\rightarrow$  пиррофосфомевалоновая кислота  $\rightarrow$  изопентинилпиррофосфат  $\rightarrow$  диметилаллилпиррофосфат;
  - д) диметилаллилпиррофосфат + изопентинилпиррофосфат  $\rightarrow$  геранилпиррофосфат  $\rightarrow$  фарнезилпиррофосфат  $\rightarrow$  сквален.

## ГЛАВА 7. ГОРМОНЫ

Гормоны — вещества органической природы, вырабатываемые в специализированных клетках желез внутренней секреции, поступающие в кровь и оказывающие регулирующее влияние на обмен веществ и физиологические функции.

Термин «гормон» (от греч. *hormao* — возбуждаю) был введен в 1905 г. У. Бейлиссом и Э. Старлингом при изучении открытого ими в 1902 г. гормона секретина. К настоящему времени открыто более сотни различных веществ, наделенных гормональной активностью.

Гормоны циркулируют в крови в очень низких концентрациях  $10^{-7}$ – $10^{-12}$  М. Однако эти величины сильно варьируют. Концентрация гормонов подвержена периодическим колебаниям, цикл или ритм которых может зависеть от времени дня, месяца, времени года или менструального цикла. Многие гормоны поступают в кровь импульсами и нерегулярно. Поэтому концентрация гормонов может меняться эпизодически. Выброс гормонов может являться ответом организма на внешнее воздействие или на изменение внутреннего состояния. Концентрация гормонов в крови находится под строгим контролем, причем контроль осуществляется как на стадии синтеза, так и на стадии выброса.

Большинство гормонов переносится в кровотоке в виде комплексов с плазматическими белками (переносчики гормонов), причем связывание с переносчиками носит обратимый характер.

В органах-мишенях имеются клетки, несущие рецепторы, способные связывать гормоны и тем самым воспринимать гормональный сигнал. После связывания гормонов рецепторы передают информацию клетке и запускают цепь биохимических реакций, определяющих клеточный ответ на действие гормона.

В зависимости от механизма взаимодействия гормонов с рецептором все гормоны делятся на две группы:

— гормоны, не проникающие в клетку и взаимодействующие с рецепторами на наружной стороне мембраны (гормоны пептидной и белковой природы, катехоламины);

— гормоны, проникающие внутрь клетки и взаимодействующие с рецепторами в цитоплазме клеток (стероидные гормоны, тиреоидные гормоны).

Биологическое действие гормонов в организме следующее:

— изменяют проницаемость мембраны для определенных веществ (например, для глюкозы, аминокислот);

— регулируют активность отдельных ферментов путем аллостерического воздействия;

— регулируют синтез ферментов, действуя на генетический аппарат клетки;

— влияют на образование белковой части фермента (или на распад фермента) и образование кофермента.

Гормоны осуществляют гуморальную рефлексию обмена веществ и координацию функций организма. Они регулируют размножение, рост, развитие организма, влияют на дифференцировку тканей, формирование тканей, формирование функций, на поддержание системы, участвуют в адаптационных реакциях на стресс и т. д.

Химическая природа почти всех известных гормонов выяснена, однако до сих пор не разработаны общие принципы их номенклатуры. Поскольку химические названия большинства гормонов очень громоздки, более распространена тривиальная номенклатура, например инсулин, вазопрессин, пролактин и др.

Существуют несколько подходов в отношении классификации гормонов: по химическому составу, месту синтеза, растворимости, механизму действия.

По месту синтеза (анатомическая классификация) гормоны делят на следующие группы:

1. *Гормоны гипоталамуса*: тиреолиберин, люберин, соматостатин, сомато-либерин, меланолиберин, меланостатин.
2. *Гормоны гипофиза*: соматотропин, кортикотропин, тиреотропин, пролактин, фоллитропин, лютропин, вазопрессин, окситоцин.
3. *Гормоны щитовидной железы*: тироксин, кальцитонин.
4. *Гормоны поджелудочной железы*: инсулин, глюкагон, эластин.
5. *Гормоны надпочечников*: адреналин, норадреналин, изопропиладреналин, кортикостероиды.
6. *Гормоны половых желез*: эстрогены, андрогены.

Однако анатомическая классификация недостаточно совершенна, поскольку некоторые гормоны или синтезируются не в тех железах внутренней секреции, из которых они секретуются в кровь (например, вазопрессин и окситоцин), или синтезируются и в других железах (например, половые гормоны частично синтезируются в коре надпочечников).

Наиболее приемлемой следует считать химическую классификацию:

1. Аминокислоты и их производные: катехоламины, тиреоидные гормоны, мелатонин и др.
2. Пептидные и белковые гормоны:
  - а) пептиды: кортикотропин (АКТГ), глюкагон, кальцитонин, соматостатин, вазопрессин, окситоцин;
  - б) простые белки: пролактин, соматотропин, инсулин;
  - в) сложные белки: фоллитропин, лютропин, тиреотропный гормон.

Производные стероидов: кортикостероиды, андрогены, эстрогены. При классификации по растворимости гормоны делятся на две группы:

1. Липофильные — после секреции гормоны этой группы связываются с транспортными белками, что разрешает проблему растворимости.
2. Гидрофильные, т. е. группа водорастворимых гормонов.



По механизму действия выделяют две группы:

1. Гормоны, связывающиеся с внутриклеточными рецепторами: эстрогены, андрогены, тиреоидные гормоны ( $T_3$  и  $T_4$ ), протеины, глюко- и металлокорти-коиды.
2. Гормоны, связывающиеся с рецепторами на поверхности клеток: адренкортикотропный- (АКТГ), липотропин (ЛПГ), гастрин, инсулин, про-лактин, гормон роста и т. д.

### Работа 33. Качественное определение гормонов

Гормоны определяются двумя способами: биологическим (испытание на животных) и химическим (цветные реакции).

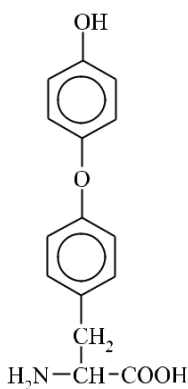
#### Реактивы и оборудование:

Таблетки тиреоидина; серная кислота (конц.); йодат калия (1% и 10%); крахмал (1%); раствор инсулина (в ампулах); гидроксид натрия (0,1%, 10%, 30%); уксусная кислота (0,5%, 10%); сульфосалициловая кислота (20%); ад-реналин: содержимое ампулы растворяют в 100 мл дистиллированной воды; хлорид железа (II) (1%); сульфаниловая кислота (1%); нитрит натрия (5%); карбонат натрия (10%); спиртовой раствор фолликулина: в делительную во-ронку наливают 100 мл этанола и масляный раствор фолликулина из 10 ампул, фолликулин экстрагируют спиртом при встряхивании, слоям дают разделить-ся, нижний (масляный) слой отбрасывают, верхний (спиртовой) используют-для работы; реактив Фолина: 100 г  $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$  и 25 г  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  рас-творяют в 700 мл  $H_2O$  в круглодонной колбе на 1 л, снабженной- пришлифован-ным холодильником Либиха. Прибавляют 50 мл 85%  $H_3PO_4$  и 100 мл  $HCl$  (конц.). Помещают в колбу несколько капилляров. Смесь кипятят с обратным холо-дильником 10 часов. Затем прибавляют 150 г  $Li_2SO_4$ , 50 мл  $H_2O$  и несколько ка-пель  $Br_2$ . Не пользуясь более обратным холодильником-, кипятят содержимое колбы в течение 15 минут для удаления избытка-  $Br_2$  (тяга!). Раствор охлаж-дают, доводят  $H_2O$  до объема 1 л и фильтруют через стеклянный фильтр. Хранят реактив Фолина в склянке из темного стекла. Все реактивы для при-готовления реактива Фолина должны быть химически чистыми! Пробирки, пипетки на 1, 2 мл, водяная баня (или термостат).

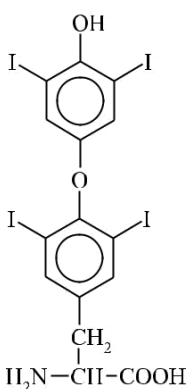
#### А. Реакции на гормоны щитовидной железы (тиреоидин)

Щитовидная железа синтезирует и секретирует высокоактивные йодсодер-жащие тиреоидные гормоны: тироксин ( $T_3$ ),  $3, 3^1, 5$  — трийодгиронин ( $T_4$ ), а также нейодированный гормон тиреокальцитонин (полипептид), функция которого- связана с регуляцией уровня кальция и фосфора в крови.

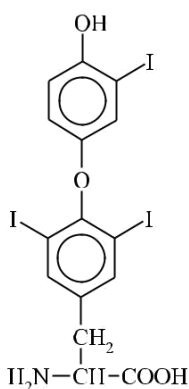
Йодтиронины можно рассматривать как производные L-тиронина, образо-ванные в организме из L-тирозина:



L-Тирозин



Тироксин ( $T_4$ )



Трийодтирозин ( $T_3$ )

При разрушении тиреоидина образуется йодид калия, из которого йод легко вытесняется йодатом калия.

Вытеснение йода из соли йодистоводородной кислоты является окислительно-восстановительной реакцией, где йодид калия служит восстановителем, а йодат калия — окислителем.

Выделившийся йод обнаруживают с помощью крахмала в кислой



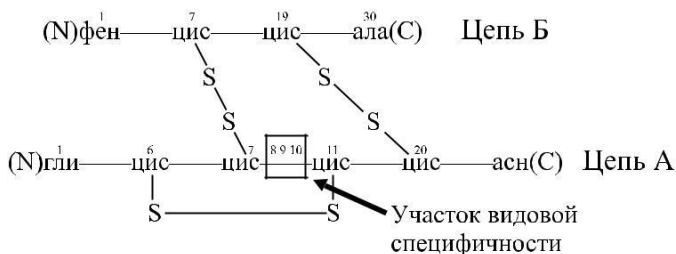
**Ход работы:** Гидролиз тиреоидина. В ступку помещают 0,5 таблетки тиреоидина, тщательно растирают, затем пересыпают в пробирку и добавляют 10 капель концентрированной серной кислоты. Осторожно нагревают (во избежание вспенивания) в течение 12 минут. Затем охлаждают.

Обнаружение йода. К гидролизату прибавляют 3 капли 1% раствора крахмала, 20 капель 1% раствора йодата калия. Наблюдают появление синего окрашивания.

### **Б. Реакции на гормоны поджелудочной железы (инсулин)**

В поджелудочной железе вырабатывается ряд гормонов: инсулин, глюкагон, липокаин. Инсулин (от лат. *insula* — островок) вырабатывается в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса, откуда и получил свое название. Инсулин состоит из двух полипептидных цепей, соединенных друг с другом дисульфидными связями. Первичная структура инсулина полностью расшифрована. Молекула инсулина, содержащая 51 аминокислотный остаток, состоит из двух цепей: А (21 аминокислотный остаток) и Б (30 аминокислотных остатков-). Пептидные цепи А и Б соединены двумя дисульфидными связями (7–7 и 19–20), кроме того, в цепи А имеется дисульфидная связь между 6 и 11 остатками- цис, в результате чего образуются петли.

Видовая специфичность инсулина связана с изменениями на участке 8–10 цепи А. Наиболее близким по своей структуре к инсулину человека является инсулин свиньи.



Инсулин может существовать в нескольких формах, отличающихся по биологическим, иммунологическим и физико-химическим свойствам. Различают две формы инсулина: свободную, вступающую во взаимодействие с анти-- телами, полученными к кристаллическому инсулину, и стимулирующую ус-воение глюкозы мышечной и жировой тканями; связанную, не реагирующую с антителами и активную только в отношении жировой ткани.

Молекулярная форма связанного инсулина варьирует от 60000 до 100 000 Да. Установлена локализация его в белковых фракциях крови, в частности в обла-сти трансферринов и  $\alpha$ -глобулинов. Кроме свободного и связанного инсулинов, различают так называемую форму А инсулина, занимающую промежуточное-положение и появляющуюся на быструю потребность организма в инсулине. Инсулин играет важную роль в метаболизме углеводов: снижает содержание глюкозы в крови, увеличивает биосинтез гликогена в печени и мышцах, усили-вает липогенез, т. е. образование жиров из углеводов. Инсулин является антаго-нистом адреналина в регуляции синтеза и мобилизации гликогена.

**Ход работы:** К 1 мл раствора инсулина прибавляют по каплям 0,1% рас-твор гидроксида натрия до выпадения хлопьевидного осадка, который раство-ряется при подкислении 0,5% раствором уксусной кислоты (рН 2,5–3,5).

К 1 мл раствора инсулина прибавляют 3–5 капель 20% раствора сульфо-салициловой кислоты. Наблюдают выпадение осадка.

Инсулин дает ряд реакций, специфических для белков: биуретовую, Фоля, Миллона (см. работу 1). Прделайте некоторые из них.

### В. Реакции на гормоны мозгового слоя надпочечников (адреналин)

В мозговом слое надпочечников синтезируются катехоламины, имеющие пирокатехиновое ядро и аминогруппу:

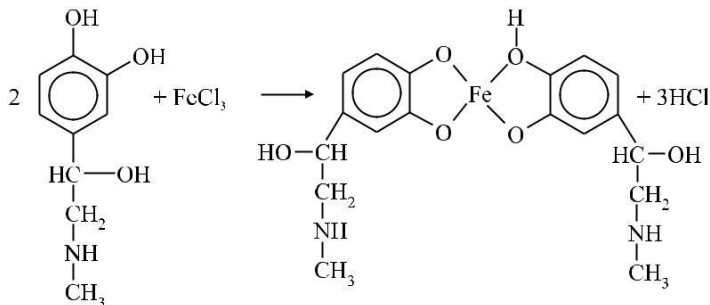


Биосинтез катехоламинов происходит в мозговом слое надпочечников из аминокислоты тирозин, которая также легко может образоваться из фенилаланина (в печени).

Катехоламины, а также глюкагон (гормон поджелудочной железы) и адренокортикотропный- гормон (АКТФ — гормон передней доли гипофиза) способствуют- распаду гликогена, стимулируют фосфорилазную активность в печени, мышцах, надпочечниках, но не прямо, а через аденилатциклазу.

Адреналин легко окисляется на воздухе с образованием адренохрома, окрашивающегося в щелочной среде в красный цвет. При взаимодействии с нитритами наблюдается желто-оранжевое окрашивание, с диазореактивом — красное, с хлорным железом — зеленое, с йодатом калия — красно-фиолетовое.

**а) Реакция с хлоридом железа (III).** При добавлении к раствору адреналина хлорного железа жидкость окрашивается в изумрудно-зеленый цвет, вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа. Реакция с хлорным железом доказывает наличие пирокатехинового ядра в молекуле адреналина.



**Ход работы:** В пробирку вносят 1 мл 0,1% раствора адреналина, прибавляют 1 каплю 1% раствора хлорида железа (III) и перемешивают. Наблюдают появление изумрудно-зеленой окраски. Затем добавляют 1 каплю 10% раствора гидроксида натрия — возникает вишнево-красное окрашивание.

**б) Реакция с диазореактивом.** При взаимодействии диазореактива с адреналином жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

**Ход работы:** К 1 мл раствора 1% сульфаниловой кислоты прибавляют 1 мл 5% раствора нитрита натрия, затем 1,5 мл раствора адреналина (1:1 000) и 1 мл 10% раствора карбоната натрия. Перемешивают, наблюдают окрашивание раствора в красный цвет.

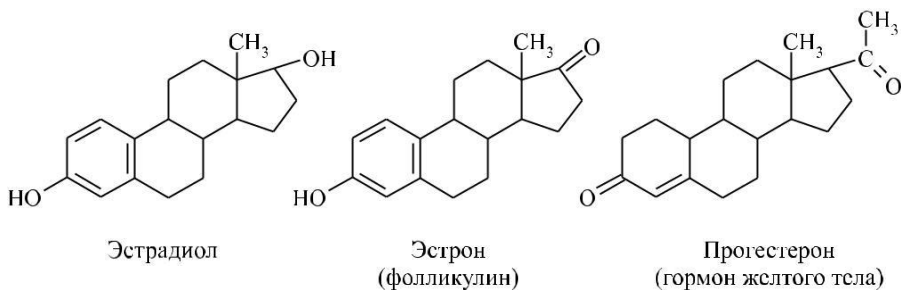
**в) Реакция с йодатом калия.** Адреналин в кислой среде с йодатом калия образует соединение красно-фиолетового цвета.

**Ход работы:** К 0,5 мл 0,1% раствора адреналина прибавляют 1 мл 10% раствора йодата калия, 10 капель 10% раствора уксусной кислоты, смесь подогревают до 60–65 °С. Появляется интенсивное красно-фиолетовое окрашивание.

### Г. Реакции на гормоны половых желез (фолликулин)

Половые гормоны синтезируются в семенниках, яичниках, плаценте и надпочечниках. В яичниках вырабатываются эстрогены, прогестин, релаксин. Во время беременности, помимо яичников, эндокринную функцию выполняет также плацента, выделяющая большое количество эстрогенов, прогестинов и собственный специфический гормон — хорионический гонадотропин.

Основными природными эстрогенами являются эстрадиол, эстрон и прогестерон:



Эстрогены имеют гидроксильную группу С-3, которая благодаря наличию ненасыщенного ароматического кольца обладает фенольной природой.

Эстрогены найдены во всех тканях и в циркулирующей крови. Эти гормоны и их метаболиты находятся в крови частично в свободном состоянии, частично в комплексе с белками.

Мужские половые гормоны — андрогены — можно рассматривать как производные андростана. К мужским половым гормонам относятся тестостерон и андростерон:



Андрогены содержат кето-группу у С-3 и гидроксо-группу у С-17. Андрогены вырабатываются интерстициальной тканью семенных желез, а также корой надпочечников и яичниками. Андрогены, являясь стероидными гормонами-, нерастворимы в воде и могут транспортироваться плазмой только в комплексе- с белками.

**а) Реакция с концентрированной серной кислотой.**

**Ход работы:** В пробирку помещают 1 мл спиртового раствора фолликулина и помещают в кипящую водяную баню на 5–10 минут для испарения спирта.

К оставшемуся в пробирке фолликулину добавляют 1 мл концентрированной серной кислоты и пробирку вновь помещают в кипящую водяную баню на 5–10 минут. Жидкость в пробирке окрашивается в соломенно-желтый цвет, переходящий при нагревании в оранжевый и имеющий зеленую флюоресценцию.

**б) Реакция на фенольную группу.**

**Ход работы:** К 2 мл спиртового раствора фолликулина добавляют 1 мл 30% раствора гидроксида натрия и 1 мл реактива Фолина. Появляется синее окрашивание, характерное для фенольной группы.

Отчет по работе следует оформить в виде таблицы:

*Таблица 16. Цветные реакции на гормоны*

| Название железы внутренней секреции | Название гормона | Строение гормона | Применяемые в опыте реактивы | Наблюдаемое окрашивание |
|-------------------------------------|------------------|------------------|------------------------------|-------------------------|
|                                     |                  |                  |                              |                         |

**Работа 34. Количественное определение адреналина**

Метод основан на фотоколориметрическом определении интенсивности синего- окрашивания, которое образуется при взаимодействии адреналина с реактивом- Фолина.

### Реактивы и оборудование:

Стандартный раствор адреналина: в мерную колбу на 25 мл отмеривают 1 мл раствора адреналина (1:1 000) и доводят до метки водой; 1 мл такого раствора содержит 0,04 мг адреналина; карбонат натрия (10% свежеприготовленный раствор); исследуемый раствор адреналина: в мерную колбу емкостью 25 мл вносят 0,9 мл 0,1% (1:1 000) раствора адреналина и доводят объем жидкости до метки дистиллированной водой. Перемешивают. Полученный раствор содержит 0,036 г / л адреналина; реактив Фолина (см. работу 33). Фотоколориметр, мерные пробирки, пипетки на 1 и 5 мл, мерные колбы на 25 мл.

**Ход работы:** Готовят две мерные сухие пробирки емкостью 10 мл.

В первую вносят 1 мл стандартного раствора адреналина, во вторую — 1 мл исследуемого раствора адреналина и приливают в обе пробирки по 4 мл 10% раствора карбоната натрия и по 0,5 мл реактива Фолина. Содержимое пробирок встряхивают. Жидкость постепенно окрашивается в синий цвет, достигающий наибольшей интенсивности через 3–5 минут. Далее объем жидкости в пробирках доводят до метки раствором карбоната натрия.

Содержимое пробирок перемешивают и измеряют оптическую плотность стандартного и исследуемых растворов на фотоэлектроколориметре с красным фильтром против контроля, содержащего 1 мл дистиллированной воды, 4 мл 10% раствора карбоната натрия и 0,5 мл реактива Фолина.

Концентрацию адреналина в исследуемом растворе (мг/мл) рассчитывают по формуле:  $C = 0,04 \cdot \text{Дис} / \text{Дст}$ , где 0,04 — концентрация адреналина в стандартном растворе (мг/мл), Дис — оптическая плотность исследуемого раствора адреналина, Дст — оптическая плотность стандартного раствора адреналина.

### Вопросы и задания для самопроверки

---

1. Какие вещества называются гормонами?
2. Какова классификация гормонов? Какой вид классификации, на ваш взгляд, наиболее адекватно отражает их функции?
3. Какие гормоны вырабатываются щитовидной железой? Какова их структура? Напишите структурные формулы этих гормонов.
4. Какой гормон регулирует функцию щитовидной железы? Что такое гипотиреоз, гипертиреоз?
5. Какова структура и функции важнейших пептидных и белковых гормонов?
6. В каких железах внутренней секреции синтезируются пептидные гормоны?
7. Какой гормон стимулирует синтез гликогена? Каков его механизм действия?
8. Все ли модификации инсулина обладают гормональной активностью?
9. Какие фундаментальные процессы контролируют стероидные гормоны?
10. Какие гормоны вырабатывает мозговой слой надпочечников? Какова их структура?
11. Каков механизм биосинтеза адреналина и норадреналина?

12. Какой гормон проявляет анаболическую активность? Какой железой он вырабатывается?
13. Какой гормон повышает кровяное давление в почках вследствие вызываемого им сужения почечных артерий?
14. Напишите структурные формулы нижеперечисленных соединений: а) кортикостерон, тестостерон, эстрадиол; б) L-тирозин, адреналин, норадреналин; в) тиронин, L-3,5,3<sup>1</sup>-трийодтиронин, L-3,3<sup>1</sup>-дйодтиронин; г) окситоцин, вазопрессин.
15. Осуществите нижеперечисленные превращения с использованием структурных формул всех компонентов с указанием ферментов: а) тирозин → диоксифенилаланин → окситирамин → норадреналин → адреналин; б) прогестерон → 17-оксипрогестерон → андростендион → тестостерон; в) холестерол → прогестерон → 11-дезоксикортикостерон → кортикостерон → альдостерон.



## Глава 8. Водно-солевой обмен

Для нормальной жизнедеятельности организма наряду с белками, жирами, углеводами, витаминами необходимо поступление воды и минеральных веществ, которые являются также незаменимыми факторами питания.

У взрослого человека вода составляет  $\frac{2}{3}$  массы тела. Содержание воды зависит от возраста, степени упитанности, функционального состояния организма. Различные органы и ткани отличаются по содержанию воды: печень, мозг, кожа содержат 70% воды, мышцы, сердце — 76–80%, кости и жировая ткань содержат- наименьший процент воды.

Вода является идеальным растворителем для диссоциирующих веществ. В электрическом поле того или иного иона молекулы воды образуют регулярные структуры в соответствии с зарядом иона. Эта гидратная оболочка экранирует ион от ионов противоположного заряда. Вода имеет высокую константу диэлектрической проницаемости, т. е. в воде электростатическое притяжение двух противоположно- заряженных ионов снижается примерно в 80 раз. Молекулы воды, находящиеся во внутренней сфере непосредственно около иона, практически иммобилизованы и перемещаются вместе с центральным ионом.

Хорошо растворимы в воде и нейтральные соединения с несколькими гидроксильными группами (например, глицерин, глюкоза), поскольку они способны образовывать водородные связи с молекулами воды.

Основными источниками поступления воды в организм являются: питьевая вода (0,5–1,7 л), пищевая (0,8–1 л), эндогенная (0,2–0,3 л), образующаяся в организме в процессе биологического окисления и путем дегидратации.

Потребность в воде у взрослого человека в среднем 30–40 г/кг массы тела в сутки, а у ребенка — в 3–4 раза выше.

Общее количество воды, поступающее в организм и выводимое из него, составляет 1,5–3 л. Это нормальный водный баланс. В выведении воды принимают участие почки, кожа, кишечник, легкие. Регуляция водного обмена осуществляется при помощи антидиуретического гормона (АДГ).

В водном обмене принимают участие ионы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , гидратирующие ткани, и ионы  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , дегидратирующие ткани, способствующие удалению воды из организма.

Минеральные вещества поступают в организм с пищевыми продуктами и водой. Большинство солей легко всасывается кишечником и поступает в кровь, тканевые жидкости и ткань. Некоторые ионы задерживаются определенными тканями: например,  $\text{NaCl}$  — в коже или под кожей, ионы  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  — в печени,  $\text{I}^-$  — в щитовидной железе,  $\text{K}^+$  — в мышцах,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{F}^-$  — в костной ткани.

Таблица 17. Вода и минеральные элементы

| 1                    | 2  | 3  | 4                        | 5  |
|----------------------|--|--|--------------------------|--|
| Минеральные вещества | Среднее содержание (г) в расчете на массу человека (65 кг) | Основной источник  | Суточная потребность (г) | Функция, местонахождение в организме   |
| H <sub>2</sub> O     | 35 000–40 000  | Напитки, вода в составе твердой пищи, окислительные процессы | 900–1 200                | Растворитель, составная часть клеток, диэлектрик, хладагент, переносчик, реагент биохимических реакций |
| <b>Макроэлементы</b> |  |  |                          |  |
| Na                   | 100  | Поваренная соль  | 1,1–3,3                  | Осморегуляция, мембранный потенциал, обмен минеральных веществ   |
| K                    | 150  | Овощи, фрукты, зерновые                                      | 1,9–5,6                  | Мембранный потенциал, метаболизм минеральных веществ   |
| Ca                   | 1 300  | Молоко, молочные продукты                                    | 0,8                      | Формирование костной ткани, свертывание крови, сигнальное вещество                                     |
| Mg                   | 20   | Зеленые овощи  | 0,35                     | Формирование костной ткани, кофактор ферментов   |
| Cl                   | 100  | Поваренная соль  | 1,7–5,1                  | Обмен минеральных веществ  |
| P                    | 650  | Мясо, молоко, овощи, зерновые                                | 0,8                      | Формирование костной ткани, энергетический обмен, обмен нуклеиновых кислот                             |
| S                    | 200  | Аминокислоты (цис, мет)                                      | 0,2                      | Обмен липидов, углеводов, образование конъюгатов   |
| <b>Микроэлементы</b> |  |  |                          |  |
| Fe                   | 4–5  | Мясо, печень, яйца, овощи, зерновые                          | 10                       | Гемоглобин, миоглобин, цитохромы, ферритин   |
| Zn                   | 2–3  | Мясо, печень, зерновые                                       | 15                       | Цинксодержащие ферменты  |
| Mn                   | 0,02   | Многие пищевые продукты                                      | 2,5                      | Ферменты   |
| Cu                   | 0,1–0,2  | Мясо, овощи, рыба, фрукты                                    | 2–3                      | Оксидазы   |
| Mo                   | 0,02   | Зерновые, орехи, бобовые                                     | 0,15–0,5                 | Оксидоредуктазы  |
| Cr                   | < 0,01   | —  | 0,05–0,2                 | Не определены  |

| 1  | 2                         | 3  | 4            | 5                         |
|----|---------------------------|--|--------------|---------------------------|
| Se | —                         | Овощи, мясо                                | 0,05–0,2     | Селеносодержащие ферменты |
| I  | 0,03                      | Морская рыба, йодированная-поваренная соль | 0,15         | Тиоксин                   |
| F  | Потребность не определена | Фторированная питьевая вода, чай, молоко   | 0,0015–0,004 | Кости, зубная эмаль       |

В организме человека около 65 минеральных элементов. Жизненно необходимые элементы подразделяются на макроэлементы (суточная потребность > 100 мг) и микроэлементы (суточная потребность < 100 мг).

К макроэлементам относятся: Na, K, Ca, Mg, Cl, P, S, I.

К жизненно важным микроэлементам относятся: Fe, Zn, Mn, Cu, Co, Cr, Se, Mo.

Фтор (F) не принадлежит к этой группе, однако необходим для поддержания в здоровом состоянии костной и зубной ткани. Вопрос о принадлежности к жизненно важным микроэлементам V, Ni, Sn, B, Si остается открытым. Такие элементы принято называть условно эссенциальными.

Количество минеральных веществ, абсорбированных из пищи, как правило, зависит от метаболических потребностей организма и состава пищевых продуктов. Дефицит минеральных веществ — явление не редкое и может возникать по различным причинам, например из-за однообразного питания, нарушения усвояемости, при различных заболеваниях.

Минеральные вещества в организме участвуют в поддержании кислотно-щелочного равновесия (буферные системы): являются кофакторами ферментов, тем самым регулируют активность ферментов и обмен веществ; выполняют опорную функцию (кости, скелет); являются составной частью биологически активных веществ (йод в тиронинах, цинк в инсулине, железо в гемоглобине, цитохромах и т. д.); участвуют в нервномышечном возбуждении.

Почти все минеральные элементы функционируют в организме как структурные компоненты и электролиты.

### **Работа 35. Качественное определение неорганических соединений костной ткани**

В состав костной ткани входит вода (50%), органические (28%), неорганические (22%) вещества.

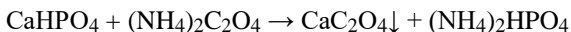
Среда неорганических веществ большую часть составляет фосфат кальция (85%) и в значительно меньших количествах содержится карбонат кальция (10%), фосфат магния (1,5%), фторид кальция (0,3%).

Минеральные вещества распределены в органическом веществе костной ткани в виде тончайших включений.

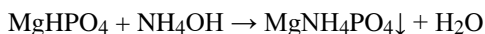
### Реактивы и оборудование:

*Костная ткань: к 5 г костной ткани приливают 25 мл 0,5% раствора серной кислоты и оставляют на сутки. Затем отфильтровывают. Фильтрат, в котором находятся неорганические вещества, используют для опыта; оксалат аммония (конц.); молибденовый реактив (см. работу 21). Пробирки, пи-петки, воронки, конические колбы.*

**Ход работы: А.** Открытие ионов кальция. В пробирку помещают 3 мл фильтрата костной вытяжки, добавляют 3 капли насыщенного раствора оксалата аммония-. Выпадает осадок оксалата кальция:



**Б.** Открытие ионов магния. Оксалат кальция, полученный в предыдущем опыте, отделяют фильтрованием. К фильтрату добавляют 3–4 капли концентрированного раствора аммиака. Выпадает осадок фосфата магний-аммония:

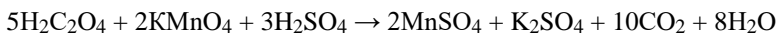
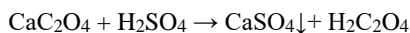
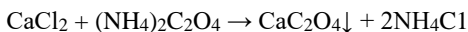


**В.** Открытие фосфорной кислоты. К нескольким миллилитрам профильтрованной вытяжки из костной ткани прибавляют 5–6 капель молибденового реактива и нагревают до кипения. Медленно образуется желтый осадок фосфоро-молибдата аммония:



### Работа 36. Количественное определение кальция в сыворотке крови

Кальций, содержащийся в виде солей в сыворотке крови, переводят в оксалат. При растворении оксалата кальция в серной кислоте освобождается эквивалентное количество щавелевой кислоты, которую оттитровывают раствором перманганата калия:



В норме содержание кальция в сыворотке крови составляет 4,2–5,2 мг/100 мл (1,05–1,30 ммоль/л).

### Реактивы и оборудование:

*Аммиак (2%), оксалат аммония (насыщ.), серная кислота (5%), перманганат калия (0,01 н.), сыворотка крови. Центрифуга, баня водяная, микробюретка на 2 мл, пипетки на 1 мл, колбы конические на 25 мл.*

**Ход работы:** В одну центрифужную пробирку вносят 1 мл сыворотки крови, в другую — 1 мл бидистиллированной воды (контроль). В обе пробирки наливают по 1 мл насыщенного раствора оксалата аммония и оставляют

стоять на 1 час. Затем проводят центрифугирование при 3 000 об./мин. в течение 10 минут. Сливают надосадочную жидкость, затем к осадку приливают по 2 мл 2% раствора аммиака, взмучивают осадок и вновь центрифугируют. Осадок оксалата аммония удаляют многократной промывкой 2% раствором аммиака (не менее 3 раз).

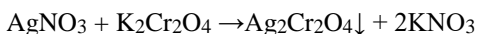
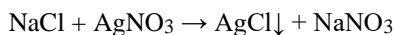
Затем добавляют в каждую пробирку по 1 мл 5% раствора серной кислоты. Содержимое пробирок перемешивают стеклянной палочкой, добиваясь полного растворения осадка. Количественно переносят содержимое пробирок в конические колбы на 25 мл, смывая подогретой 5% серной кислотой.

Горячий раствор титруют 0,01 н. раствором перманганата калия до появления слабо-розовой окраски, не исчезающей в течение 0,5–1 мин.

Содержание калия рассчитывают по формуле:  $C = 0,2 \cdot (V_1 - V_2) \cdot 100$ , где  $C$  — содержание кальция (мг %); 0,2 — масса кальция (мг), соответствующая 1 мл 0,01 н. раствора  $KMnO_4$ ;  $V_1$  — объем (мл) 0,01 н. раствора  $KMnO_4$ , израсходованного на титрование опытной пробы;  $V_2$  — объем (мл) 0,01 н. раствора  $KMnO_4$ , израсходованного на титрование контрольной пробы; 100 — пересчет на 100 мл. Для пересчета в единицы СИ (ммоль/л) умножить полученное значение на коэффициент-пересчета 0,2495.

### Работа 37. Определение хлоридов в крови

В крови хлор находится в основном в виде хлорида натрия. Хлориды образуют с нитратом серебра нерастворимый хлорид серебра. Безбелковый фильтрат крови, содержащий хлориды, титруют 0,01 н. раствором нитрата серебра в присутствии 5% раствора хромата калия. После осаждения всего хлора в виде хлорида серебра, прибавленная 1 капля нитрата серебра образует осадок хромата серебра кирпично-красного цвета:



Содержание хлоридов в крови составляет ~295 мг/100 мл (~83,19 ммоль/л), в сыворотке крови — 95–103 ммоль/л.

#### Реактивы и оборудование:

*Сульфат цинка (0,45%); гидроксид натрия (0,1 н.); хромат калия (5%), 0,1 М раствор нитрата серебра: отвешивают на аналитических весах 16,988 г нитрата серебра, помещают в мерную колбу на 1 л, растворяют в дистиллированной воде и доливают водой до метки. 0,01 н. раствор  $AgNO_3$  готовят из 0,1 н. раствора непосредственно перед работой. Титр  $AgNO_3$  устанавливают по 0,01 н. раствору  $NaCl$  (0,585 г  $NaCl$  растворяют в 1 л воды). Кровь или сыворотка. Микробюретки на 5 мл, воронки с ватой, конические колбы, микропипетки на 0,2 мл, пипетки на 1 и 5 мл, водяная баня (или термостат).*

**Ход работы:** В пробирки наливают по 5 мл 0,45% раствора сульфата цинка и по 1 мл 0,01 н. раствора щелочи. В две пробирки вносят по 0,1 мл крови или сыворотки крови, в две другие — 0,1 мл воды (контроль).

Все четыре пробирки опускают в кипящую водяную баню на 3 минуты, образовавшийся осадок белков отфильтровывают через предварительно обработанную горячей водой вату. Осадок промывают 2 раза водой по 3 мл. К фильтрату прибавляют 2 капли 5% раствора хромата калия и титруют 0,01 н. раствором нитрата серебра до едва заметного появления кирпично-красного осадка.

Содержание хлоридов рассчитывают по формуле:  $C = (V_1 - V_2) \cdot 0,585 \cdot 100 / 0,1$ , где  $C$  — содержание хлоридов (мг/100 мл);  $V_1$  — количество 0,01 н. раствора  $AgNO_3$ , пошедшего на титрование опытной пробы (мл);  $V_2$  — количество 0,01 н. раствора  $AgNO_3$ , пошедшего на титрование контрольной пробы (мл); 0,585 — масса хлорида натрия (мг), соответствующая 1 мл 0,01 н. раствора  $AgNO_3$ ; 100 — пересчет на 100 мл; 0,1 (мл) — количество взятой сыворотки или крови.

Для пересчета в единицы СИ (ммоль/л) умножить полученное значение на коэффициент пересчета 0,2820.

### Вопросы и задания для самопроверки

---

1. Почему вода является самым важным компонентом живых организмов?
2. Какие свойства воды делают ее универсальным биорастворителем?
3. В каких органах и тканях и в каком количестве содержится вода в организме человека?
4. Как называется вода, образующаяся в процессе обмена веществ в организме-?
5. Каковы биологические функции воды?
6. Какие химические элементы называются биогенными? Почему именно эти элементы стали биогенными? Каково их положение в периодической системе Д. И. Менделеева?
7. Какова классификация биогенных элементов?
8. Почему минеральные элементы являются жизненно важными и необходимыми факторами питания?
9. Какие минеральные соединения являются основой костной ткани у высших животных?
10. Какова роль кальция в регуляции обмена веществ на метаболическом уровне?
11. Какие катионы специфически влияют на отдачу воды клетками организма-? Приведите механизм этого процесса.
12. Какова роль магния в метаболизме? Приведите примеры.
13. Какова роль фосфора в жизнедеятельности организмов? Приведите примеры.
14. Цитохром «с» содержит 0,426% железа. Рассчитайте минимальную молекулярную массу этого белка.
15. Объем влажной рибосомы из дрожжей равен  $15 \cdot 10^3 \text{ нм}^3$ , а сухой —  $5 \cdot 10^3 \text{ нм}^3$ . Рассчитайте содержание иммобилизованной воды в рибосоме.

## ГЛАВА 9. ПИГМЕНТНЫЙ ОБМЕН

Пигментный обмен представляет собой совокупность сложных окрашенных веществ в организме человека и животных. Наиболее хорошо известный пигмент крови — гемоглобин. Это сложный белок — хромопротеин, который состоит из белковой части, глобина, и протетической группы, представленной четырьмя гемами. Структура каждого гема хорошо изучена. Он состоит из четырех пиррольных ядер, связанных между собой метиновыми мостиками. В центре образованного пиррольными ядрами порфиринового кольца находится ион железа со степенью окисления 2.

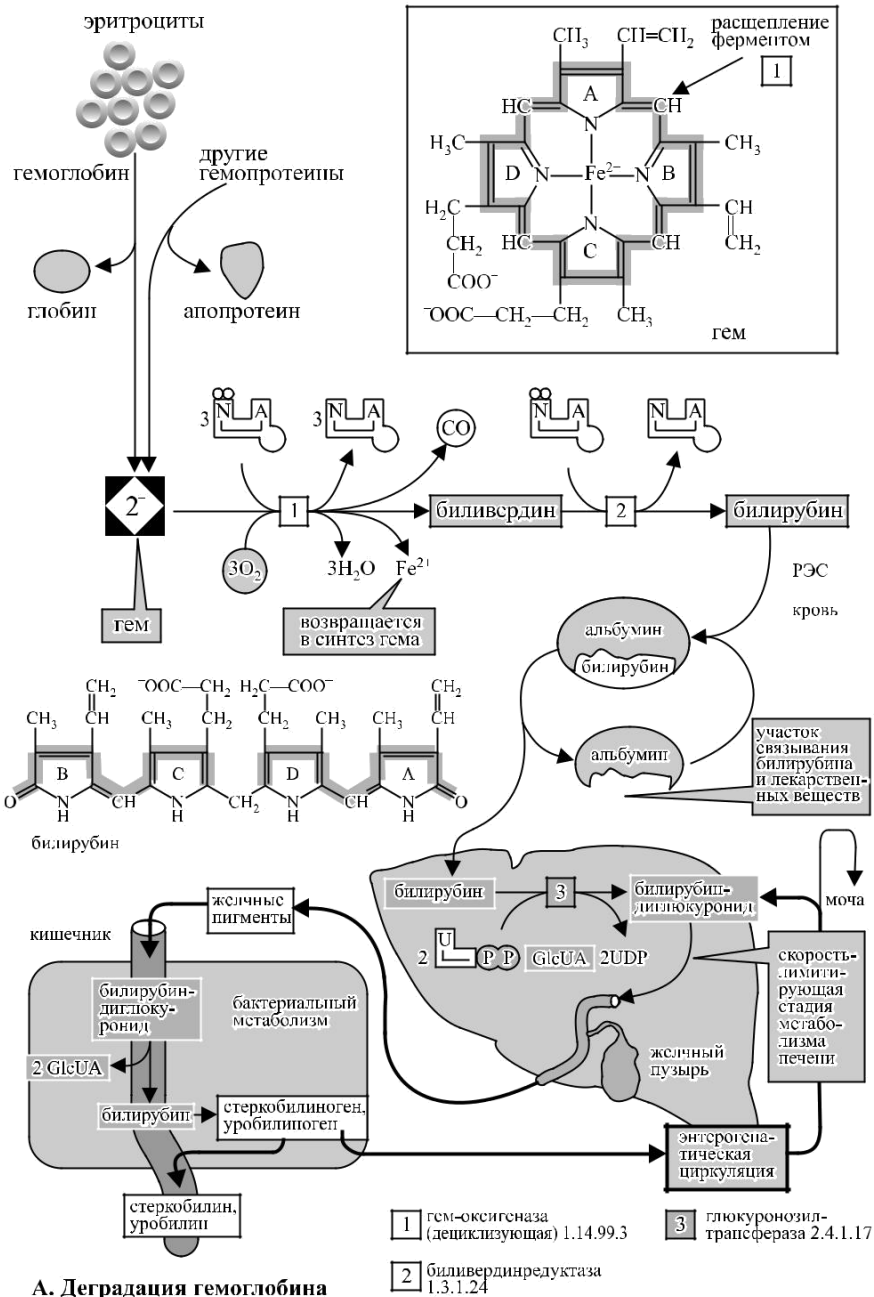
Разрушение эритроцитов начинается в микросомальной фракции ретикулоэндотелиальной системы клеток печени, селезенки, костного мозга. После отделения глобина красный гем расщепляется гем-оксигеназой с помощью кислорода и НАДФН на ионы двухвалентного железа, оксид углерода и зеленый биливердин. Далее биливердин восстанавливается до оранжевого билирубина. Для дальнейшего разрушения билирубин транспортируется кровью в печень при помощи альбумина. В печени билирубин дважды конъюгируется с активированной глюкуроновой кислотой (УДФ-GlcUA), катализируемый УДФ-глюкуронозилтрансферазой. Глюкуроновая кислота присоединяется к пропионатным боковым цепям билирубина сложноэфирными связями. Образующийся диглюкуронид билирубина переносится в желчь путем активного транспорта против градиента концентрации.

В кишечнике конъюгат билирубина снова частично расщепляется бактериальной глюкуронидазой. Свободный билирубин постепенно восстанавливается до бесцветного уробилиногена и стеркобилиногена, которые далее окисляются кислородом воздуха до уробилина и стеркобилина. Эти конечные продукты метаболической трансформации желчных пигментов в кишечнике окрашены в цвета от оранжевого до желтого. Они выделяются по большей части с калом, а в меньшей степени резорбируются.

Наряду с гемоглобином, по аналогичному пути разрушаются группы гема и у других гемсодержащих белков (миоглобина, цитохрома, каталазы, пероксидазы). Однако их вклад в образование желчных пигментов составляет лишь от 10 до 15 %.

Один из важных субъективных признаков нарушения пигментного обмена — появление желтухи, которое отмечается при уровне билирубина в крови 27–34 мкмоль / л и более. Причинами гипербилирубинемии могут быть: 1) усиление гемолиза эритроцитов, 2) нарушение функции печеночных клеток, 3) задержка оттока желчи.

Повышение содержания общего и связанного билирубина в крови, а также наличие его в моче являются диагностическими и прогностическими показателями.





Для определения содержания билирубина в сыворотке (плазме) крови используют в основном химические и физико-химические методы исследования, среди которых выделяют колориметрические, спектрофотометрические, хро-матографические и другие.

В клинико-лабораторной практике наиболее широко используемым способом определения общего, свободного и связанного билирубина является метод Йендрашека — Грофа, который был выбран в качестве унифицированного. Принцип метода сводится к тому, что в процессе взаимодействия сульфаниловой кислоты с азотокислым натрием образуется диазофенилсульфоновая кислота, которая, реагируя с конъюгированным билирубином сыворотки, дает красное окрашивание. По интенсивности окрашивания судят о концентрации прямого билирубина.

### **Работа 38. Определение содержания билирубина и его фракций в сыворотке крови колориметрическим диазометодом (по Йендрашику — Клеггору — Грофу)**

*Принцип метода.* При взаимодействии сульфаниловой кислоты с азотистокислым натрием образуется диазофенилсульфоновая кислота, которая, реагируя со связанным билирубином сыворотки, дает розово-фиолетовое окрашивание. По интенсивности его судят о концентрации билирубина, вступающего в прямую реакцию. При добавлении к сыворотке крови кофеинового реактива свободный билирубин переходит в растворимое диссоциированное состояние, благодаря чему он также вызывает розово-фиолетовое окрашивание раствора со смесью диазореактивов. По интенсивности последнего фотометрически определяют концентрацию общего билирубина. По разнице между содержанием общего и связанного билирубина находят количество свободного.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Кофеиновый реактив:* 5 г чистого кофеина, 7,5 г бензойно-кислого натрия ( $C_6H_5COONa$ ), 12,5 г кристаллического уксуснокислого натрия ( $CH_3COONa$ ) растворяют в 90 мл теплой дистиллированной воды, нагревают содержимое колбы до 50–60 °С и тщательно перемешивают. После охлаждения доводят объем дистиллированной водой до 500 мл. Раствор годен в течение 3–4 недель при 5–10 °С. *Диазосмесь:* а) *диазореактив I.* 5 г сульфаниловой кислоты растворяют при подогревании в 300–400 мл дистиллированной воды, прибавляют 15 мл концентрированной соляной кислоты (плотность 1,19 кг/л). Если часть сульфаниловой кислоты остается в осадке, колбу помещают в теплую воду и ее содержимое перемешивают. Только после полного растворения сульфаниловой кислоты и охлаждения раствора объем колбы доводят дистиллированной водой до 1 л. Реактив стойкий, хранят в посуде из темного стекла; б) *диазореактив II.* Раствор азотистокислого натрия ( $NaNO_2$ , 0,5 г/дл). Реактив нестойкий, содержится в склянке из темного стекла около 2–3 недели,

в холодильнике при 4 °С. Первым признаком его непригодности служит появление желтого оттенка. Непосредственно перед выполнением исследований смешивают 10 мл диазореактива I и 0,3 мл диазореактива II. Физиологический раствор (раствор NaCl, 9 г/л).

**Ход работы:** В три пробирки (для определения уровня общего билирубина, связанного билирубина и постановки контрольной пробы на цвет сыворотки) вводят реактивы согласно схеме (табл. 18).

При определении уровня общего билирубина пробу оставляют при комнатной температуре на 20 минут для развития окраски. В дальнейшем окраска пробы не изменяется.

Для установления содержания конъюгированного (связанного) билирубина колориметрирование осуществляют спустя 5–10 минут после добавления диазосмеси, так как при длительном стоянии пробы в реакцию вступает свободный билирубин.

Контроль на оптическую плотность раствора сыворотки ставят для каждой опытной пробы.

Таблица 18. Данные для определения уровня билирубина в сыворотке крови

| Реактив                 | Общий билирубин (мл) | Конъюгированный (связанный) билирубин (мл) | Контрольная проба (мл) |
|-------------------------|----------------------|--|------------------------|
| Сыворотка               | 0,25                 | 0,25                                       | 0,25                   |
| Кофеиновый реактив      | 1,75                 | –  | 1,75                   |
| Физиологический раствор | –                    | 1,75                                       | 0,25                   |
| Диазосмесь              | 0,25                 | 0,25                                       | –                      |

*Примечание.* Допускается уменьшение объемов реагентов в 2 раза при использовании кювет объемом 1 мл с шириной слоя 10 мм.

Колориметрируют пробы при зеленом светофильтре (500–560 нм). В случае использования фотометра применяют кювету с шириной слоя 5 мм. Оценка результатов производят по калибровочному графику, построенному в соответствии с инструкцией к наборам реагентов «Билирубин-эталон» фирмы «Лахема» или другим аналогичным. При их отсутствии можно воспользоваться способом Шеллонга и Венде. Весьма хорошие результаты получены при использовании параллельно проводимого через все этапы метода калибратора фирмы «Хоффманн — Ла Рош» (с концентрацией билирубина 89,8 мкмоль / л или близкой к этой точно известной величине).

Находят содержание общего и связанного билирубина в мкмоль / л. Для определения уровня несвязанного (свободного) билирубина из цифры общего его содержания вычитают показатель конъюгированного (связанного) билирубина.

В *норме* концентрация общего билирубина в плазме (сыворотке) крови составляет 8,55–20,52 мкмоль / л. 75% его количества приходится на долю свободного билирубина.

Средние величины содержания в плазме общего, конъюгированного (связанного) и свободного билирубина составляют соответственно 11,12; 2,57 и 8,56 мкмоль / л.

*Примечания:* 1. Некоторые авторы рекомендуют после развития окраски (перед этапом фотометрирования) добавлять в пробы по 3 капли раствора NaOH концентрации 300 г / л: цвет раствора при этом изменяется на зеленый (при большой концентрации щелочи — на синий), часто наблюдается исчезновение мутности. Пробы с полученной окраской следует фотометрировать при красном светофильтре.

2. В случае большой концентрации билирубина сыворотку нужно развести изотоническим раствором в два раза.

3. Интенсивность окраски не меняется в течение 30 минут.

### **КАЧЕСТВЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ЖЕЛЧНЫЕ ПИГМЕНТЫ В МОЧЕ**

Билирубин обычными методами в нормальной моче не обнаруживается, хотя и может находиться в виде следов. Выделение билирубина с мочой повышается (билирубинемия) при некоторых формах желтух вследствие гипербилирубинемии. В этих случаях обычные качественные пробы на билирубин становятся положительными. Билирубинурия встречается главным образом при механическом препятствии оттоку желчи из печени в кишечник (механическая желтуха) или при поражении паренхимы печени (паренхиматозные желтухи, например, болезнь Боткина и др.). В мочу переходит только «прямой» билирубин (моно- и диглюкокониды билирубина). Билирубин «непрямой» при гемолитической желтухе не переходит в мочу, так как, будучи связанным с белками, он обычно не проникает через почечный фильтр. Присутствие желчных пигментов окрашивает мочу в желто-зеленый или темно-бурый цвет (цвет темного пива). Пена желтушной мочи имеет желтую окраску, что служит для ориентировки.

Реакции на желчные пигменты основаны на получении окрашенных продуктов окисления билирубина: биливердина (зеленый), билицианина (синий), холетелина (желтый) и др. Из них наименее окисленным является биливердин, наиболее окисленным — холетелин. Наличие двух карбоксильных групп в боковых цепях обуславливает кислотные свойства билирубина и способность его образовывать соли. Соли щелочных металлов растворимы, соли щелочно-земельных металлов нерастворимы. При некоторых пробах (с реактивом Фуше, Гупперт — Сальковского) билирубин сначала осаждают в виде бариевой или кальциевой соли, затем переводят его в свободное состояние и обнаруживают по образованию окрашенных продуктов окисления.

### **Работа 39. Обнаружение желчных пигментов в моче с реактивом Фуше**

Метод основан на окислении билирубина хлорным железом, входящим в состав реактива Фуше, после осаждения его хлоридом бария. При этом образуются окрашенные продукты окисления. Одна из наиболее чувствительных проб для открытия билирубина в моче.

#### **Реактивы и оборудование:**

*Моча, содержащая желчные пигменты; моча нормальная; хлористый барий, 15 % раствор; реактив Фуше (содержит трихлоруксусную кислоту и хлорное железо). Штатив с пробирками, пипетки емкостью 5 и 10 мл, воронки с бумажными фильтрами, фильтровальная бумага или кусок стекла, капельницы.*

**Ход работы:** К 10 мл мочи прибавляют 5 мл 15 % раствора хлористого бария, смешивают и полученный осадок фильтруют. Фильтр разворачивают, раскладывают на сухой фильтровальной бумаге и на осадок наносят 1–2 капли реактива Фуше.

При положительной пробе на фильтре появляются сине-зеленые или голубоватые пятна, обусловленные продуктами окисления билирубина.

*Примечание.* Щелочную мочу необходимо подкислять несколькими каплями концентрированной уксусной кислоты.

### **Работа 40. Обнаружение желчных пигментов в моче пробой Гупперт — Сальковского**

#### **Реактивы и оборудование:**

*Моча, содержащая желчные пигменты; моча нормальная; углекислый натрий, 10 % раствор; хлористый кальций, 3 % раствор; соляная кислота (конц.); этиловый спирт. Штатив с пробирками, пипетки, воронки с бумажными фильтрами, водяная баня, кипящая.*

**Ход работы:** 2–3 мл мочи подщелачивают 1–2 мл 10 % раствора соды. Прибавляют 1–2 мл 3 % раствора хлористого кальция. Выпадает желтый осадок, состоящий из углекислого кальция и адсорбированной на нем кальциевой соли билирубина. Осадок отфильтровывают. Подставляют под воронку с фильтром чистую пробирку и осторожно растворяют осадок на фильтре несколькими каплями концентрированной соляной кислоты. Углекислый кальций при этом полностью растворяется, а билирубин переходит под воздействием соляной кислоты в свободное состояние и остается на фильтре. Наливают на фильтр 3–4 мл спирта. Билирубин при этом растворяется и фильтруется со спиртом и кислотой в пробирку. Кипятят содержимое пробирки в кипящей водяной бане. При наличии билирубина появляется зеленое или синее окрашивание, обусловленное продуктами его окисления. Можно кипятить осадок вместе с фильтром со спиртом, подкисленным 1–2 каплями концентрированной соляной кислоты.

Эта проба применима и в тех случаях, когда в моче присутствует кровь, большое количество уробилина и других пигментов. Она открывает 1 часть желчных пигментов в 500 000–1 000 000 частях мочи.

**Работа 41. Обнаружение желчных пигментов в моче  
по реакции со спиртовым раствором йода  
(проба Розина)**

Реакция основана на окислении билирубина мочи в биливердин под действием йода как окислителя. Восстанавливаясь, йод переходит из молекулярного (электронейтрального) в ионное состояние  $I_2 \rightarrow 2I^-$ .

**Реактивы и оборудование:**

*Моча, содержащая желчные пигменты; моча нормальная; йод, 1 % спиртовой раствор; уксусная кислота, 10 % раствор. Штатив с пробирками, пипетки емкостью 5 мл с делениями.*

**Ход работы:** В пробирку наливают 3–4 мл мочи (если нужно, подкисленной 10 % уксусной кислотой) и осторожно наклоняют 1 % спиртовой раствор йода. При наличии билирубина на границе между обеими жидкостями образуется зеленое кольцо, обусловленное образованием билирубина.

*Примечания:* 1. После приема антипирина и при наличии в моче крови проба тоже положительна.

2. Во избежание ошибок во всех сомнительных случаях необходимо ставить пробу с реактивом Фуше.

**Работа 42. Обнаружение желчных пигментов в моче с концентрированной азотной кислотой  
(проба Гмелина)**

Реакция основана на окислении билирубина мочи под влиянием азотной кислоты с примесью азотистой в ряд окрашенных в разные цвета продуктов окисления.

**Реактивы и оборудование:**

*Моча, содержащая желчные пигменты; моча нормальная; азотная кислота (конц.), содержащая следы азотистой кислоты (азотистая кислота образуется под воздействием света на азотную кислоту при стоянии ее на свету). Штатив с пробирками, капельницы, пипетки.*

**Ход работы:** В пробирку вносят 20 капель концентрированной азотной кислоты и осторожно из пипетки наклоняют мочу так, чтобы обе жидкости не смешивались. При наличии желчных пигментов на границе двух жидкостей появляются зеленое, синее, фиолетовое, красное и желтое кольца в указанной последовательности, что соответствует разным степеням окисления билирубина. Дальше всего от азотной кислоты располагается зеленое кольцо биливердина

(наименее окисленный продукт), ближе всего к азотной кислоте — желтое кольцо холетелина (наиболее окисленный продукт). При стоянии все кольца окисляются до желтого. Характерным для желчных пигментов является образование верхнего зеленого кольца и одновременно с ним синего или фиолетового. Одно зеленое кольцо без сопровождения синего или фиолетового может получиться с мочой, не содержащей желчные пигменты, после принятия внутрь антипирина.

### **Вопросы и задания для самопроверки**

---

1. Можно ли обнаружить желчные пигменты в нормальной моче обычными реакциями?
2. Что такое билирубинурия и каковы причины ее возникновения?
3. Какой билирубин («прямой» или «непрямой») выделяется с мочой?
4. В какой цвет окрашивается моча и пена мочи при наличии в ней желчных пигментов?
5. На каких свойствах желчных пигментов основаны реакции для их открытия в моче?
6. Какое клиническое значение определения желчных пигментов в моче?

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бохински Р. Современные воззрения в биохимии. — М. : Мир, 1987.
2. Ленинджер А. Основы биохимии. — М.: Мир, 1885, т. 1–3.
3. Основы биохимии / Под редакцией Анисимова А. А. — М. : Высшая школа, 1996.
4. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия. — М. : Медицина, 1990.
5. Филиппович Ю. Б. Основы биохимии. — М. : Высшая школа, 1993.
6. Биохимия человека / Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. — М. : Мир, 1993. — Т. 1–2.
7. Основы биохимии / Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. [и др.] — М. : Мир, 1981. — Т. 1–3.
8. Досон Р., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. — М. : Мир, 1997.
9. Овчинников Ю. А. Биоорганическая химия. — М. : Просвещение, 1987.
10. Тюкавкина Н. А., Бауков Ю. И. Биоорганическая химия. — М. : Медицина, 1985.
11. Ноздрюхина Л. Р. Биологическая роль микроэлементов в организме человека и животных. — М. : Наука, 1977.
12. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. — М. : Мир, 2000.
13. Гринстейн Б., Гринстейн А. Наглядная биохимия. — М. : Медицина, 2000.
14. Якубке Х., Ешкайте Х. Аминокислоты, пептиды, белки. — М. : Мир, 1985.
15. Овчинников Ю. А., Шанин А. Н. Структура и функции белков. — М. : Педагогика, 1983.
16. Кретович В. Л. Введение в энзимологию. — М. : Наука, 1986.
17. Ренненберг Р. Эликсиры жизни. — М. : Мир, 1987
18. Шерстнев М. П., Комаров О. С. Химия и биология нуклеиновых кислот. — М. : Просвещение, 1990.
19. Филиппович Ю. Б., Егорова Т. А., Севастьянова Т. А. Практикум по общей биохимии. — М. : Просвещение, 1982.
20. Сиянова Н. С., Хисамутдинова В. И., Неустроева С. Н. Методическое руководство для практикума по биохимии. — Казань : КГУ, 1988.
21. Кушманова О. Д., Ивченко Г. М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. — М. : Медицина, 1983.
22. Биохимия : практикум / Под ред. Н. Е. Кучеренко. — К. : Высшая школа, 1988.
23. Биохимия : сборник задач и упражнений / Под ред. Н. Е. Кучеренко. — К. : Высшая школа, 1988.

24. Филиппович Ю. Б., Севастьянова Г. А., Щеголева Л. И. Упражнения и задачи по биологической химии. — М. : Просвещение, 1976.
25. Сводные вопросы для подготовки студентов к безмашинному самоконтролю по курсу биохимии / Под ред. Ю. Б. Филипповича. — М. : МГПУ, 1990.
26. Чиркин А. А., Данченко Е. О. Биохимия. — Витебск. : Медицинская литература, 2010.
27. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия / Пер. с нем. — 3-е изд. — М. : Мир, 2012.
28. Биохимия : учебник для вузов / Под ред. Е. С. Северина. — 5-е изд., испр. и доп. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013.