

КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ
Кафедра биохимии, биотехнологии и фармакологии

Л.А. ГАНЕЕВА, В.С. СКРИПОВА, А.А. НУРГАЛИЕВА,
А.А. ЧУМАНОВА, Н.Э. ИОНОВА,
Р.Г. КИЯМОВА

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ ПО
БИОХИМИИ. ЧАСТЬ 1

Казань – 2024

УДК 577.11: 577.12

*Принято на заседании учебно-методической комиссии ИФМиБ
Протокол № 9 от 19 июня 2024 года*

Рецензенты:

доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой биохимии и клинической лабораторной диагностики КГМУ **И.Г. Мустафин**,
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Академии наук РТ,
зав. кафедрой общей патологии КГУ **С.В. Бойчук**

Ганеева Л.А.

Лабораторный практикум по биохимии: / Л.А. Ганеева, В.С. Скрипова
А.А. Нургалиева, А.А. Чуманова, Н.Э. Ионова, Р.Г. Киямова. – Казань:
Казанский федеральный университет, 2024. – 89 с.

Методическое руководство практических занятий по курсу «Биохимия» предназначено для студентов по специальностям лечебное дело, стоматология, фармакология. Руководство создано в помощь учащимся для понимания процесса лабораторных работ, закрепления теоретического материала и приобретения практических навыков. В пособии представлено краткое описание теоретического материала с соответствующим практическими занятиями.

Учебно-методическое пособие может быть рекомендовано для студентов, магистров, аспирантов медицинских, фармацевтических, биологических, химических и других смежных специальностей.

© Ганеева Л.А. Скрипова В.С., Нургалиева А.А.,
Чуманова А.А., Ионова Н.Э., Киямова Р.Г., 2024
© Казанский федеральный университет, 2024

ВВЕДЕНИЕ

Подготовка специалистов медицинских специальностей требует тщательного подхода к изучению фундаментальных основ биологической химии и молекулярной биологии. Будущие специалисты медицинского профиля должны хорошо разбираться в основах биохимии в норме и при патологических состояниях в организме человека. Это необходимо, в первую очередь для понимания фундаментальных основ заболеваний человека, что важно для постановки правильного диагноза, а также в принятии и использовании верных решений при назначении эффективного и адекватного лечения.

Учебно-методическое пособие по биохимии написано с учетом накопленных знаний и большого опыта проведения лабораторных работ по биохимии на кафедре биохимии, биотехнологии и фармакологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета.

В предлагаемой первой части пособия рассмотрены основные аспекты статической биохимии, с кратким теоретическим изложением по каждой теме. Рассмотрены состав, химическое строение, биохимические функции и некоторые физиологические эффекты белков, ферментов, витаминов, гормонов, липидов и углеводов.

Учебно-методическое пособие рекомендовано для студентов медицинских специальностей, фармацевтов, биологов, а также для специалистов меж профильных дисциплин.

СОДЕРЖАНИЕ

I	
1	
Б. 1	
Е 1 1	
Л 1	
КЦ1	
ИВ 1	
..e.2.....	
† Б	
н Ж	
ВР	
е Р	
ФР	
р И	
е И	
и И	
к И	
ц И 1	
И и И.	
И и ИВ	
и И.	
Ф и И 2	
Е и И 2	
Р и И С	
М и И 3.....	
Е и И И	
Н и И 1.....	
Т и И 1.....	
Б и И 2.....	
Л. М. и И 3.....	
и И И	
В и И И	
И и И И	
Т и И и	
А и И и.....	
М и И и.1.3.1 Качественная реакция на никотиновую кислоту с	
И и И И	
Н и И И	
Б и И И	
б и И	

3

. 3

1 с

К. 1

о 4.р.1 Количественное определение витамина С в моче (А) и

л р 4

и В с

І ч и 1

V 4 2 в

с 4 К

Г 4 2 р

О в 4 е

Р Е Ж м

М е 4 с

О б 4 й

М б 4 в

Б р 4 а

Л ы 4 а
.....

Е о 4 б
.....

В К 4 а

Р б 4 я

Д м 4 1

Б ы 4 р

н.б.а.д
.....

и п 4 а

Л ы 4 р

И е 4 в

П е 4 в

Е е 4 в

Р е 4 в

А е 4 в

Т ы 4 в

У р 4 в

Р е 4 в

А е 4 в

в.н.п
.....

а е 4 в

и е 4 в

у е 4 в

г о.б.р
.....

I БЕЛКИ

Белки (протеины) представляют собой высокомолекулярные, азотсодержащие полимеры, молекулы которых построены из остатков α -аминокислот, соединенных пептидными связями. Белковые молекулы выполняют многочисленные физиологические функции, из которых наиболее важной является каталитическая. Все процессы обмена веществ, рост и размножение протекают при участии каталитических белков – ферментов.

Химия белка является особой областью, включающей в себя подходы и методы биологии, химии, физики и медицины. Белки являются материальной основой деятельности клетки.

Белки обладают разнообразной структурой. Различают четыре уровня организации белков: первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры. Функции белков в природе универсальны: каталитическая, транспортная, структурная, сократительная, защитная, запасная, дыхательная, регуляторная. Работа генетического аппарата клетки осуществляется при участии белков, действующих в процессе репликации, транскрипции и трансляции. Каждый организм характеризуется уникальным набором белков, фенотипические признаки и многообразие функций которого обусловлены особенностями пространственной структуры, специфичностью надмолекулярных и мультимолекулярных структур белковых молекул.

1.1 Цветные реакции на белки

Цветные реакции на белки обусловлены наличием таких структурных элементов белка, как аминокислоты или образуемые ими химические группировки. При взаимодействии белка с отдельными химическими веществами образуются окрашенные продукты реакции вследствие присутствия в белках определенных аминокислот и группировок.

Цветные реакции на белки применяются для установления белковой природы вещества и изучения аминокислотного состава различных природных белков. На некоторых цветных реакциях основаны методы для количественного определения белков и аминокислот, входящих в их состав, что может продемонстрировать важность при изучении, например, питательной ценности белка.

1.1.1 Биуретовая реакция

Биуретовая реакция обусловлена наличием в белках пептидных (амидных) связей ($-\text{CO}-\text{NH}-$), соединяющих аминокислотные остатки в молекуле белка. Образование пептидной связи происходит путем взаимодействия α -аминогруппы ($-\text{NH}_2$) одной аминокислоты с α -карбоксильной группой ($-\text{COOH}$) другой аминокислоты с высвобождением молекулы H_2O (рисунок 1).

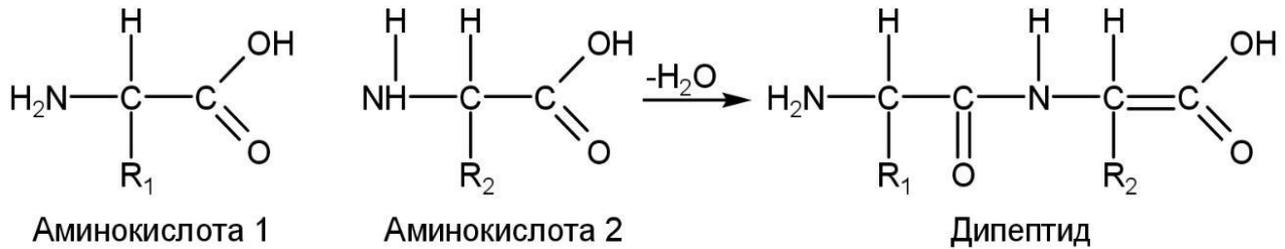


Рис. 1. Схема образования пептидной связи

В сильнощелочной среде раствор белка взаимодействует с ионами меди с образованием хелатного биуретового комплекса, окрашенного в сине-фиолетовый цвет, а продукты неполного гидролиза белка (пептиды) дают розовое окрашивание. При избытке щелочи происходит диссоциация ОН-группы с формированием отрицательного заряда с помощью, которого кислород взаимодействует с медью, а медь в свою очередь образует дополнительные координационные связи с атомами азота пептидной связи, путем использования их электронных пар. Возникающий таким образом комплекс очень стабилен. Схема протекания биуретовой реакции представлена на рисунке 2.

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Гидроксид натрия, 10 % раствор
3. Сульфат меди (II), 5 % раствор

Материалы и оборудование

1. Стеклянная химическая пробирка, 1 шт
2. Пипетки

Техника

В пробирку наливают 15 капель раствора яичного белка, 15 капель 10 % раствора гидроксида натрия и по каплям 5% раствор сульфата меди (II) до появления розово-фиолетового или сине-фиолетового окрашивания при взбалтывании. Необходимо избегать избытка сульфата меди, чтобы не допустить выпадения аморфного голубоватого осадка гидрата окиси меди.

1.1.2 Ксантопротеиновая реакция (Мульдера)

Реакция обусловлена наличием в белке остатков циклических аминокислот - тирозина и триптофана, содержащих в своем составе бензольное ядро. При нагревании большинства белков с концентрированной азотной кислотой бензольное ядро тирозина и триптофана нитруется с образованием нитропроизводных желтого цвета. Последние при добавлении щелочи превращаются в соли хиноидной структуры, окрашенные в оранжевый цвет.

Ксантопротеиновую реакцию (желтое окрашивание) можно наблюдать на коже, ногтях, шерсти и др. при попадании на них концентрированной азотной кислоты. По-гречески "ксантос" - жёлтый, откуда реакция и получила название. Белки, не содержащие тирозин и триптофан, не дают ксантопротеиновую реакцию (желатин, клупеин, сальмин и др.). В отличие от тирозина и триптофана, фенилаланин подвергается нитрованию с большим трудом и не дает ксантопротеиновую реакцию. Поскольку ксантопротеиновая реакция обусловлена нитрованием ароматического кольца, она может быть положительной с более простыми ароматическими соединениями, например, с фенолом.

Реакция нитрования и образования солей хиноидной структуры представлена на рисунке 4.

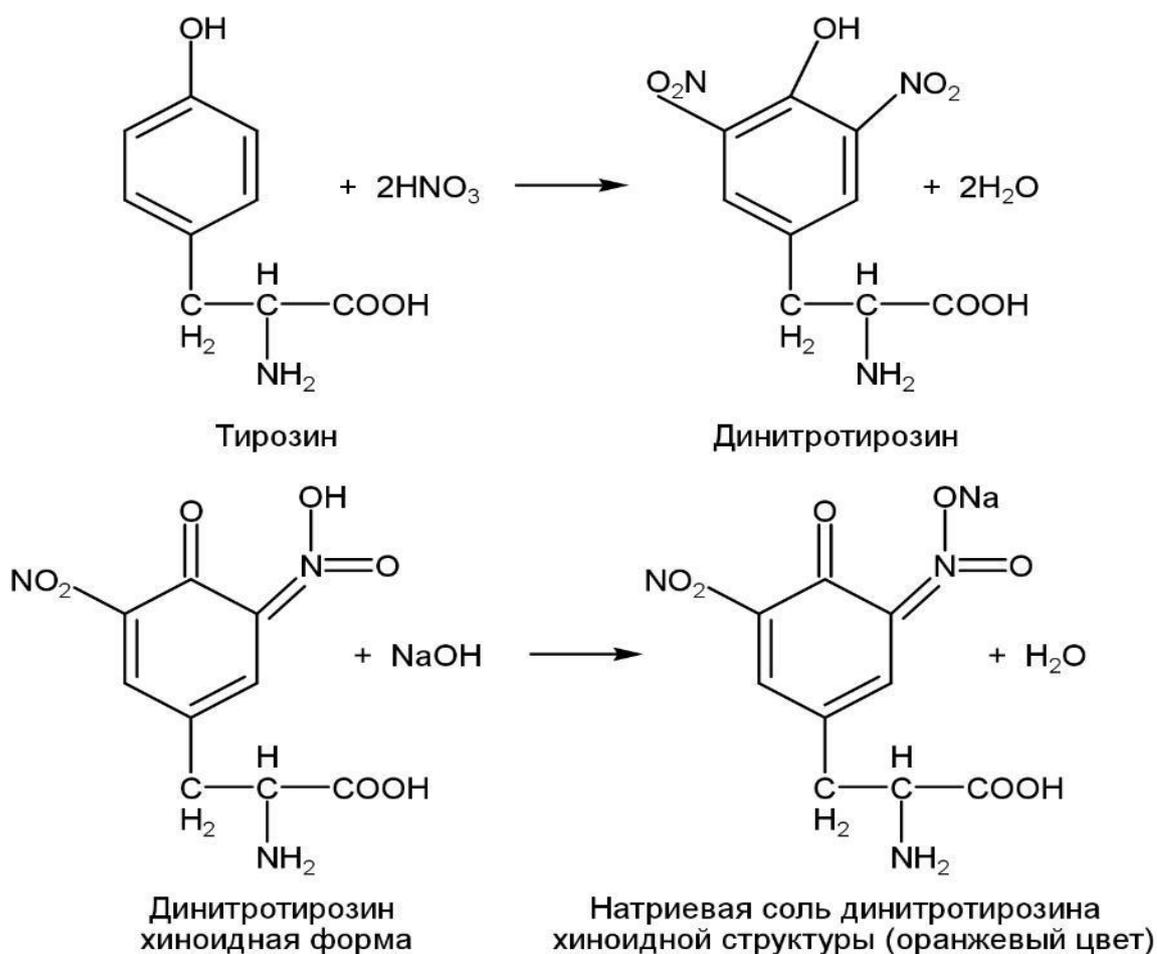


Рис. 4. Схема протекания ксантопротеиновой реакции

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Концентрированная азотная кислота
3. Гидроксид натрия, 10 % раствор

Материалы и оборудование

1. Вытяжной шкаф
2. Кипящая водяная баня
3. Стеклоанная химическая пробирка, 1 шт.
4. Пипетки

Техника

1. В пробирку наливают 15 капель раствора яичного белка и 3 капли концентрированной азотной кислоты. Образуется осадок белка под действием кислоты. При нагревании осадок окрашивается в желтый цвет (нитрование) и постепенно растворяется (происходит гидролиз белка), окрашиваясь в желтый цвет.

2. Содержимое пробирки охлаждают под краном. К охлажденной смеси прибавляют по каплям 10 % раствор гидроксида натрия. Когда ре-

акция жидкости становится щелочной, то появляется оранжевое окрашивание вследствие образования натриевой соли динитротриптозина.

1.1.3 Реакция Адамкевича

Реакция обусловлена присутствием в белке остатков аминокислоты триптофана. Белки, содержащие триптофан, в присутствии глиоксильной и серной кислот дают красно-фиолетовое окрашивание. Реакция основана на способности триптофана взаимодействовать в кислой среде с альдегидами (глиоксильной кислотой) с образованием окрашенных продуктов конденсации (рисунок 5):

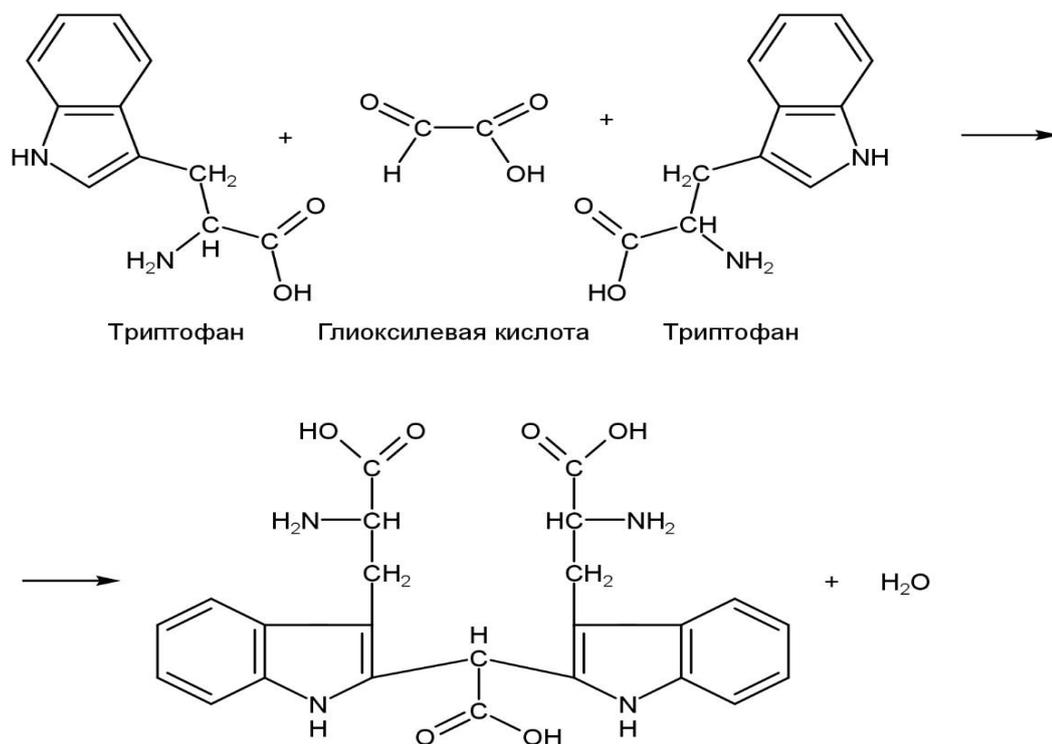


Рис. 5. Схема протекания реакции Адамкевича

В качестве источника глиоксильной кислоты обычно используют ледяную уксусную кислоту, где она содержится в небольшом количестве.

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Ледяная уксусная кислота
3. Концентрированная серная кислота

Материалы и оборудование

1. Кипящая водяная баня
2. Вытяжной шкаф
3. Химическая пробирка - 1 шт.

4. Пипетки
5. Мерная пробирка на 10 мл

Техника

1. К 15 каплям раствора яичного белка добавляют 10 капель ледяной уксусной кислоты и добавляют 2 капли сульфата меди (CuSO_4), и нагревают в течение 1 минуты на кипящей водяной бане для растворения белка.

2. Содержимое пробирки охлаждают и аккуратно под углом 45° наслаивают 1 мл (20 капель) концентрированной серной кислоты так, чтобы жидкости не смешивались. На границе соприкосновения двух слоев жидкости возникает красно-фиолетовое кольцо. Окраска постепенно распространяется на весь раствор. При нагревании в кипящей водяной бане окрашивание развивается быстрее.

1.1.4 Реакция Шульце-Распайля

Данная реакция обусловлена наличием в белке остатка триптофана. Триптофан, взаимодействуя с оксиметилфурфуролом, образует продукты конденсации, окрашенные в вишнево-красный цвет. Оксиметилфурфурол в этой реакции образуется из гексоз (быстрее из фруктозы), полученных после кислотного гидролиза сахарозы под влиянием концентрированной серной кислоты. Образование оксиметилфурфуrolа из фруктозы в присутствии серной кислоты происходит в результате следующей реакции, представленной на рисунке 6.

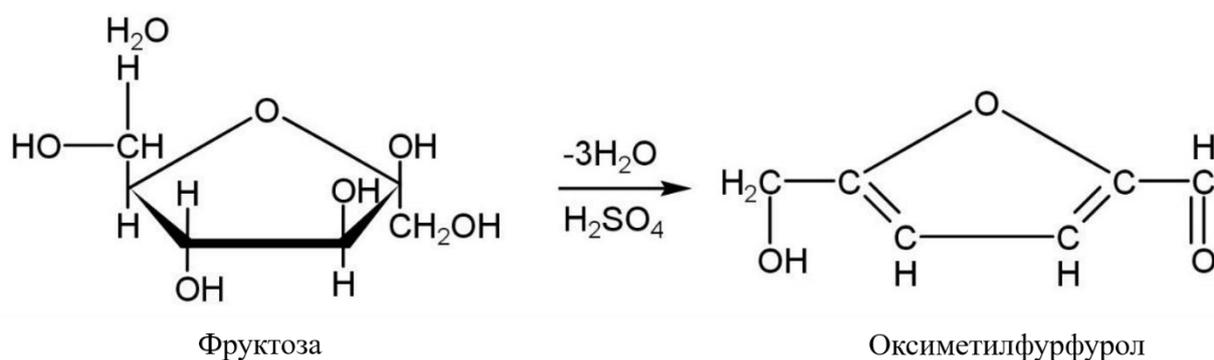


Рис. 6. Реакция образования оксиметилфурфуrolа из фруктозы

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Сахароза, 10 % раствор
3. Концентрированная серная кислота

Материалы и оборудование

1. Вытяжной шкаф
2. Стеклоанная химическая пробирка, 1 шт.
3. Пипетки

Техника

1. К 15 каплям раствора яичного белка добавляют 2 капли 10% раствора сахарозы и осторожно по стенке пробирки наслаивают 1 мл (20 капель) концентрированной серной кислоты.

2. Легким встряхиванием смешивают содержимое пробирки. Вследствие выделения тепла при растворении серной кислоты происходит разогревание раствора на месте соприкосновения двух слоев и появляется вишнево-красное окрашивание. Необходимо следить, чтобы жидкость не перегревалась выше 70°C, так как иначе под воздействием серной кислоты происходит обугливание органического вещества и раствор приобретает бурое окрашивание.

1.1.5 Реакция Фоля

Реакция обусловлена присутствием в белке остатков аминокислот цистина и цистеина, содержащих слабосвязанную серу. Эти аминокислоты под влиянием щелочи при нагревании разрушаются с образованием сероводорода, который в щелочной среде образует сульфид натрия. Он в свою очередь реагирует с плюмбитом натрия, образуя черный осадок сульфида свинца (рисунок 7).

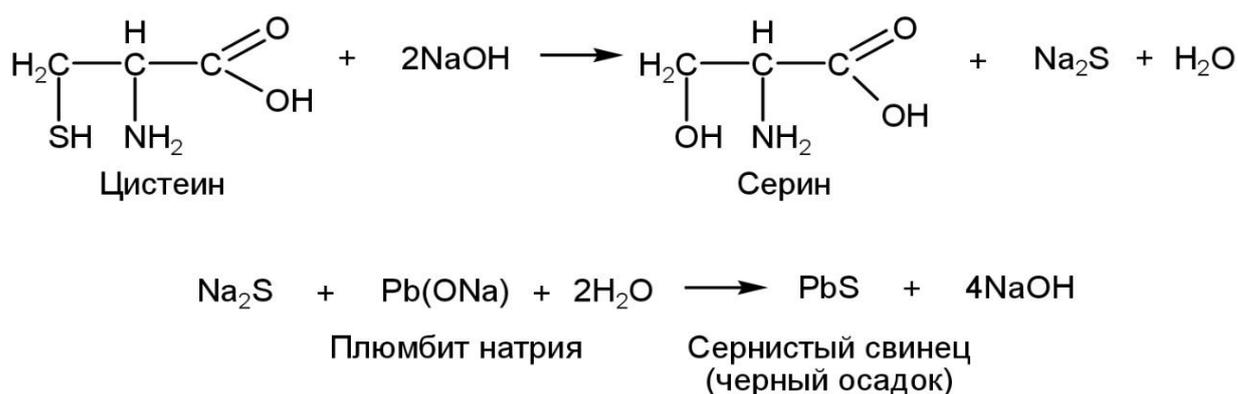


Рис. 7. Схема протекания реакции Фоля

Плюмбит натрия образуется в процессе реакции при взаимодействии ацетата свинца с гидроксидом натрия (рисунок 8).

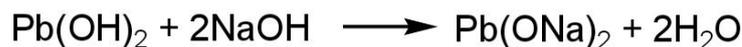
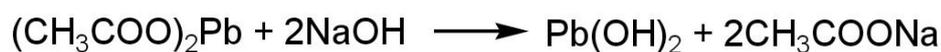


Рис. 8. Схема реакции образования плюмбита свинца

Другая серосодержащая аминокислота метионин является более устойчивой и не разрушается при слабом щелочном гидролизе.

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Гидроксид натрия, 10% раствор
3. Ацетат свинца (II), в кристаллическом виде

Материалы и оборудование

1. Кипящая водяная баня
2. Химический шпатель
3. Секлянная химическая пробирка, 1 шт.
4. Пипетки

Техника

1. В пробирку наливают 10 капель раствора яичного белка и добавляют 10 капель 10 % раствора гидроксида натрия. Далее пробирку помещают на 5 минут в кипящую водяную баню.

2. К горячему раствору шпателем добавляют несколько кристаллов ацетата свинца (II). Раствор буреет и выпадает черный осадок сульфида свинца.

1.1.6 Нингидриновая реакция

Реакция обусловлена наличием в белке остатков α -аминокислот. При нагревании раствора белка с нингидрином образуются окрашенные соединения.

Нингидрин, являясь сильным окислителем, вызывает окислительное дезаминирование α -аминокислоты, приводящее к образованию аммиака, углекислого газа, соответствующего альдегида и восстановленной формы нингидрина (рисунок 9).



Рис. 9. Схема протекания этапа дезаминирования в процессе нингидриновой реакции

Восстановленная форма нингидрина реагирует с избытком нингидрина и с аммиаком, образуя продукт конденсации сине-фиолетового цвета (рисунок 10).

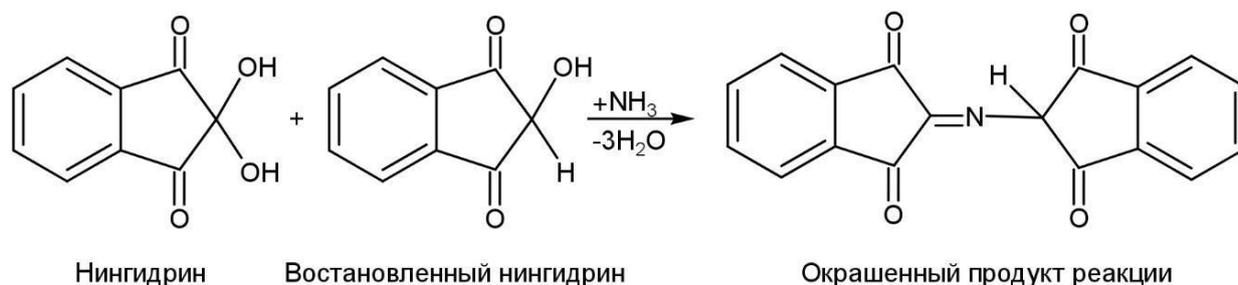


Рисунок 10. Схема протекания этапа конденсации в процессе нингидриновой реакции

В случае аминокислот пролина и оксипролина образуется продукт ярко-желтого цвета. Нингидриновую реакцию дают некоторые амины, амиды кислот, а также аммонийные соли и др. соединения.

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Нингидрин, 0,2 % раствор в спирте

Материалы и оборудование

1. Кипящая водяная баня
2. Химическая пробирка, 1 шт.
3. Пипетки

Техника

1. В пробирку наливают 10 капель раствора яичного белка, добавляют 4 капли 0,2 % раствора нингидрина и помещают в кипящую водяную баню.

2. Через 1-3 минуты наблюдают появление розового, красного, а затем сине-фиолетового окрашивания. Через некоторое время раствор становится синим.

Примечания

Каждая из рассмотренных выше цветных реакций в отдельности не является специфичной для белка. Доказательством присутствия белка может служить лишь положительный результат нескольких реакций.

Раствор яичного белка приготовление: 2 белка куриных яиц отделяют от желтков, добавляют 1 л воды, перемешивают содержимое и фильтруют через марлю или вату.

Рекомендации к составлению протокола

Результаты работы оформить по образцу таблицы 1.

Таблица

Цветные реакции на белки

№	Название	Реактивы и условия	Окраска	Определяемые аминокислоты

1.2 Физико-химические свойства белка

Характерными физико-химическими свойствами белков является незначительная диффузия, высокая вязкость растворов, оптическая активность, способность к набуханию в больших пределах, подвижность в электрическом поле, способность к поглощению Уф-лучей (обусловлено наличием ароматических аминокислот). Физико-химические свойства белков зависят от свойств радикалов аминокислот, входящих в их состав, а также от количества функциональных химических групп. Белки являются амфотерными электролитами, т.к. в их молекуле присутствуют как кислые, так и основные группы. Присутствие диссоциирующих группировок в белках обуславливает определенный суммарный заряд молекулы, зависящий от рН среды. Для каждого белка существует такое значение активной реакции среды, при котором положительные и отрицательные заряды скомпенсированы. *Значение рН, при котором белок не несет суммарного заряда и не движется в электрическом поле, называют изоэлектрической точкой (ИЭТ) и обозначают как pI.* Для большинства глобуляр-

ных белков ИЭТ лежат в кислой области (4,5-6,5). Исключения составляют пепсин-рI около 1, лизоцим рI около 11.

подавляющее число белков являются гидрофильными, т.е. хорошо растворимых в водных растворах. В растворах белки проявляют коллоидные свойства: медленно диффундируют, не проходят через полупроницаемую мембрану, рассеивают свет, характеризуются высокой вязкостью. Благодаря гидрофильным и гидрофобным группировкам белки могут влиять на растворимость других веществ, выступая в роли эмульгаторов. В организме человека, в крови и лимфе, в эмульгированном состоянии находятся жиры.

Для белков характерна денатурация. Под *денатурацией белка* понимают любые, вызванные физическими и химическими воздействиями-изменения, которые при сохранении первичной структуры сопровождаются потерей его биологической активности и других индивидуальных свойств белка. Таким образом, под денатурацией понимают нарушение уникальной структуры нативной молекулы белка.

1.2.1 Диализ белка

Диализом называется освобождение коллоидных растворов от примесей, способных проникать через полупроницаемые растительные, животные и искусственные мембраны (пергамент, бычий или свиной пузырь, пленки из нитроцеллюлозы, ацетилцеллюлозы, целлофана и других материалов). При помощи диализа постепенно происходит удаление веществ, легко проникающих через мембрану, например, электролитов и других кристаллоидов. В то же время белки, обладая макромолекулярной структурой, не проходят сквозь полупроницаемую мембрану. Благодаря этому свойству белка диализ является удобным методом очистки белков от органических и неорганических низкомолекулярных примесей. Проницаемость диализных мембран для низкомолекулярных веществ может объясняться тем, что молекулы и ионы свободно проходят через поры, пронизывающие мембраны, или растворимостью их в веществе мембраны. В организме человека и животных имеются своеобразные мембраны, через которые белковые молекулы не диффундируют (капсула Боумена-Шумлянского, эпителий слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и т.д.). В медицинской практике применяют особые виды диализа, такие как почечный (так называемая искусственная почка) и кишечный диализ для удаления низкомолекулярных токсических веществ.

Устройства, применяемые для диализа, называются диализаторами. В качестве простейшего диализатора может служить модель, в которой формируется мешочек из материала производных целлюлозы. Мешочек наполняется солевым раствором, раствором белка. Мешочек помещается в стакан с дистиллированной водой, как правило, на 20 часов. (рисунок 11).

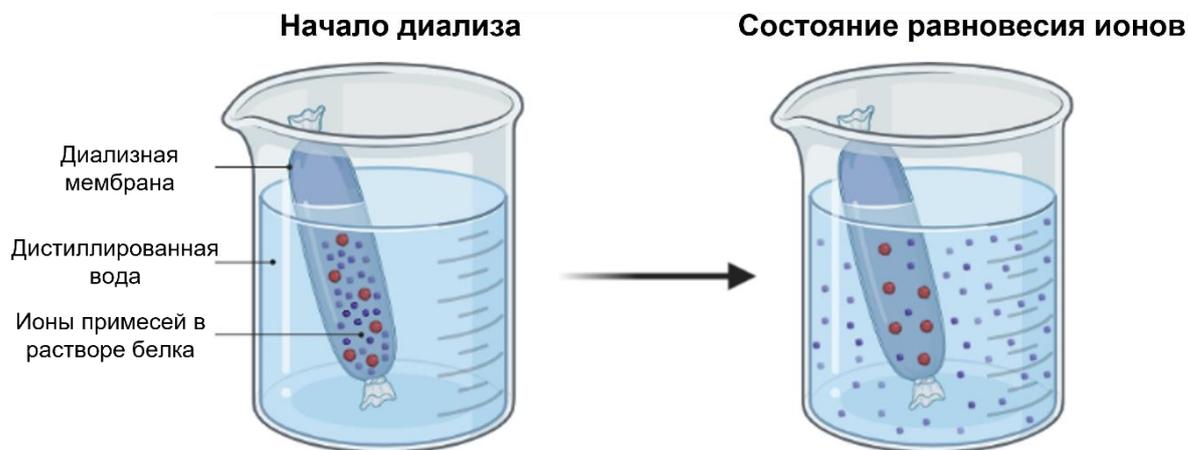


Рис. 11. Схема диализа белка

Молекулы солей и других низкомолекулярных веществ легко диффундируют через мембрану в окружающую среду, а белок остается в мешочке. Метод диализа используют также для разделения альбуминовой и глобулиновой фракций белка. По мере уменьшения концентрации соли в процессе диализа глобулины выпадают из раствора в осадок, так как они растворимы лишь в присутствии электролитов, а альбумины остаются в растворе.

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Хлористый натрий кристаллический
3. Насыщенный раствора хлористого натрия .
4. Диализный мешочек
5. Азотная кислота, 10 % раствор
6. Нитрат серебра (I), 1 % раствор
7. Гидроксид натрия, 10 % раствор
7. Сульфат меди (II), 1 % раствор

Материалы и оборудование

1. Химические пробирки, 5 шт
2. Пинцет
3. Стеклянные палочки

4. Химический стакан с дистиллированной водой

5. Пипетки

Техника

1. К 5 мл раствора яичного белка добавляют 1 каплю насыщенного раствора хлористого натрия.

2. С солевым раствором белка проделывают биуретовую реакцию (см. раздел 1.1), а с дистиллированной водой, предназначенной для наполнения диализационного стакана, пробу на хлориды. Для этого к небольшому количеству воды добавляют 1 каплю 10 % раствора азотной кислоты и 1 каплю 1 % раствора нитрата серебра (I). Осадок не выпадает, что говорит об отсутствии хлоридов.

3. В мешочек наливают 1/3 объема солевого раствора белка и края мешочка подвязывают хлопковой нитью и фиксируют на стеклянной палочке.

4. Мешочек промывают дистиллированной водой, во избежание попадания солей в раствор белка, и помещают в стакан.

5. Через 1-1,5 часа от начала диализа берут две пробы (приблизительно по 10 капель) наружной жидкости (диализат).

6. С одной пробой диализата производят реакцию на хлориды, как описано в пункте 2. Выпадает осадок хлористого серебра, что свидетельствует о том, что ионы хлора продифундировали в дистиллированную воду.

7. С другой пробой диализата проделывают биуретовую реакцию (см. раздел 1.1). Розоватого или фиолетово-красного окрашивания жидкостей не наблюдается, что говорит об отсутствии белка в диализате.

8. Отбирают 10 капель содержимого мешочка (диализируемая жидкость) и производят биуретовую реакцию (см. раздел 1.1). Появление красно-фиолетового окрашивания доказывает то, что белок не проник через поры мембраны и остался в мешочке.

Рекомендации к составлению протокола

Отметить результаты реакции на белок с содержимым диализного мешочка и диализата, а также реакции на хлориды в наружной жидкости до начала диализа и после него. В выводах указать, почему белки не диффундируют через поры полупроницаемой мембраны.

1.2.2 Реакции осаждения белков

Физико-химические свойства белков в значительной степени определяются их высоким молекулярным весом (белки-гидрофильные коллоиды), амфотерностью (белки-амфотерные электролиты) и лабильностью вторичной и третичной структур белка.

Белки под влиянием нагревания или воздействия органических растворителей, концентрированных минеральных кислот, органических кислот, солей тяжелых металлов, алкалоидных реактивов и других факторов претерпевают глубокие изменения, называемые денатурацией. Под денатурацией понимают негидролитическое разрушение белковой молекулы с деградацией ее вторичной или третичной структур. Водородные связи, поддерживающие вторичную структуру сегментов полипептидной среды, не прочные и легко разрушаются уже при нагревании раствора до 60-70°C.

Третичная структура белков поддерживается дисульфидными, ионными, водородными связями, а также благодаря образованию гидрофобного ядра. Ослабление нековалентных внутримолекулярных сил, ответственных за поддержание упорядоченной структуры, путем изменения заряда, гидрофильных свойств растворителя, или отнятия гидратной оболочки, приводит к разворачиванию глобулярной упаковки белков и обнажению гидрофобных участков. Для межмолекулярных взаимодействий становятся доступными функциональные группы, ранее скрытые в белковых глобулах. Потеря устойчивой гидрофильной поверхности макромолекул приводит к увеличению межмолекулярного взаимодействия. При этом за счет ван-дер-ваальсовых сил и гидрофобных взаимодействий, образования новых дисульфидных мостиков, а в некоторых случаях, образования новых ионных и водородных связей соединяются разные полипептидные цепи, что может завершиться агрегацией и коагуляцией денатурированных белков.

Существуют различные способы изменения окружающей среды, влияющие на баланс слабых сил в водных растворах белков. Некоторые из них используются для осаждения белков:

1. Повышение температуры оказывает дезорганизирующее влияние на растворитель и на макромолекулы путем увеличения энергии ее пептидных связей. В результате возникают развернутые формы ранее глобулярных белков.

2. Изменение концентрации водородных ионов приводит к связыванию протонов ионизирующимися группами и модификации заряда белка.

В результате видоизменяются не только ионные связи, стабилизирующие нативную структуру протеинов, но и межмолекулярные взаимодействия.

3. Добавление значительных количеств неводных растворителей (спирты, органические кислоты) и просто углеводов может влиять на конформацию белков либо при непосредственном связывании, либо косвенно, уменьшая диэлектрическую константу среды и, следовательно, увеличивая внутри- и межмолекулярное электростатическое взаимодействие. Кроме того, при прибавлении менее полярных, чем вода, и просто гидрофобных веществ происходит разрушение гидрофобного ядра, т. к. термодинамически более выгодным становится развернутое (денатурированное) состояние ввиду изменения структуры растворителя.

4. Добавление нейтральных солей изменяет электростатическое взаимодействие путем экранирования зарядов в белках. При постепенном увеличении концентрации электролита сначала растворимость белка возрастает, а затем уменьшается. Важное значение в последнем процессе, кроме экранирования зарядов, имеет отнятие гидратной оболочки с поверхности протеина.

5. Ионы тяжелых металлов, таких как серебро, медь, руть и свинец, соединяются с тиоловыми и карбоксильными группами и в высоких концентрациях служат осадителями белков. В некоторых случаях при удалении денатурирующего агента может наблюдаться более или менее полное восстановление свойств белка.

Осаждение белков высаливанием с помощью сульфата аммония (в различных концентрациях) или других средних солей щелочных или щелочноземельных металлов с последующим их удалением путем диализа практикуется для получения очищенных ферментных и гормональных препаратов из органов и тканей, а также лечебных сывороток и вакцин. С той же целью применяют осаждение белков непродолжительным действием спирта или ацетона при низкой температуре.

Реакции осаждения применяются для открытия белка в исследуемом материале, например, в моче при различных патологических состояниях, для разделения белковых фракций (альбуминов и глобулинов). Ими пользуются для освобождения жидкости от присутствия белка, что бывает необходимо при проведении некоторых видов клинических анализов (количественного определения глюкозы в крови и др.).

Наиболее полное осаждение под действием денатурирующих агентов обычно происходит при изоэлектрическом состоянии белка. Это обусловлено тем, что электростатическое отталкивание между полипептид-

ными цепями, извлеченными наружу из глобулы денатурированных белков, в изоэлектрической точке является наименьшим.

1.2.3 Реакции осаждения белков при нагревании

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Уксусная кислота, 1 % раствор
3. Уксусная кислота, 10 % раствор
4. Хлористый натрий, насыщенный раствор
5. Гидроксид натрия, 10 % раствор

Материалы и оборудование

1. Кипящая водяная баня
2. Химические пробирки, 5 шт
3. Лакмусовая бумага
3. Пипетки

Техника

1. В 5 пробирок наливают по 10 капель раствора яичного белка.
2. В первой пробирке нейтральный раствор белка нагревают. Опалесценция усиливается еще до того, как жидкость закипает. При кипячении может выпасть осадок. Растворы белков кипят неровно, толчками, так как белок по стенкам свертывается и в этих местах происходит перенагревание, поэтому нагревание надо проводить осторожно все время встряхивая пробирку. Усиление опалесценции объясняется укрупнением взвешенных частиц белка, они удерживаются во взвешенном состоянии, так как несут заряд.

3. К нейтральному раствору белка во второй пробирке прибавляют 2 капли 1 % раствора уксусной кислоты (до слабокислой реакции на лакмус), осадка при этом не образуется. При нагревании вначале появляется опалесценция, а при дальнейшем нагревании и последующем кипячении выпадает белый хлопьевидный осадок белка. Осадок проявляется вследствие того, что в слабокислой среде исследуемые белки находятся в изоэлектрическом состоянии и, денатурируясь при нагревании, легко теряют свою растворимость в результате агрегации.

4. Нейтральный раствор белка в третьей пробирке подкисляют 10 % раствором уксусной кислоты до сильнокислой реакции среды (добавляют 3 капли) и нагревают до кипения. Осадок не выпадает, поскольку при избытке водородных ионов (по сравнению с той концентрацией ионов, ко-

торая нужна для достижения изоэлектрического состояния) белки, имевшие в исходном растворе отрицательный заряд, перезаряжаются и приобретают положительный заряд, что придает им устойчивость.

5. Раствор белка в 4-й пробирке подкисляют 10 % раствором уксусной кислоты до сильнокислой реакции среды, добавляют 3 капли насыщенного раствора хлористого натрия и кипятят. Появляется белый хлопьевидный осадок белка вследствие экранирования положительного заряда перезаряженных частиц белка противоположно заряженными ионами хлористого натрия путем их адсорбции. Кроме того, большое значение в этой реакции имеет водоотнимающее действие ионов поваренной соли.

6. К раствору белка в 5-й пробирке добавляют 2-4 капли 10 % раствора гидроксида натрия (до щелочной реакции) и кипятят. Осадка не образуется, так как в щелочной среде подавляется основная диссоциация белка, усиливается кислотная, вследствие чего отрицательный заряд на коллоидных частицах белка возрастает еще более.

Рекомендации к составлению протокола

Внести в таблицу 2 результаты реакций осаждения белков при нагревании. В выводах обосновать причину образования или отсутствия осадка в различных условиях реакции среды.

Таблица

Реакции осаждения белков при нагревании в разных условиях среды

Реакция среды	Цвет и характер осадка
Нейтральная	
Слабокислая	
Сильнокислая (10 % CH_3COOH)	
Сильнокислая (10 % CH_3COOH + повышение ионной силы (NaCl))	
Щелочная (10 % NaOH)	

1.2.4 Осаждение белков солями тяжелых металлов

Белки при взаимодействии с солями тяжелых металлов (медь, железо, свинец, цинк, серебро, ртуть и др.) денатурируют и образуют нерастворимые в воде комплексные соединения, которые выпадают в осадок. Возникновение нерастворимых в воде комплексов обусловлено адсорбцией тяжелого металла на поверхности белковой молекулы. В избытке солей

первоначально образовавшиеся осадки растворяются (за исключением солей AgNO_3 и HgCl_2), что связано с адсорбцией тяжелого металла на поверхности коллоидных частиц и появлением положительного заряда на молекуле белка (адсорбционная пептизация). На способности белков образовывать нерастворимые осадки с солями тяжелых металлов основывается использование белков в качестве противоядия при отравлении тяжелыми металлами (ртутные, свинцовые отравления), пока соли этих металлов еще не успели попасть в кровь. При использовании белков (яичный белок, молоко) в качестве противоядий при отравлении следует давать их в больших количествах, учитывая то, что при избытке некоторых солей образуются с белками комплексные растворимые соединения. В случае отравления ртутными солями необходимо помнить, что осадок белка, образующийся при воздействии Hg^{2+} , может раствориться в присутствии поваренной соли.

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Сульфат меди (II), 5 % раствор
3. Ацетат свинца (II), 5 % раствор
4. Нитрат серебра (I), 3 % раствор

Материалы и оборудование

1. Химические пробирки, 3 шт.
2. Встряхиватель для пробирок
3. Пипетки

Техника

1. В три пробирки наливают по 10 капель раствора яичного белка.
2. В первую пробирку добавляют 2 капли 5 % раствора сульфата меди (II), во вторую – 2 капли 5 % раствора ацетата свинца (II) и в третью - 2 капли 3 %- раствора нитрата серебра (I). Выпадает осадок белка во всех трех пробирках.
3. В каждую из трех пробирок добавляют избыток соответствующего осадителя (CuSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, AgNO_3) и растворы перемешивают на встряхивателе. В пробирках с сульфатом меди и ацетатом свинца наблюдается растворение осадка (пептизация). В пробирке с нитратом серебра растворения не происходит.

1.2.5 Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами

Белки при взаимодействии с концентрированными минеральными кислотами, кроме ортофосфорной, денатурируют и осаждаются из раствора. Выпадение белка в осадок обусловлено дегидратацией белковых молекул и рядом других причин, например, образованием нерастворимых комплексных солей из белка, кислот и др.

Возможно, что в условиях кислой среды к положительно заряженным коллоидным частицам притягиваются отрицательно заряженные ионы NO_3^- и, адсорбируясь на молекулах белка, экранируют их заряд. В избытке серной и соляной кислот происходит растворение первоначально выпавших осадков белка. Избыток азотной кислоты не растворяет осажденный белок, поэтому для обнаружения белка в исследуемом материале пользуются азотной кислотой. Реакция с азотной кислотой является высокоспецифичной и высокочувствительной. Она получила широкое применение при клинических исследованиях мочи на присутствие в ней белка (проба Геллера). Эта реакция лежит в основе количественного определения белка по методу Брандберг - Рабертс - Стольников.

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Азотная кислота, концентрированная
3. Серная кислота, концентрированная
4. Соляная кислота концентрированная

Материалы и оборудование

1. Вытяжной шкаф
2. Химические пробирки - 3 шт.
3. Пипетки

Техника

1. В пробирку наливают приблизительно 20 капель концентрированной азотной кислоты и затем, сильно наклонив пробирку (под углом 45°), осторожно по стенке приливают 20 капель раствора белка. В месте соприкосновения двух жидкостей появляется белый аморфный осадок белка в виде кольца (проба Геллера). Осторожно встряхивают пробирку и добавляют избыток азотной кислоты. Осадок не исчезает.

2. То же проделывают, взяв вместо азотной кислоты концентрированную серную и соляную кислоты. Отличие заключается в том, что обра-

зовавшиеся осадки белка в избытке серной и, соответственно, соляной кислоты растворяются.

1.2.6 Осаждение белков органическими кислотами

Реакции с трихлоруксусной (CCl_3COOH) и сульфосалициловой ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$) кислотами являются весьма специфическими и чувствительными (сульфосалициловая кислота открывает белок в разведении 1:50000). Они получили широкое практическое применение в клинических биологических лабораториях при обнаружении белка в моче и других жидкостях. Структурные формулы трихлоруксусной и сульфосалициловой кислот представлены на рисунке 12:

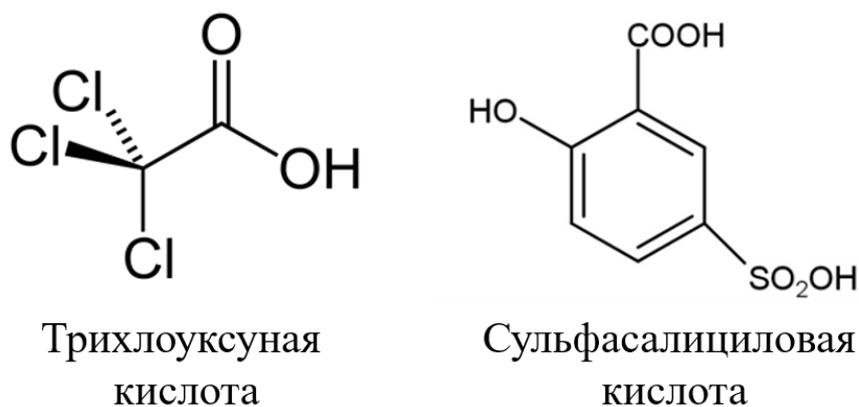


Рис. 12. Структурные формулы трихлоруксусной и сульфосалициловой кислот

Сульфосалициловая кислота осаждает также, помимо белков, продукты их распада - пептоны и высокомолекулярные полипептиды. Трихлоруксусная кислота осаждает только белки, а полипептиды и низкомолекулярные азотсодержащие небелковые вещества остаются в растворе. Это свойство трихлоруксусной кислоты используется при определении небелкового (остаточного) азота крови, в состав которого входят продукты распада и обмена белков (полипептиды, аминокислоты, мочевины, мочевая кислота и др.). При этом белки крови осаждают трихлоруксусной кислотой, отделяют фильтрованием, а фильтраты анализируют на содержание в них небелкового азота. Освобождение фильтрата от трихлоруксусной кислоты достигается кипячением; при этом трихлоруксусная кислота разлагается на хлороформ и угольный ангидрид.

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Сульфосалициловая кислота, 20% раствор
3. Трихлоруксусная кислота, 5% раствор

Материалы и оборудование

1. Вытяжной шкаф
2. Химические пробирки, 2 шт
4. Пипетки

Техника

1. В две пробирки наливают приблизительно по 20 капель раствора белка.
2. В первую пробирку добавляют 2 капли сульфосалициловой кислоты, а во вторую - такое же количество трихлоруксусной кислоты. Наблюдают выпадение осадка белка.

1.2.7 Осаждение белков органическими растворителями

При добавлении к раствору белка органических растворителей, например, спирта, выпадает осадок белка. В зависимости от природы белка для его осаждения требуются различные концентрации спирта. Осаждение наступает только из нейтральных или слабокислых растворов (в слабокислой среде заряд на коллоидных частицах белка является наименьшим) и более полно в присутствии электролитов, например, хлористого натрия, что связано с ослаблением внутримолекулярных ионных связей ввиду конкуренции добавленных анионов и катионов. Если осаждение производить при низкой температуре (от 0 до 15°C) и полученный осадок быстро отделить от спирта, то белок сохраняет свои природные свойства и может быть вновь растворен в воде. Длительное воздействие спирта приводит к необратимой денатурации белка. Однако некоторые белки, например, проламины растений, растворимы в горячем 70–80%-ном спирте, гормон поджелудочной железы инсулин растворяется в подкисленном 60%-ном спирте. Это зависит от особенностей первичной структуры различных белков.

Реактивы

1. Раствор яичного белка
2. Этиловый спирт (96%)
3. Ацетон
4. Хлороформ

5. Хлористый натрий, 1% раствор
6. Уксусная кислота, 1% раствор
7. Хлористый натрий, насыщенный раствор

Материалы и оборудование

1. Вытяжной шкаф
2. Химические пробирки, 3 шт.
3. Пипетки

Техника

1. В первую пробирку наливают около 1 мл раствора белка, а затем при помешивании содержимого пробирки добавляют этиловый спирт до появления осадка. При добавлении 2 капель 1% раствора уксусной кислоты образование осадка усиливается. Еще большее осаждение наблюдается при добавлении 2 капель насыщенного раствора хлористого натрия.

2. Прделывают ту же реакцию во второй пробирке, взяв вместо этилового спирта ацетон.

3. В третью пробирку наливают около 20 капель раствора белка и добавляют равный объем хлороформа. После встряхивания пробирки и последующего разделения слоев воды и хлороформа в верхнем слое жидкости появляется осадок белка. Денатурация белка хлороформом получила распространение при выделении нуклеиновых кислот и их очистке.

1.2.8 Макромолекулярная природа белка

Обнаружение многих аминокислот, выявляемых в составе белка, например, с помощью цветных реакций, позволяет предполагать о крупном размере молекул белка. С помощью физических методов установлено, что молекулярные веса разных белков могут варьировать от 6000 до 1 000 000 дальтон и выше.

1.3.1 Сопоставление молекулярного веса гемоглобина и рибофлавина

Хорошую возможность для разделения веществ с различными размерами молекул предоставляет метод гель-фильтрации. При гель-фильтрации окрашенных смесей их разделение можно устанавливать визуально. Для удобства можно взять окрашенный в красный цвет сложный белок гемоглобин с молекулярным весом 64500 Да и окрашенный в желтый цвет витамин рибофлавин с молекулярным весом 376 Да.

Реактивы

1. Хлористый натрий, 0,9% раствор
2. Гель сефадекс G-75 в 0,9% растворе хлористого натрия
3. Гемоглобин, 5% раствор в 0,9% растворе хлористого натрия
4. Рибофлавин, насыщенный раствор

Материалы и оборудование

1. Хроматографическая колонка 1,6x20 см
2. Штатив с держателем для колонки
3. Дозатор на 1 мл, 1 шт
4. Химическая пробирка, 1 шт
5. Химический стакан на 100 мл, 1 шт
6. Мерный цилиндр на 50 мл, 1 шт
7. Мерный цилиндр на 25 мл, 1 шт

Техника

1. Забивают хроматографическую колонку гелем сефадекс G-75 в 0,9% растворе хлористого натрия.

2. Смешивают в пробирке по 0,2 мл мл гемоглобина и 0,6 мл рибофлавина.

3. Открывают нижний кран колонки и выпускают из нее раствор хлористого натрия, пока верхний мениск жидкости не сравняется с верхним уровнем геля.

4. Сразу после этого равномерно тонкой струйкой, не взмучивая верхний слой, наносят поверх геля 1 мл смеси гемоглобина и рибофлавина.

4. Когда смесь веществ впитается и перейдет в гелевую фазу, аккуратно наслаивают поверх геля 2–3 мл 0,9 % раствора хлористого натрия, не позволяя гелю оставаться без элюирующего раствора.

5. При непрерывном движении жидкости через колонку скоростью около 20–25 капель в минуту наблюдают за перемещением окрашенного кольца (элюцией гемоглобина и рибофлавина). Измеряют количество промывной жидкости (элюата), вышедшей из колонки до момента выделения окрашенных веществ. Отмечают начало расслоения окраски, их разделение. Собирают в отдельные мерные пробирки окрашенный в красный цвет гемоглобин и жёлтый рибофлавин. Показатели объема элюата и окрашенных фракций записывают в протокол.

Рекомендации к составлению протокола

Внесите в таблицу 3 полученных объема фракций. В выводах на основании элюционных объемов качественно сопоставить молекулярные массы гемоглобина и рибофлавина.

Таблица

Результаты гель-фильтрации

Наименование	Объем, мл
Объем фракции гемоглобина	
Объем фракции рибофлавина	
Объем элюата до момента выхода окрашенных фракций	

II ФЕРМЕНТЫ

Ферменты – это катализаторы белковой природы, образующиеся и функционирующие во всех живых организмах. Ферменты являются необычайно мощными биокатализаторами, намного превосходящими по своей эффективности синтетические катализаторы. Они высокоспецифичны 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, когда каждая клетка обеспечена собственным генетически заданным набором ферментов. Только это условие обеспечивает упорядоченную последовательность химических реакций, проходящих с высокой продуктивностью.

Большинство ферментов при гидролизе распадается на аминокислоты (те ферменты, которые являются белками). Некоторые ферменты представляют собой сложные белки, содержащие в своем составе небелковую часть. Если небелковая часть прочно соединена с белковой, она называется простетической группой. В случае, когда небелковая часть свободно диссоциирует от белкового компонента, она носит название кофермента. В роли коферментов обычно выступают витамины или их производные. Вещество, превращение которого катализируется в ходе ферментативной реакции, носит название субстрата. Образование фермент-субстратного комплекса является основой ферментативного катализа.

Некоторые из аминокислотных остатков, входящих в состав фермента, участвуют в построении активного центра. Активный центр – та часть фермента, в которой непосредственно происходит связывание субстрата и его превращение в ходе химической реакции. Если аминокислотные остатки активного центра разрушить или заблокировать, то активность фермента исчезает. *Вещества, инактивирующие фермент и тормозящие его активность, называются ингибиторами. Вещества, увеличивающие каталитическое действие фермента, носят название активаторов.* Активаторы обычно не входят в состав самого фермента, но образуют комплексные соединения в процессе катализа и способствуют протеканию реакции. Среди ингибиторов и активаторов часто встречаются ионы металлов, входящих в состав различных солей. Так, для фермента слюны амилазы активаторами являются, например, ионы кальция, цинка и хлора, а ингибиторами – катионы меди.

Ферменты, будучи белками, неустойчивы к нагреванию. Оптимальной температурой для действия многих ферментов человеческого организма является температура тела (37°C). На активность фермента, также, оказывает влияние рН среды. Зависимость действия фермента от концентрации водородных ионов объясняется изменением диссоциации ионогенных групп (карбокислых или аминных), находящихся в активном центре. Может нарушиться структура фермента (вторичная, третичная), так как при этом видоизменяются водородные и ионные связи. Имеет значение изменение заряда субстрата вследствие того, что некоторые ферменты взаимодействуют с катионом субстрата, а другие – с его анионом. Оптимальная активность большинства ферментов организма человека наблюдается при рН 6-8 (в нейтральной, слабокислой, слабощелочной средах).

Одним из основных свойств ферментов является специфичность их действия. Она проявляется в том, что фермент, как правило действует лишь на определенный субстрат и катализирует лишь определенное его превращение. Различают относительную, абсолютную и стереоспецифичность.

В соответствии с характером катализируемых реакций ферменты подразделяются на 7 классов:

I класс – Оксидоредуктазы: катализируют окислительно-восстановительные реакции.

II класс – Трансферазы: катализируют реакции переноса различных групп от одного субстрата (донор) к другому (акцептор).

III класс – Гидролазы: катализируют разрыв внутримолекулярных связей в субстрате путем присоединения элементов H_2O (гидролиз).

IV класс – Лиазы: катализируют разрыв C-O, C-C, C-N и других связей, а также обратимые реакции отщепления различных групп негидролитическим путем.

V класс – Изомеразы: катализируют изомерные превращения в пределах одной молекулы.

VI класс – Лигаза: катализируют присоединение друг к другу двух молекул с использованием энергии высокоэнергетических связей АТФ (или других макроэргов).

VII – Транслоказы: катализируют движение ионов или молекул через мембраны, или их разделение внутри мембран.

Для унификации принята международная классификация ферментов (КФ) с цифровым кодированием, согласно которой каждому ферменту

присваивается четырехзначный классификационный номер, включающий класс, подкласс, подподкласс и порядковый номер в подподклассе.

2.1 Свойства ферментов

2.1.1 Изучение свойств ферментов на примере α -амилазы слюны

Фермент α -амилаза (1,4- α -D-глюкан-4-глюканогидролаза; шифр КФ: 3.2.1.1) относится к классу гидролаз. Специфическими субстратами α -амилазы являются полисахариды крахмал и гликоген. Большое количество α -амилазы содержится в слюне.

В рамках лабораторных работ для исследования действия α -амилазы слюны в качестве субстрата будет использоваться крахмал. Нерасщепленный крахмал образует с йодом комплекс синего цвета и не обладает восстановительной способностью, так как почти не имеет свободных альдегидных групп. Раствор крахмала опалесцирует вследствие своего коллоидного состояния. α -Амилаза гидролизует α -1,4 глюкановые связи в крахмале, гликогене и олигосахаридах, которые разрываются без определенного порядка. При гидролизе крахмала образуются последовательно промежуточные продукты: амилодекстрины (дают синее или фиолетовое окрашивание с йодом), эритродекстрины (красно-бурое окрашивание с йодом), ахродекстрины (не дают окрашивание с йодом), мальтодекстрины (не дают окрашивание с йодом). В качестве конечного продукта гидролиза крахмала под действием α -амилазы образуется смесь дисахарида мальтозы и моносахарида глюкозы (рисунок 13). И мальтоза, и глюкоза имеют свободные альдегидные группы, вследствие чего они обладают восстановительной способностью и открываются пробой Троммера. Опалесценция в гидролизате крахмала значительно меньше или отсутствует в сравнении с раствором нерасщепленного крахмала.

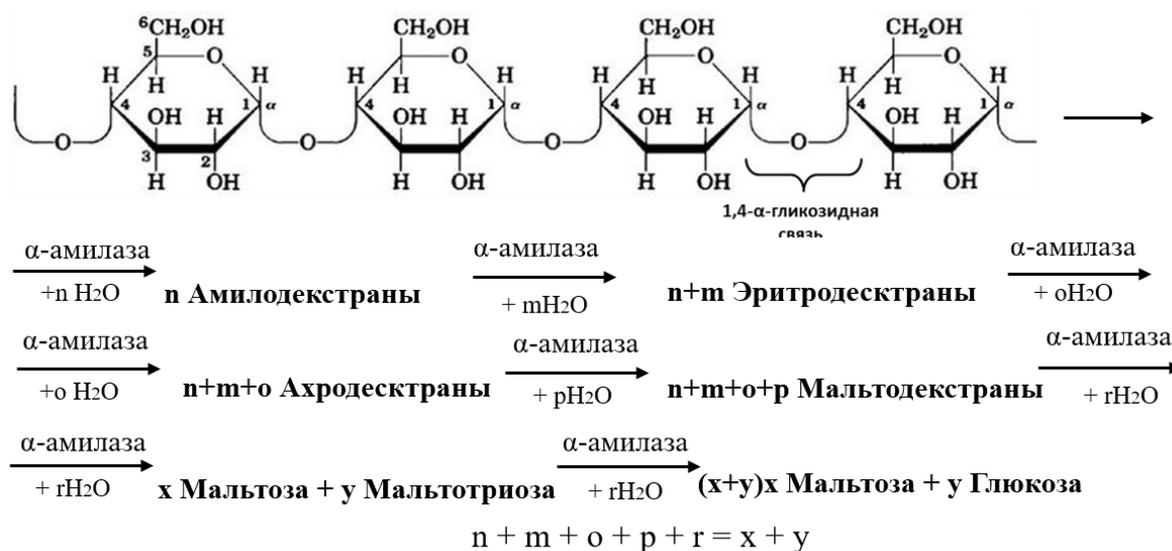


Рис. 13. Схематичное изображение реакции гидролиза крахмала под действием α -амилазы

2.1.1.1. Гидролиз крахмала α -амилазой

Реактивы

1. Разбавленная слюна: слегка ополаскивают рот дистиллированной водой для очищения его от остатков пищи, набирают новую порцию воды (примерно 15-20 мл) и ополаскивают рот в течение 1-2 мин. Собранную в стаканчик жидкость профильтровывают и используют для анализа.

2. Крахмал, 1% раствор, свежеприготовленный

3. Раствор йода в йодистом калии

4. Гидроксид натрия, 10 % раствор

5. Сульфат меди, 5% раствор

Материалы и оборудование

1. Предметные стекла, 6 шт

2. Пипетки

3. Термостат или водяная баня на $+37^{\circ}\text{C}$ и кипящая водяная баня, снабженные термометром

4. Стеклянные палочки

5. Капельницы

6. Стеклянные пробирки, 2 шт

Техника

1. В две пробирки помещают приблизительно по 5 мл 1% раствора крахмала. В одну из них добавляют около 3 мл дистиллированной воды (контрольный опыт), а в другую – около 3 мл разбавленной слюны (ос-

новой опыт). Содержимое обеих пробирок перемешивают стеклянной палочкой и ставят пробирки в термостат при 37°C или держат в зажатой кисти руки. Засекают время.

2. Через несколько секунд (5-7) из контрольного и основного опытов отливают по несколько капель жидкости на стекла с раствором йода в йодистом калии и наблюдают окрашивание. Отбор проб и реакцию с раствором йода производят несколько раз через короткие интервалы. Сначала синее окрашивание будет проявляться от проб, взятых из обеих пробирок; затем из пробирки, где есть амилаза, проба жидкости начнет давать с йодом красно-бурое окрашивание. Вскоре отмечают, что пробы жидкости из пробирки со слюной окрашивания с йодом более не дают. Эти различные окраски от йода указывают на то, что идет постепенный гидролиз крахмала с образованием декстринов. Когда последняя проба жидкости, взятая из пробирки со слюной, не изменит желтого цвета раствора йода, гидролиз считают законченным и записывают время его окончания.

Пробы, взятые из контрольного опыта, все время дают синее окрашивание, что свидетельствует о том, что в отсутствие амилазы гидролиз крахмала не происходит.

3. С частью растворов основного и контрольного опытов производят пробу Троммера (см. 5.1.1.1.). С раствором из пробирки со слюной проба Троммера (см. 5.1.1.1.) будет положительная, вследствие образования конечных продуктов ферментативного гидролиза крахмала. Раствор контрольного опыта пробу Троммера не дает. Наблюдают, что в пробирке с основным опытом опалесценция раствора в процессе гидролиза исчезает.

Рекомендации к составлению протокола

Результаты работы записать в таблицу 4. В выводах обратить внимание на то, что гидролиз крахмала под влиянием α -амилазы идет постепенно, через промежуточные продукты, при температуре тела и близкой к ней, в течение короткого времени. Обосновать, почему конечные продукты гидролиза дают положительную реакцию Троммера (см. 5.1.1.).

Гидролиз крахмала α -амилазой слюны

Название субстрата и продуктов его гидролиза	Окраска при реакции с йодом	Время, затраченное на гидролиз	Температурные условия гидролиза	Реакция Троммера

2.1.1.2 Термолабильность α -амилазы слюны

Ферменты термолабильны, т.е. чувствительны к высокой температуре. Большинство ферментов разрушается при нагревании их до 60–70°C в течение часа. При воздействии более высокой температуры (80–100°C) в течение нескольких минут ферменты обычно полностью утрачивают свою каталитическую активность вследствие денатурации.

Реактивы

1. Разбавленная слюна: слегка ополаскивают рот дистиллированной водой для очищения его от остатков пищи, набирают новую порцию воды (примерно 15-20 мл) и ополаскивают рот в течение 1-2 мин. Собранную в стаканчик жидкость профильтровывают и используют для анализа.
2. Крахмал, 1% раствор (свежеприготовленный)
3. Раствор йода в йодистом калии
4. Гидроксид натрия, 10 % раствор
5. Сульфат меди, 5% раствор

Материалы и оборудование

1. Предметные стекла, 6 шт
2. Пипетки
3. Термостат или водяная баня на 37°C, кипящая водяная баня, снабженные термометром
4. Стеклянные палочки, 6 шт
5. Капельницы
6. Стеклянные пробирки, 4 шт

Техника

1. В пробирку отливают около 2 мл разбавленной слюны и кипятят в течение 2–3 минут (следя за тем, чтобы образующаяся пена также прогревалась), после чего охлаждают.
2. В две пробирки наливают по 10 капель 1 % раствора крахмала. В одну из них добавляют 10 капель разбавленной слюны, в другую – 10

капель разбавленной слюны, предварительно прокипяченной и остуженной.

3. Содержимое обеих пробирок перемешивают и ставят в термостат или водяную баню при 37°C на 10 минут.

4. После 10-минутного действия фермента на субстрат из каждой пробирки отбирают по 1 капли жидкости в заранее заготовленные стекла с 1-2 каплями раствора йода в йодистом калии. Проба из пробирки с непрокипяченной слюной окрашивания с йодом не дает. Проба из пробирки с предварительно прокипяченной слюной дает с йодом синее окрашивание.

5. С оставшейся жидкостью в обеих пробирках производят реакцию Троммера (см. 5.1.1.). Она положительна там, где была непрокипяченная слюна, и отрицательна в случае действия на крахмал предварительно прокипяченной слюной.

Рекомендации к составлению протокола

Полученные данные занести в таблицу 5. В выводах указать, какое влияние оказывает высокая температура на гидролитическую активность α -амилазы, чем оно обусловлено и как доказывается.

Таблица

Термолабильность α -амилазы слюны

Фермент	Субстрат	Наличие крахмала в гидролизате	Реакция Троммера
α Амилаза			
Прокипяченная амилаза			

2.1.1.3 Влияние активаторов и ингибиторов на активность α -амилазы слюны

Для оценки влияния активаторов или ингибиторов каталитическое действие ферментов изучается в присутствии указанных веществ. Полученные результаты исследования сопоставляются с данными, полученными в контрольном опыте, проводившемся без добавления активатора или ингибитора.

Реактивы

1. Разбавленная слюна: слегка ополаскивают рот дистиллированной водой для очищения его от остатков пищи, набирают новую порцию воды (примерно 15-20 мл) и ополаскивают рот в течение 1-2 мин. Собранную в стаканчик жидкость профильтровывают и используют для анализа.

2. Крахмал, 0,5 % раствор, свежеприготовленный

3. Раствор йода в йодистом калии

4. Гидроксид натрия, 10 % раствор

5. Сернистая медь, 1% раствор

6. Сульфат меди, 5% раствор

7. Хлористый натрий, 1% раствор

8. Крахмал, 0,5% раствор

Материалы и оборудование

1. Предметные стекла, 7 шт

2. Пипетки

3. Термостат или водяная баня на +37°C, кипящая водяная баня, снабженные термометром

4. Стеклянные палочки, 6 шт

5. Капельницы

Техника

1. Подготавливают три пробирки. В первую пробирку наливают 10 капель 1% раствора хлористого натрия, во вторую – 10 капель 1% раствора сернистой меди, в третью – 10 капель дистиллированной воды.

2. Во все пробирки добавляют по 20 капель 0,5% раствора крахмала и по 1 капле разведенной слюны.

3. Содержимое пробирок перемешивают встряхиванием, сразу помещают в термостат с температурой 37 °C и отмечают время.

4. Для определения скорости гидролиза крахмала через интервалы в 1-2 минуты из пробирок с гидролизуемым крахмалом отбирают по 1 капле жидкости на стекло и проводят с ней реакцию с раствором йода в йодистом калии (см. работу 5.1.1.1). Гидролиз проводят до стадии эритродекстрина (красно-бурое окрашивание).

5. Отмечают время (в минутах) появления эритродекстрина.

Рекомендации к составлению протокола

Сделанные наблюдения внести в таблицу 6.

Таблица

Влияние активаторов и ингибиторов на активность α -амилазы слюны

Исследуемый агент	Фермент	Субстрат	Время образования эритродекстрина

Время, затраченное на гидролиз крахмала до стадии эритродекстрина в первых двух пробирках, сопоставить со временем гидролиза крахмала в третьей пробирке (контрольной). На основании этого сопоставления сделать вывод об активирующем или ингибирующем действии взятых для исследования веществ.

Примечание

Раствор йода в йодистом калии: В 100 мл воды растворяют 20 г йодистого калия и 10 г йода.

2.1.1.4 Специфичность α -амилазы слюны и сахаразы дрожжей

Специфическими субстратами для амилазы являются полисахариды крахмал и гликоген. Субстратом для фермента сахаразы (α -D-фруктофуранозид-фруктогидролаза) служит дисахарид- сахароза. Сахароза не дает положительную пробу Троммера (см. 5.1.1.1.), так как в ее молекуле нет свободной альдегидной или кетонной группы вследствие дигликозидной связи между остатками глюкозы и фруктозы. После гидролиза сахарозы освобождается альдегидная группа фруктозы, которые и обуславливают положительную реакцию Троммера. Поэтому с помощью пробы Троммера (см. 5.1.1.1.) можно выявить, произошел или не произошел гидролиз сахарозы.

Для исследования специфичности действия ферментов удобно пользоваться сахаразой, содержащейся в вытяжке из дрожжей. На рисунке 14 представлена схема реакции гидролиза сахарозы:

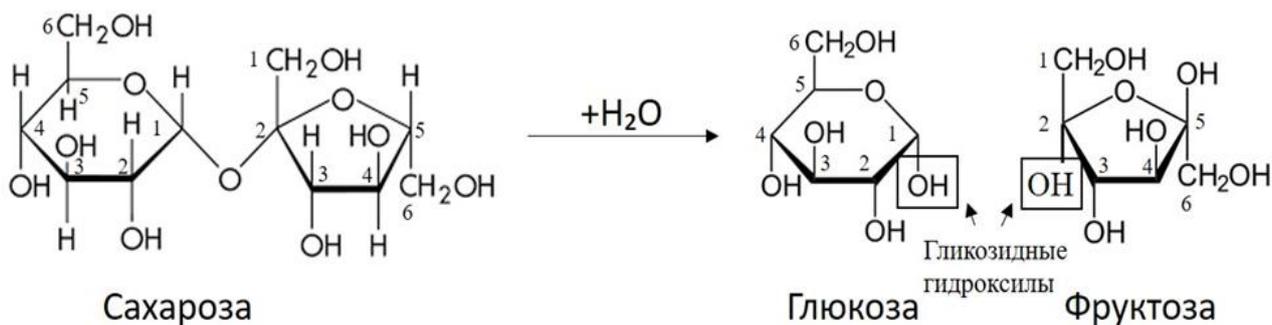


Рис. 14. Схема реакции гидролиза сахарозы

Реактивы

1. Разбавленная слюна: слегка ополаскивают рот дистиллированной водой для очищения его от остатков пищи, набирают новую порцию воды (примерно 15-20 мл) и ополаскивают рот в течение 1-2 мин. Собранную в стаканчик жидкость профильтровывают и употребляют для анализа

2. Сахароза: 20 % профильтрованная взвесь растертых сухих дрожжей

3. Крахмал, 1 % раствор, свежеприготовленный

4. Сахароза, 2 % раствор

5. Гидроксид натрия, 10 % раствор

7. Сульфат меди, 5 % раствор

8. Раствор йода в йодистом калии

Материалы и оборудование

1. Штатив с пробирками, 16 шт

2. Капельницы

3. Термостат или водяная баня на $+37^{\circ}\text{C}$, кипящая водяная баня, снабженные термометром

4. Колба на 100 мл

5. Мерный цилиндр на 25 мл

6. Дозатор на 0,1 мл

7. Конические колбы

9. Дозатор на 1 мл и 3 мл

Техника

1. Производят пробу Троммера (см. 5.1.1.1.) с раствором сахарозы и убеждаются в том, что она отрицательная.

2. Наливают в одну пробирку 10 капель 1 % раствора крахмала, в другую - 10 капель 2 % раствора сахарозы.

3. В обе пробирки добавляют по 5 капель разбавленной слюны, перемешивают содержимое пробирок и ставят в термостат при 37°C на 15 минут.

4. Через 15 минут с жидкостью из обеих пробирок проделывают пробу Троммера (см. 5.1.1.1.). Там, где в качестве субстрата был крахмал, наблюдается восстановление гидрата окиси меди, что указывает на расщепление крахмала под влиянием α -амилазы. В пробирке с сахарозой восстановление гидрата окиси меди не происходит. Это свидетельствует о том, что сахароза не гидролизовалась и, следовательно, она не является специфическим субстратом α -амилазы.

5. Для выявления специфичности сахаразы наливают в одну пробирку 10 капель 1 % раствора крахмала, а в другую – 10 капель 2 % раствора сахарозы.

6. В обе пробирки добавляют по 5 капель сахаразы дрожжей, перемешивают содержимое пробирок и ставят их в термостат при 37 °C на 15 минут.

7. Через 15 минут с жидкостью из обеих пробирок проделывают пробу Троммера (см. 5.1.1.1.). Там, где в качестве субстрата была сахароза, наблюдается восстановление гидрата окиси меди, что указывает на расщепление сахарозы под влиянием сахаразы. В пробирке с крахмалом проба Троммера (см. 5.1.1.1.) отрицательная, следовательно, крахмал не является субстратом для сахаразы.

Рекомендации к составлению протокола

Результаты работы оформить в виде таблицы 7.

В выводах записать, в чем проявляется специфичность ферментов и чем она обусловлена.

Таблица

Специфичность действия α -амилазы и сахаразы

Фермент	Субстрат	Температура гидролиза	Реакция Троммера

2.2 Методы количественного определения активности ферментов

Количественное определение активности ферментов используется в клинике с целью постановки диагноза, наблюдения за эффективностью лечения прогноза.

О количестве фермента чаще всего судят по его активности, которая при определенных условиях пропорциональна концентрации фермента. Для выявления активности обычно определяют количество субстрата, изменяющегося под влиянием фермента в единицу времени.

Согласно рекомендациям комиссии по ферментам Международного биохимического союза единица активности фермента, соответствующая превращению 1 моля субстрата за 1 секунду получила название «катал» и сокращенно обозначается «кат». Эта активность может быть выражена в микромолях (10^{-6} М) – микрокатал, в наномолях (10^{-9} М) – нанокатал и в пикомолях (10^{-12} М) – пикокатал. Специфическая активность выражается отношением каталов на кг белка – кат/кг белка. Молекулярная активность выражается отношением каталов на моли ферментов – каталы/моли фермента. Концентрацию ферментативной активности следует выражать в каталах на литр – каталы/литр или микрокаталы/литр. Если субстратом служит белок, полисахарид или иная молекула, в которой фермент атакует более одной связи, то вместо микромоля субстрата следует учитывать микроэквивалент (мкэкв) затронутых реакцией групп. Иными словами, за меру скорости реакции принимается число расщепленных пептидных или гликозидных связей, а не общее число подвергшихся гидролизу молекул.

За превращением субстрата под влиянием фермента можно следить, пользуясь различными приемами (по убыли субстрата, по появлению в растворе тех или иных продуктов реакции, по изменению некоторых физических показателей и т.д.). При определениях активности фермента следует строго соблюдать установленные для данной методики условия опыта (температуру, кислотность среды, концентрацию субстрата и т.п.).

2.2.1 Определение активности α -амилазы слюны по Вольгемуту

Количественное определение активности α -амилазы по методу Вольгемута основано на установлении предельного разведения раствора α -амилазы, при котором еще происходит в определенных условиях расщепление заданного количества крахмала до эритродекстранов.

Реактивы

1. Неразбавленная слюна: слегка ополаскивают рот дистиллированной водой для очищения его от остатков пищи, минимум 1 мл слюны собирают в чистую посуду.
2. Раствор крахмала, 0,1 % раствор, свежеприготовленный
3. Раствор йода в йодистом калии

Материалы и оборудование

1. Термостат или водяная баня 37 °С
2. Дозатор на 1 мл
3. Пробирки 10 шт

Техника

1. Собирают слюну в стакан, переносят 1 мл ее в другую пробирку, куда добавляют из бюретки 9 мл дистиллированной воды и тщательно перемешивают. Получается раствор слюны 1:10.

2. В 10 пронумерованных пробирок наливают 9 мл воды.

3. В первую пробирку вносят 1 мл разбавленной в 10 раз слюны и перемешивают путем трехкратного втягивания и выпускания жидкости из пипетки. Затем 1 мл жидкости из первой пробирки переносят во вторую пробирку, перемешивая содержимое таким же образом, как это делалось ранее. 1 мл жидкости из второй пробирки переносят в третью, из третьей – в четвертую и т.д. Из десятой пробирки после перемешивания 1 мл жидкости удаляют. Таким образом, в первой пробирке слюна оказывается разбавленной в 20 раз, во второй – в 40, в третьей – в 80 раз и т.д.

Во все пробирки добавляют (начиная с десятой, где концентрация фермента наименьшая) по 2 мл 0,1 % раствора крахмала. Содержимое всех пробирок перемешивают встряхиванием и помещают в термостат при 37 °С на 30 минут.

4. Через 30 минут пробирки охлаждают под краном и добавляют в каждую по 1-2 капли раствора йода в йодистом калии. Отмечают пробирку с наибольшим разведением слюны, при котором произошло расщепление крахмала до эритродекстрина, дающего с йодом красно-бурое окрашивание. Активность α – амилазы выражают объемом в миллилитрах 0,1 % раствора крахмала, который может расщепить 1 мл неразведенной слюны при 37 °С в течение 30 минут до стадии эритродекстрина.

Например, если с красно – бурой окраской жидкость была отмечена в четвертой пробирке, где слюна разбавлена в 160 раз и куда было прибавлено 2 мл 0,1 % раствора крахмала, то 1 мл неразбавленной слюны расщепил бы 0,1 % раствора крахмала в 160 раз больше:

1/160 мл слюны расщепляет 2 мл 0,1 % раствора крахмала,

1 мл слюны расщепляет X мл 0,1 % раствора крахмала,

т.е. $X = (2 \times 1) : (1/160) = 320$ мл 0,1 % раствора крахмала.

Следовательно, 1 мл неразбавленной слюны расщепляет за 30 минут при 37°С 320 мл 0,1 % раствора крахмала. Условно это принимают за 320

единиц α -амилазы по Вольгемуту. Результат принято изображать следующим образом: $A_{37} / 30' = 320$ ед.

Методом Вольгемута можно пользоваться для определения α – амилазы в панкреатическом соке, крови, моче и других жидкостях организма. Однако данный метод позволяет учитывать только резкие различия в активности α – амилазы и пригоден лишь для ориентировочных определений.

Примечания

Раствор йода в йодистом калии (Люголь), 0,1% (50 мл 0,1% J₂ + 100 мл 0,2% KJ + 850 мл H₂O)

Рекомендации к составлению протокола

Полученные данные практической работы занести в таблицу по предлагаемому образцу (Таблица 8).

Таблица

Определение активности α -амилазы слюны по Вольгемуту

№	Разведение слюны	Объем 0,1% раствора крахмала, мл	Температура	Время течения реакции, мин	Реакция с йодом (окраска)

В выводах дать расчет активности амилазы в исследуемой слюне.

III ВИТАМИНЫ

Витамины – незаменимые, низкомолекулярные органические соединения, необходимые для человека, имеющие огромное значение для протекания биохимических и физиологических процессов. В отличие от других соединений, задействованных в метаболизме, они не выполняют структурную или энергетическую роль. На сегодняшний день выделено порядка трех десятков витаминов, изучены их состав и строение, физиологическое действие. Осуществлен химический синтез соответствующих препаратов. Многие витамины функционируют как кофакторы ферментов (витамины А, К, С, тиамин, ниацин, рибофлавин, витамин В₆, биотин, пантотеновая кислота, фолиевая кислота, витамин В₁₂), но не все кофакторы ферментов являются витаминами. Некоторые витамины функционируют как биологические антиоксиданты (витамины С и Е), другие действуют как кофакторы метаболических реакций окисления-восстановления (витамины Е, К, С). Два витамина (А и Д) могут выступать в роли гормонов, витамин А также служит кофактором фоторецепции в процессе зрения.

Некоторые витамины (витамины группы В, витамин К) вырабатываются кишечными бактериями и таким образом поступают в организм. Витамины отличаются от всех других органических продуктов (белков, жиров, углеводов) тем, что они требуются в очень малых количествах. Многие нарушения обмена веществ при авитаминозах (болезнях, возникающих при полном отсутствии в пище какого-либо витамина) или гиповитаминозах (состояниях относительной недостаточности витаминов) рассматриваются как следствие нарушения активности ферментов, коферментные или простетические группы которых содержат витамины. В повышенных дозах (по сравнению с нормой) витамины могут быть использованы в лечебных целях для лечения авитаминозов и гиповитаминозов, однако употребление повышенного количества некоторых витаминов без показаний может оказывать токсическое действие на организм (витамин А, Д).

3.1 Качественные реакции на витамины

Присутствие витаминов в пищевых продуктах и других материалах может быть обнаружено при помощи качественных цветных реакций на витамины или на основании свойства некоторых витаминов флуоресцировать. При этом учитывается способность тех или иных витаминов растворяться преимущественно в воде или в жирах.

3.1.1 Витамин В₂ (рибофлавин)

Витамин В₂ – оранжево-жёлтое кристаллическое вещество, трудно растворимое в воде. Наиболее богатыми источниками этого витамина являются дрожжи, яичный желток, молоко, печень, мясо. Суточная потребность взрослого человека в витамине В₂ составляет 1,5 – 2,5 мг.

Рибофлавин представляет собой замещённый изоаллоксазин, связанный с D-рибитолом. В виде рибофлавин-5-фосфата он входит в состав простетической группы флавиновых ферментов организма человека и животных, которая называется флавинадениндинуклеотид (ФАД). Флавопротеины участвуют в биологическом окислении, катализируя реакции дегидрирования. В связи с этим, при недостатке рибофлавина в организме нарушаются окислительно-восстановительные процессы, что влечёт возникновение авитаминозов (выпадение волос, заболевания глаз, воспалительное поражение слизистой ротовой полости и губ, а также прилежащих участков кожи и др.). Типичным субстратом для флавиновых ферментов в процессе биологического окисления служит восстановленный никотинамидадениндинуклеотид (НАДН).

3.1.1.1 Реакция восстановления витамина В₂

Реакция основана на способности рибофлавина легко восстанавливаться и вновь окисляться. При восстановлении водород присоединяется к азоту по месту двойных связей в изоаллоксазиновом кольце. Источником водорода служит реакция взаимодействия соляной кислоты с металлическим цинком. Выделяющийся водород восстанавливает рибофлавин (раствор жёлтого цвета) через розовый или красный родофлавин (промежуточный продукт) в бесцветный лейкофлавин (рисунок 15).

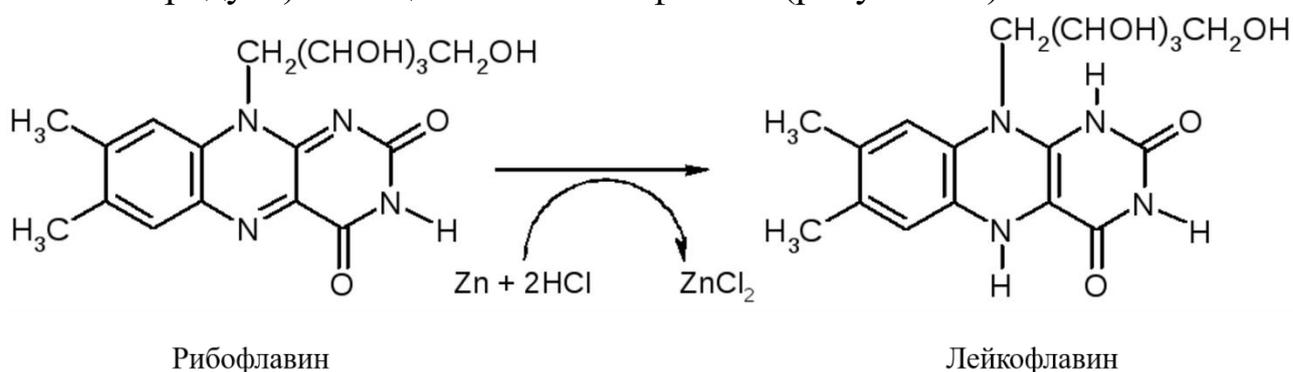


Рис. 15. Схема реакции восстановления рибофлавина

Реактивы

1. Раствор рибофлавина, 0,025% раствор

2. Соляная кислота, концентрированная

3. Цинк, металлический

Материалы и оборудование

1. Стеклоаналитическая пробирка, 1 шт.

Техника

Отмеривают в пробирку 10 капель 0,025% раствора рибофлавина, добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и небольшой кусочек металлического цинка. Сразу наступает бурное выделение пузырьков водорода, жидкость постепенно окрашивается в розовый или красный цвет, затем окраска бледнеет и, наконец, жидкость обесцвечивается.

При взбалтывании обесцвеченного раствора с воздухом лейкосоединение вновь окисляется в рибофлавин.

Поскольку витамин В₂ участвует в построении флавиновых ферментов, описанная реакция имитирует действие этих ферментов в процессе тканевого дыхания.

3.1.2 Витамин В₁₂ (цианкобаламин, антианемический)

Витамин В₁₂ представляет собой игольчатые кристаллы рубиново-красного цвета (благодаря присутствию кобальта). Хорошо растворим в воде и в спирте. Недостаток витамина В₁₂ у человека является причиной возникновения злокачественной анемии, для которой характерно нарушение кроветворной функции костного мозга (уменьшение числа эритроцитов, появление овалоцитов, макроцитов и мегалобластов) и расстройство нервной системы.

Производные витамина В₁₂ исполняют роль коферментов во многих обменных процессах. Они носят название кобамидные коферменты. Ферменты, имеющие в своём составе кобамидные коферменты, участвуют в обмене метильной группы. Они, например, катализируют метилирование пиримидинового кольца при синтезе тимина. Витамин В₁₂ находится главным образом в продуктах животного происхождения. Наиболее богата ими печень рогатого скота и цыплят. Потребность человека в витамине В₁₂ точно не установлена, её оценивают в 1-1,5 мкг в сутки. Витамин В₁₂ применяется как лечебное средство при расстройствах кроветворения, нарушении функций печени, нервной системы.

3.1.2.1 Открытие кобальта, содержащегося в витамине В₁₂, реакцией с тиомочевинной

Реактивы

1. Раствор Витамина В₁₂ (цианкобаламин), раствор для инъекций 0,5 мг/мл
2. Серная кислота, концентрированная
3. Раствор тиомочевины, 10% раствор

Материалы и оборудование

1. Стеклянная пробирка 1 шт
2. Шприц с иглой, пилка для ампул
3. Фильтровальная бумага 5x5см, пинцет, газовая горелка, плитка, держатели для пробирок

Техника

Вскрывают ампулу с раствором витамина В₁₂ и переносят содержимое в пробирку. Добавляют 3-5 капель концентрированной серной кислоты, закрепляют пробирку в держателе и осторожно, держа пробирку наклонно от себя, нагревают над пламенем горелки до обесцвечивания (образуется минерализат). После охлаждения пробирки к минерализату добавляют 1 мл воды, осторожно перемешивая жидкость. Пробирку помещают в штатив.

На беззольный фильтр наносят 2-3 капли 10% раствора тиомочевины и высушивают над плиткой.

На высушенный фильтр наносят 1-2 капли полученного минерализата и вновь нагревают. По краю пятна наблюдают зелёное окрашивание, доказывающее наличие кобальта в молекуле витамина В₁₂.

3.1.3 Витамин РР (В₃, никотинамид, антипелларгический)

Витамином РР (В₃) являются никотиновая кислота и её амид. Они обладают витаминной активностью в одинаковой мере. Никотиновая кислота представляет собой игольчатые кристаллы белого цвета, растворимые в воде и спирте. Не разрушается при варке, воздействии света и воздуха, хорошо выносит автоклавирование.

В организме из никотиновой кислоты или никотинамида образуются никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), участвующие в качестве коферментов в окислительно-восстановительных реакциях, катализируемых дегидрогеназами. Дефицит этих предшественников в организме приводит к недостаточному

синтезу НАД и НАДФ, что влечёт нарушение окисления субстратов тканевого дыхания и других окислительно-восстановительных реакций.

У человека при отсутствии витамина РР в пище возникает пеллагра – заболевание, характеризующееся поражением кожи, расстройствами деятельности желудочно-кишечного тракта и нервной системы. Степень авитаминоза, возникающего при отсутствии витамина РР, зависит также от содержания триптофана в пище, так как в организме человека триптофан превращается в никотиновую кислоту. Наиболее богаты витамином РР дрожжи, печень, почки. Суточная потребность в этом витамине 15-25 мг для взрослых и 15 мг для детей.

3.1.3.1 Качественная реакция на никотиновую кислоту с гидросульфитом натрия

Реакция основана на восстановлении витамина РР гидросульфитом натрия с образованием соединения, окрашенного в жёлтый цвет.

Реактивы

1. Витамин РР (никотиновая кислота), в порошке
2. Раствор бикарбоната натрия, 10% раствор
3. Раствор гидросульфита натрия, 5% раствор, свежеприготовленный

Материалы и оборудование

1. Стеклоанная пробирка 1 шт
2. Стеклоанная лопаточка

Техника

Помещают в пробирку половину стеклоанной лопаточки никотиновой кислоты, добавляют 15 капель 10% раствора бикарбоната натрия и перемешивают. К содержимому пробирки приливают 15 капель свежеприготовленного 5% раствора гидросульфита натрия. Отмечают окрашивание жидкости в жёлтый цвет.

3.1.4 Витамин С (аскорбиновая кислота, антицинготный)

Витамин С – кристаллы кислого вкуса, растворимые в воде. Не имея свободной карбоксильной группы, витамин С тем не менее обладает кислотными свойствами вследствие диссоциации одного из енольных гидроксидов и способности его реагировать с катионами металлов, образуя соли (аскорбинаты). В кристаллическом виде аскорбиновая кислота устойчива, но легко разрушается в водных растворах. Это связано с выраженной её восстанавливающей способностью.

В основе качественных реакций и количественных методов определения аскорбиновой кислоты лежит окислительно-восстановительный процесс: аскорбиновая кислота окисляется в дегидроаскорбиновую, а другое вещество (например, 2,6-дихлорфенолиндофенол) восстанавливается (рисунок 16).

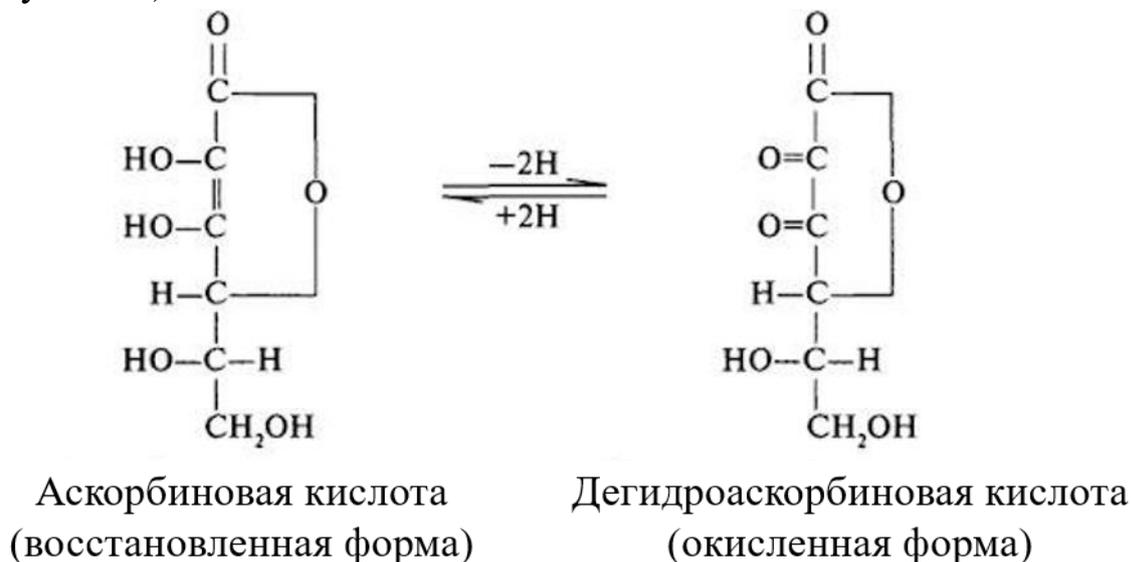


Рис. 16. Реакция окисления/восстановления витамина С

Аскорбиновая кислота в организме способствует некоторым окислительным процессам, например, образованию стероидных оксигормонов в коре надпочечников, необходима для превращения фолиевой кислоты в фолиновую и параоксифенилпировиноградной кислоты в гомогентизиновую (при обмене тирозина), играет роль в образовании дезоксирибонуклеиновой кислоты и коллагена. Она предохраняет от окисления адреналин, тормозит действие фермента гиалуронидазы. При недостатке витамина С в пище у человека развивается цинга. При цинге повышается хрупкость сосудов, возникают кровоизлияния, повреждаются кости и особенно зубы, что связано с дегенеративным превращением специализированных клеток (одонтобластов и остеобластов) в соединительнотканые.

Суточная потребность в аскорбиновой кислоте взрослого человека при средних затратах физического труда – 50 мг. Индивидуальные отклонения от средней потребности в витамине С зависят от возраста, особенностей и состояния организма. Богаты витамином С лимоны, чёрная смородина, шиповник, хвоя, из животных продуктов – печень.

3.1.4.1 Качественная реакция на аскорбиновую кислоту с раствором йода

При взаимодействии аскорбиновой кислоты с раствором йода происходит окислительно-восстановительный процесс: аскорбиновая кислота окисляется в дегидроаскорбиновую, а молекулярный йод восстанавливается с образованием йодистоводородной кислоты (рисунок 17).

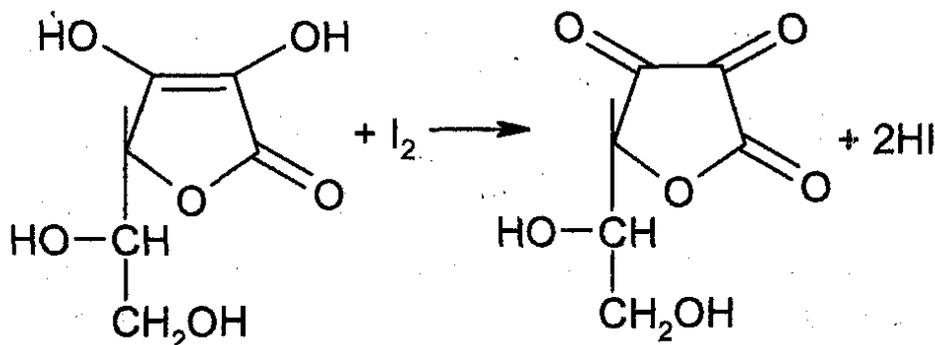


Рис. 17. Схема реакции аскорбиновой кислоты с раствором йода

Реактивы

1. Витамин С (аскорбиновая кислота), раствор или вытяжка из шиповника
2. Раствор йода в йодистом калии (Люголь)

Материалы и оборудование

1. Стеклообразователи, 2 шт

Техника

В две пробирки вносят по 10 капель дистиллированной воды и по 1-2 капли 0,1% раствора йода. В одну пробирку добавляют 10 капель вытяжки из шиповника или раствора витамина С, в другую – 10 капель дистиллированной воды. В пробирке с вытяжкой из шиповника или раствора витамина С раствор йода обесцвечивается.

3.2. 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 че-

ловека и животных. Для выяснения обеспеченности организма человека каким-либо витамином часто определяют соответствующий витамин в сыворотке крови и моче. Однако фотоколориметрические методы могут быть применимы не во всех случаях. Например, витамин А имеет специфическую полосу поглощения при 328 – 330 нм. Для определения витаминов А, В₁, В₂ и других применяют *флюорометрические* методы. Широко используют и *титрометрические* методы. Например, витамин С определяют, титруя его раствор в кислой среде 2,6-дихлорфенолиндофенолом.

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

3.2.1 Количественное определение витамина С в моче (А) и растительном материале (Б) с реактивом Тильманса

Метод основан на способности витамина С восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол (краска Тильманса), который в кислой среде имеет красную окраску, в щелочной – синюю, а при восстановлении обесцвечивается. Для предохранения витамина С от разрушения исследуемый раствор титруют в кислой среде щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания.

Количество витамина С в суточном объёме мочи зависит от содержания его в пище, потребности организма, возраста человека, способности слизистой кишечника к всасыванию. В среднем здоровый человек выделяет 20-40 мг витамина С. По количеству витамина С, выведенного с мочой за сутки, можно судить об обеспеченности организма аскорбиновой кислотой. Однако более надёжным методом обнаружения гиповитаминоза С является проба с нагрузкой организма аскорбиновой кислотой. Определение содержания аскорбиновой кислоты в суточной моче производят дважды: перед нагрузкой (100 мг витамина С через рот) и после. Если содержание витамина С в организме достаточно, то его количество в моче значительно повышается после нагрузки. Напротив, при гиповитаминозе С ткани, испытывающие недостаток в витамине С задерживают принятую внутрь аскорбиновую кислоту и её количество в моче не повышается или будет незначительным. Схема реакции аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (рисунок 18).

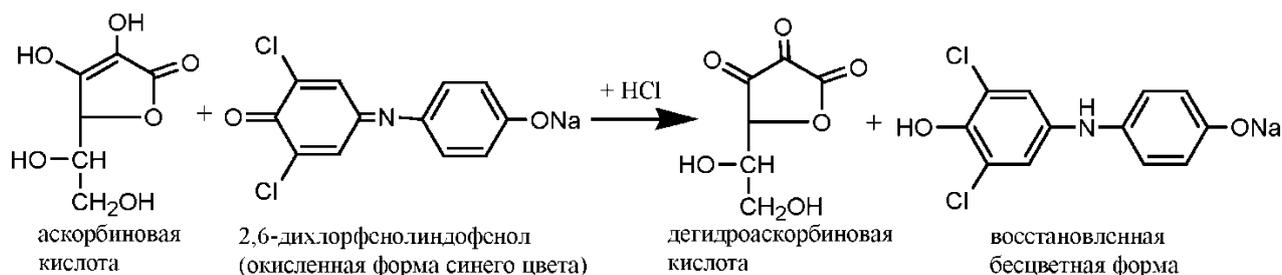


Рис. 18. Схема реакции аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом

Реактивы

1. Подготовленная моча
2. Дистиллированная вода
3. Концентрированная уксусная кислота
4. 0,001н раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола (реактив Тильманса)

Материалы и оборудование

1. Бюретка
2. Колба, 1 шт

Техника

Отбирают в коническую колбу 10 мл мочи, добавляют 10 мл дистиллированной воды и 1 мл концентрированной уксусной кислоты.

Содержимое колбы титруют из микробюретки 0,001н раствором натриевой соли 2,6-дихлорфенолиндофенола (реактив Тильманса) до получения устойчивой розовой окраски. Конечную точку титрования легче заметить, если рядом поставить колбу, содержащую 10 мл мочи и 10 мл воды.

Содержание витамина С в суточном количестве мочи вычисляют по формуле:

Формула 1

$$X = (V \times T \times V_1) / V_2$$

где X – количество аскорбиновой кислоты, выделенное с мочой за сутки, мг

V – количество индикатора, пошедшее на титрование мочи, мл

T (титр) – количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл реактива Тильманса, мг

V₁ – общий объём мочи, собранный за сутки, мл

V₂ – объём мочи, взятый для титрования, мл

Для женщин суточный объём мочи составляет в среднем 1200 мл, для мужчин – 1500 мл.

Выводы: полученные данные сопоставить с показателями выделения аскорбиновой кислоты в норме. Указать, от чего может зависеть количество витамина С в общем объёме мочи, собранной за сутки.

Результаты оформить в виде таблицы:

Таблица

Содержание витамина С в суточном количестве мочи

Исследуемый материал	Общий объём мочи, собранный за сутки (мл)	Количество мочи, взятой для титрования (мл)	Количество реактива Тильманса, пошедшее на титрование (мл)	Содержание витамина С в суточном количестве мочи (мл)

3.2.2 Количественное определение витамина Р (рутин) в чае – чёрном и зелёном

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 0,1н раствора перманганата калия окисляет 6,4 мкг рутина.

Реактивы

1. 100 мг навеска черного и зеленого чая (чай можно заварить перед началом лабораторной работы, 100 мг на 100 мл кипятка)
2. Нагреть дистиллированную воду
3. Индигокармин: 0,01 г краски растворить в 10 мл раствора спирта (1 часть этанола и 4 части воды)
4. 0,05 н раствор перманганата калия

Материалы и оборудование

1. Конические колбы, 2 шт
2. Микробюретка

Техника

К навескам чая чёрного и отдельно зелёного, равным 100 мг приливают по 50 мл горячей дистиллированной воды и проводят экстракцию в течение 5 минут. По 10 мл экстракта 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 жёлтой окраски.

Процентное содержание витамина Р в чае вычисляют по формуле:

Формула 2

$$X = (3,2 \times A \times V_1 \times 100) / (V_2 \times P \times 1000)$$

где X – содержание витамина Р в чае, %

3,2 – стандартный пересчётный коэффициент

A – количество перманганата, прошедшее титрование, мл

V₁ – общий объём экстракта, мл

100 – общее количество вещества для расчёта процентного содержания

V₂ – объём экстракта, взятый для титрования, мл

P – навеска чая, мг

1000 – перевод миллиграммов в микрограммы.

Сравнить содержание витамина Р в чёрном и зелёном чае.

Примечания

Раствор йода в йодистом калии (Люголь), 0,1% (50 мл 0,1% J₂ + 100 мл 0,2% KJ + 850 мл H₂O)

Приготовление 2,6-ДХФиФ 0,001н:

0,25 г красителя растворить в 700 мл дист.воды при энергичном взбалтывании и довести до 1 л буферным раствором. Буфер: KН₂РO₄ – 9,078 г на 1 л дист.воды

NaНРO₄ – 11,867 г на 1 л дист.воды, растворы хранить отдельно.

Смешать в соотношении 2:3, рН = 6,9-7,0

На следующий день раствор краски Тильманса отфильтровать и определить титр по йодноватокислоте калию KJO₃: в мерной колбе на 50 мл растворить примерно 1 мг (2-3 кристаллика) аскорбиновой кислоты в 30 мл 2%-ой серной кислоты и довести объём до метки тем же раствором кислоты. В две конические колбы отобрать по 5 мл полученного раствора, раствор в одной колбе оттитровать 0,001н раствором 2,6-ДХФиФ до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 секунд. Во вторую колбу добавить несколько кристалликов йодида калия KJ, 5 капель 1% раствора крахмала и оттитровать 0,001н раствором йодата калия

до появления едва заметного синего окрашивания (0,03568 г $KJО_3$ растворяют в небольшом количестве воды и доводят до 1 л).

Рассчитать ориентировочный титр 2,6-дихлорфенолиндофенола по аскорбиновой кислоте. Т.е. определить, какому количеству аскорбиновой кислоты (мг) соответствует 1 мл 0.001 н. 2,6-дихлорфенолиндофенола, исходя из того, что 1 мл 0,001н раствора иодата калия, эквивалентен 0,088 мг аскорбиновой кислоты.

$$T = 0,088 \times V_{KJО_3} / V_{2,6ДХФиф}, \text{ мг}$$

IV ГОРМОНЫ

Гормоны – вещества органической природы, информационные молекулы, координирующие деятельность различных клеток многоклеточного организма. Гормоны продуцируются железами внутренней секреции, поступают в кровь и оказывают регулирующее влияние на обмен веществ и физиологические функции. Химическая природа почти всех известных гормонов выяснена. Некоторые гормоны по своей химической природе относятся к белкам и пептидам (гормоны передней и задней частей гипофиза, инсулин). Другие являются производными аминокислот, в основном тирозина (тироксин, адреналин, норадреналин). Жирорастворимые гормоны коры надпочечников и половые гормоны имеют стероидную природу. Вырабатываясь в секреторном эпителии желез внутренней секреции, они поступают непосредственно в лимфатические пространства и кровь. Высвобождение гормонов регулируется по принципу обратной связи.

Функция эндокринных желез как в норме, так и в патологических условиях возбуждается или тормозится импульсами, идущими из центральной нервной системы. Вместе с тем и сами гормоны влияют на центральную нервную систему. Например, у больных базедовой болезнью (гиперфункция щитовидной железы) наблюдается повышенная нервная возбудимость с усиленной продукцией гормонов щитовидной железы (тиреотоксикоз).

В клетках, реагирующих на гормон или медиатор имеется рецептор, присоединяющий эти информационные молекулы с высоким сродством и специфичностью. Рецепторы бывают внутриклеточные и мембранные.

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

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

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

Биологическое действие гормонов следующее:

Изменяют проницаемость мембраны для определенных веществ (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, участвуют в ответных, адаптационных реакциях на стресс.

4.1 Гормон поджелудочной железы – инсулин

Инсулин является белком, состоящим из двух полипептидных цепей – А и Б, соединённых между собой двумя дисульфидными мостиками. Разрыв этих мостиков приводит к потере инсулином гормональной активности. Цепь А содержит 21 аминокислотный остаток, цепь Б – 30 аминокислотных остатков. Биосинтез инсулина происходит в β -клетках островков Лангерганса (от латинского *insula* – островок) из проинсулина, состоящего из одной полипептидной цепи, содержащей 84 аминокислотных остатка путём разрыва этой цепи в двух точках с отщеплением соединяющего пептида, включающего 33 остатка аминокислот. Первичная структура его изучена, инсулин синтезирован химическим путём из аминокислот, производится генноинженерным методом.

Основные функции инсулина в организме следующие: 1) инсулин увеличивает проницаемость мембран жировых и мышечных клеток по отношению к глюкозе путём перемещения глюкозотранспортера 4 из эндосом на поверхность клеток; 2) активизирует синтез гексокиназы (глюкокиназы) печени – фермента, катализирующего фосфорилирование глюкозы; 3) усиливает синтез из глюкозы гликогена и жиров; 4) замедляет окисление жирных кислот; 5) тормозит глюконеогенез (превращение белков в глюкозу) путём подавления синтеза ключевых ферментов этого процесса.

Все эти влияния инсулина вызывают понижение уровня глюкозы в крови – гипогликемию. Напротив, недостаток инсулина – как это наблюдается при заболевании сахарным диабетом – приводит к гипергликемии (повышению концентрации глюкозы в крови), последующей глюкозурии (выделению глюкозы с мочой) и появлению ацетоновых тел в моче, образующихся вследствие усиленного распада жирных кислот. Для нормализации углеводного и жирового обменов больным сахарным диабетом вводят парентерально препараты инсулина, полученных из панкреатических желез свиней, рогатого скота или генно-инженерным способом. Инсулин

легко разрушается в кишечнике протеолитическими ферментами, что делает невозможным введение его через рот.

Химическую природу инсулина можно обнаружить цветными реакциями и реакциями осаждения, характерными для белков. Наличие серы в инсулине открывается реакцией Фоля.

4.1.1 Качественные реакции на инсулин

Реактивы

1. Инсулин или раствор яичного белка
2. Сульфосалициловая кислота, 20% раствор
3. Гидроксид натрия NaOH, 10% раствор
4. Сульфат меди CuSO₄, 5% раствор
5. Уксуснокислый свинец [Pb(CH₃COO)₂] кристаллический

Материалы и оборудование

1. Стеклянные пробирки, 3 шт
2. Кипящая водяная баня, снабженная термометром

Техника

1. К 1 мл (20 капель) раствора инсулина прибавляют 3-5 капель 20% раствора сульфосалициловой кислоты. Наблюдают выпадение осадка.

2. Инсулин даёт ряд реакций, специфических для белков. Прodelать некоторые из них.

Биуретовая – 15 капель инсулина, 15 капель NaOH 10% по каплям CuSO₄ 5% до появления розово-фиолетового окрашивания.

Фоля – 10 капель инсулина, 10 капель NaOH 10%, нагреть 5 минут, добавить сухой уксуснокислый свинец [Pb(CH₃COO)₂] на кончике стеклянной палочки. Выпадает чёрный осадок сернистого свинца PbS.

4.2 Гормон мозгового слоя надпочечников – адреналин

В мозговом слое надпочечников синтезируются катехоламины, имеющие пирокатехиновое ядро и аминогруппу (рисунок 19):

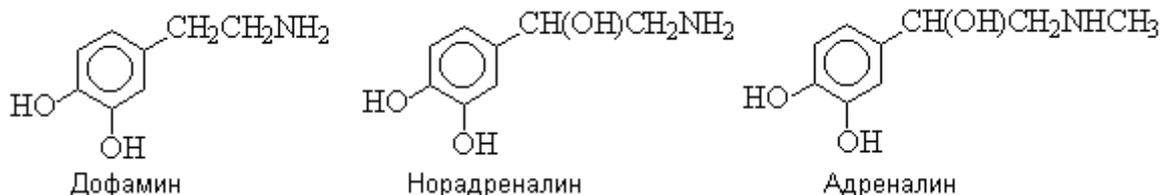


Рис. 19. Структурная формула дофамина, норадреналина и адреналина

Биосинтез катехоламинов происходит из аминокислоты тирозин, которая также легко может образоваться из фенилаланина (в печени).

Катехоламины, а также глюкагон (гормон поджелудочной железы) и адренкортикотропный гормон (АКТГ – гормон передней доли гипофиза) способствуют распаду гликогена, стимулируют фосфоорилазную активность в печени, мышцах, надпочечниках, но не прямо, а через аденилатциклазу.

Адреналин легко окисляется на воздухе с образованием аденохрома, окрашивающегося в щелочной среде в красный цвет. При взаимодействии с нитритами наблюдается жёлто-оранжевое окрашивание, с диазореактивом – красное, с хлорным железом – зелёное, с йодатом калия – красно-фиолетовое.

4.2.1 Качественные реакции на адреналин

Реактивы

1. Адреналин для качественных реакций (3 ампулы на 25 мл воды)
2. Хлорид железа $FeCl_3$, 1% раствор
3. Гидроксид натрия $NaOH$, 10% раствор
4. Нитрит натрия $NaNO_2$, 5% раствор
5. Сульфаниловая кислота, 1% раствор
6. Карбонат натрия Na_2CO_3 , 10% раствор, свежеприготовленный
7. Йодат калия KJO_3 , 10% раствор
8. Уксусная кислота CH_3COOH , 10% раствор

Материалы и оборудование

1. Пробирки, 3 шт
2. Термостат или водяная баня на $65^{\circ}C$, кипящая водяная баня, снабженные термометром

Техника

1. **С хлоридом железа (III).** При добавлении к раствору адреналина хлорного железа жидкость окрашивается в изумрудно-зелёный цвет вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа. Реакция с хлорным железом доказывает наличие пирокатехинового ядра в молекуле адреналина (рисунок 20).

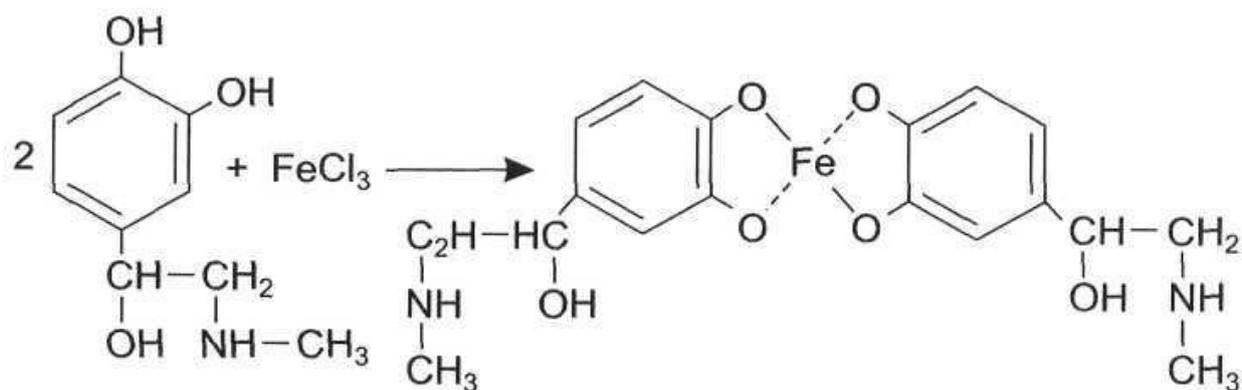


Рисунок 20. Схема взаимодействия реакции адреналина с хлорным железом

В пробирку вносят 1 мл 0,1% раствора адреналина, прибавляют 1 каплю 1% раствора трёххлористого железа и перемешивают. Наблюдают появление изумрудно-зелёной окраски. Затем добавляют 1 каплю 10% гидроксида натрия – возникает вишнёво-красное окрашивание.

2. С диазореактивом. При взаимодействии диазореактива с адреналином жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования сложного соединения типа азокрасителя.

К 1 мл 1% сульфаниловой кислоты прибавляют 1 мл 5% раствора нитрита натрия, затем 1,5 мл раствора адреналина и 1 мл 10% раствора карбоната натрия. Перемешивают, наблюдают окрашивание раствора в красный цвет.

3. С йодатом калия. Адреналин в кислой среде с йодатом калия образует соединение красно-фиолетового цвета.

К 0,5 мл раствора адреналина прибавляют 1 мл 10% раствора йодата калия и 10 капель 10% раствора уксусной кислоты, смесь подогревают до 60-65°C. Появляется интенсивное красно-фиолетовое окрашивание.

4.2.2 Количественное определение адреналина

Метод основан на фотоколориметрическом или спектрофотометрическом определении интенсивности синего окрашивания, которое образуется при взаимодействии адреналина с реактивом Фолина.

Реактивы

1. Стандартный раствор – 1 мл аптечного раствора адреналина развести водой в мерной колбе на 25 мл

2. Исследуемый раствор – 1 мл аптечного раствора адреналина развести водой в мерной колбе на 50 мл

3. Карбонат натрия Na_2CO_3 10% раствор, свежеприготовленный

4. Реактив Фолина

Материалы и оборудование

1. Фотоэлектроколориметр или спектрофотометр с красным фильтром

2. Стеклянные пробирки большие, 3 шт

Техника

Подготовить три сухие мерные пробирки на 10 мл:

Первая пробирка, контроль – 1 мл дистиллированной воды, 4 мл 10% раствора карбоната натрия, 0,5 мл реактива Фолина;

вторая пробирка – 1 мл стандартного раствора адреналина (0,04 мг/мл), 4 мл 10% раствора карбоната натрия, 0,5 мл реактива Фолина;

третья пробирка – 1 мл исследуемого раствора адреналина, 4 мл 10% раствора карбоната натрия, 0,5 мл реактива Фолина.

Содержимое пробирок встряхивают. Жидкость постепенно окрашивается в синий цвет, достигающий наибольшей интенсивности через 3-5 минут. Далее, объём жидкости в пробирках доводят до метки 10 мл раствором карбоната натрия и перемешивают.

Измеряют оптическую плотность стандартного и исследуемого растворов на фотоэлектроколориметре с красным фильтром. Концентрацию адреналина в исследуемом растворе (мг/мл) рассчитывают по формуле:

$$C = 0,04 \times D_{\text{исл}}/D_{\text{станд}}, \text{ мг/мл}$$

Где C – концентрация адреналина в исследуемом растворе, D – оптическая плотность.

Примечания

Вместо инсулина можно взять раствор белка. Адреналин разводить непосредственно перед занятиями. ФЭК прогреть минут 30, можно оставить включенными на весь день, но с поднятой крышкой. Длина волны 670 нм, кюветы простые из оптического стекла. Замеряем контроль и стандарт, замеряем по инструкции. Затем стандарт меняем на исследуемый раствор, снова производим замер.

Приготовление реактива Фолина: 100 г вольфрамата натрия NaWO_4 двухводного + 25 г молибдата натрия + 700 мл воды, к смеси добавить 50 мл 85% фосфорной кислоты (конц. фосф. кислота) и 100 мл конц. соляной кислоты пл. = 1,19. Кипятить в колбе на 1000 мл на слабом огне 10 часов с обратным холодильником (или закрыть фольгой) в вытяжном шкафу. После этого в колбу добавить 150 г сернокислого лития, 50 мл воды и 5 ка-

пель бромной воды. Кипятить 15 минут для удаления избытка брома, после охлаждения довести до 1 литра, отфильтровать и хранить в тёмной посуде.

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 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 гидролизоваться. Олигосахаридами - называются углеводы, гидролизующиеся с образованием 2-10 молекул - моносахаридов. Полисахариды высокомолекулярные углеводы, при гидролизе - которых образуются сотни и тысячи - молекул моносахаридов. Классификация углеводов представлена на рисунке 21.



Рис. 21. Классификация углеводов

5.1 Строения 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 полигидрокарбонильные соединения, т.е. полигидроксиальдегиды (альдозы) и полигидроксикетоны (кетозы). Моносахариды - в зависимости от длины углеродной цепи (3-10) делятся на триозы, тетрозы, пентозы, гексозы, гептозы и т. д.

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

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

В циклической форме возникает дополнительный центр хиральности, так как асимметрическим становится атом углерода, входивший ранее в альдегидную группу. Этот хиральный центр называется *аномерным*, а соответствующие два стереоизомера – α и β 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 представлены на рисунке 22.

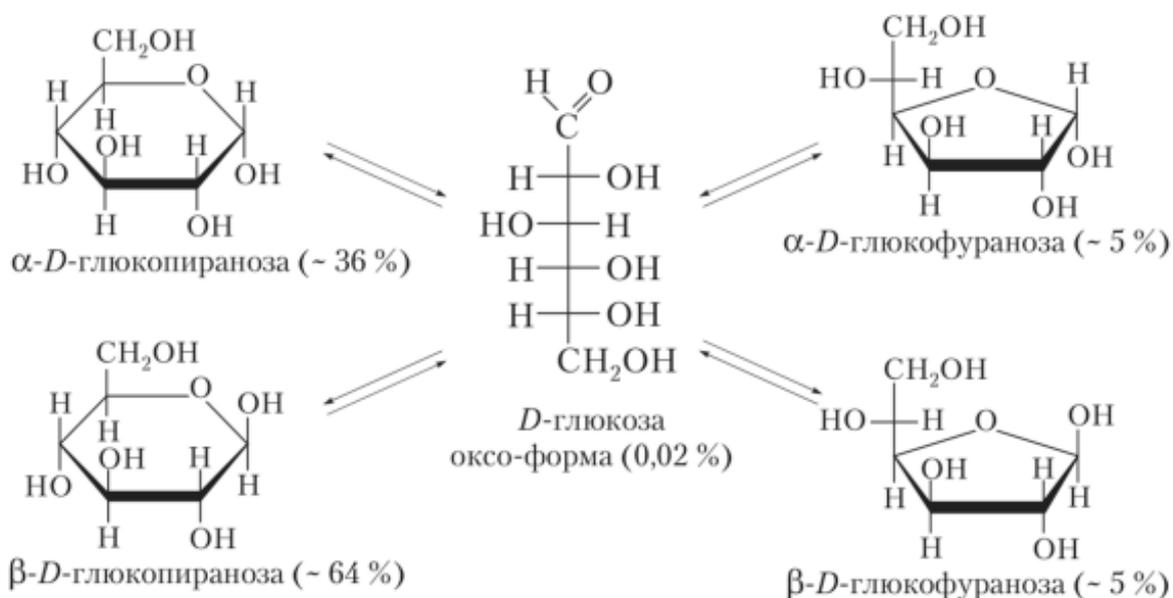


Рис. 22. Таутомерные превращения D-глюкозы

В проекции Хеурса не учитывается тот факт, что в действительности пиранозный цикл не плоский, а имеет форму кресла. Полуацетальная гидроксильная группа у β -аномера D-глюкопиранозы занимает экваториальное, а у α -аномера - аксиальное положение. Таким образом, β -аномер, отличается от α - аномера тем, что у него все заместители находятся в более выгодном экваториальном положении (в таутомерной смеси D-глюкопиранозы в количественном отношении преобладает β -аномер). Схема химических превращений D - глюкозы представлена на рисунке 23.

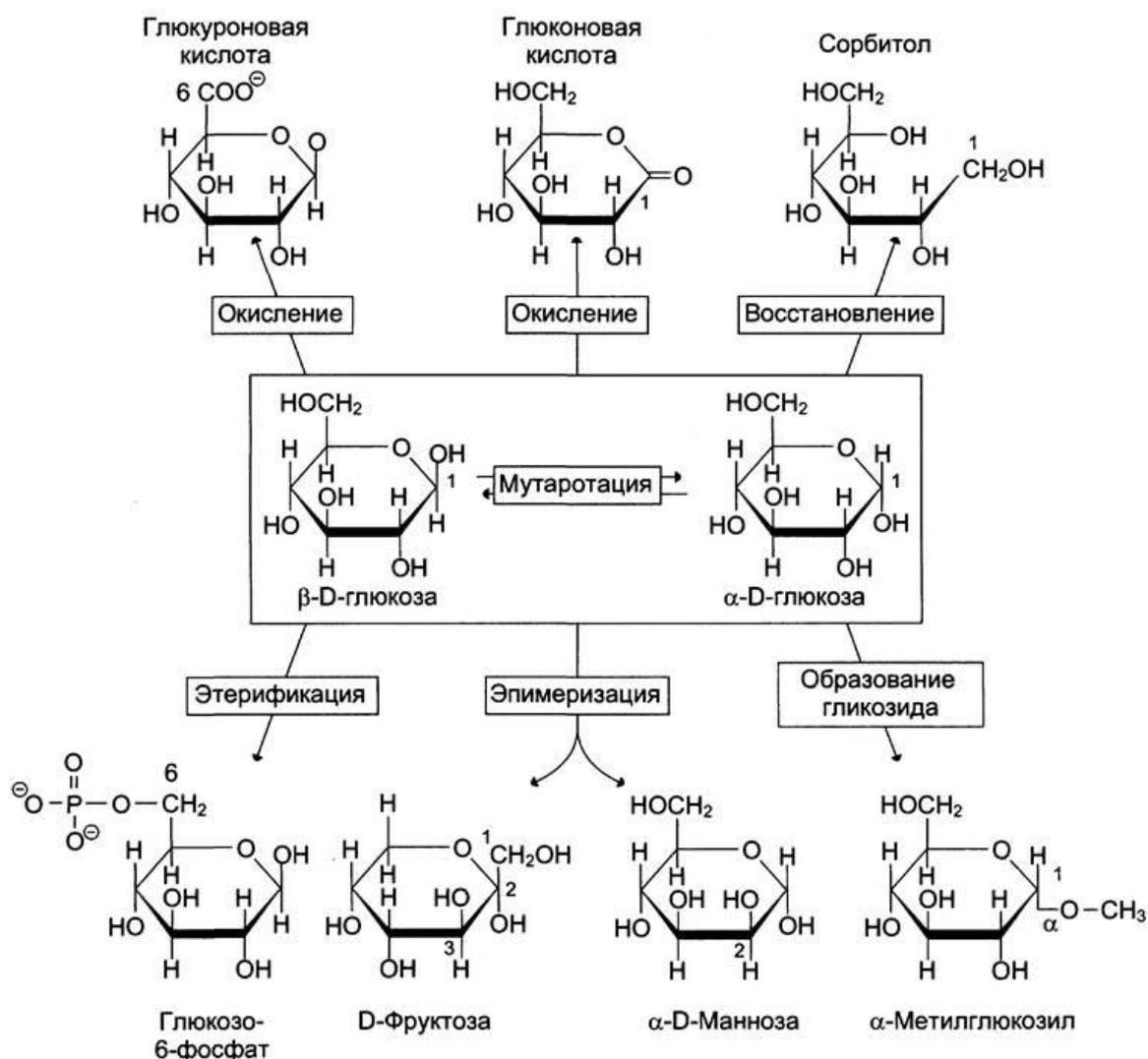


Рис. 23. Схема химических превращений D – глюкозы

Конформационное строение D-глюкопиранозы объясняет уникальность этого моносахарида. В - D-Глюкопираноза - единственный моносахарид с полным экваториальным расположением заместителей. Обусловленная этим высокая термодинамическая устойчивость — основная причина широкой, распространенности D-глюкозы в природе.

Моносахариды отличаются большой реакционной способностью, могут окисляться и восстанавливаться, полуацетальный гидроксил может замещаться с 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 равной 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-гидроксиметилфурфурол, которые способны вступать в реакции конденсации с α – 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 (α или β). 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 встречаются ограниченное число, основные из них мальтоза, целлобиоза, лактоза, сахароза. Значительно шире распространены дисахаридные фрагменты, входящие в состав гликозидов растительного и бактериального происхождения.

β - Мальтоза (солодовый сахар) - основной продукт гидролиза крахмала и под действием фермента β - амилазы.

В мальтозе остатки двух молекул D-глюкопиранозы связаны α - гликозидной связью, которая образуется полуацетальным гидроксильным в α –положении со спиртовым гидроксильным С - 4 второй молекулы, а свободный полуацетальный гидроксил может иметь как α - (α - мальтоза), так и β – конфигурацию (β -мальтоза), (рисунок 24).

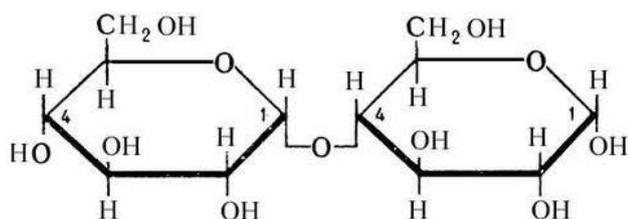


Рис. 24. Схематичная формула молекулы мальтозы

β - Целлобиоза, как и мальтоза, состоит из двух D-глюкопиранозных остатков, связанных 1,4-гликозидной связью, однако она имеет β – конфигурацию (рисунок 25).

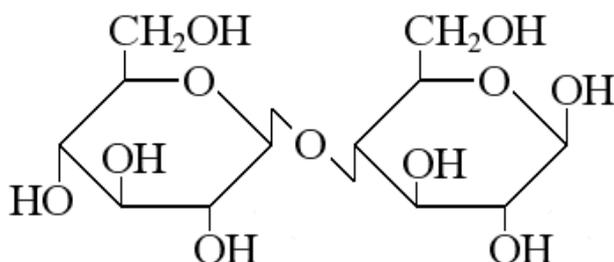


Рис. 25. Схематичная формула молекулы β – Целлобиозы

β - Лактоза (молочный сахар) - важнейший углеводный компонент молока млекопитающих (рисунок 26). В коровьем молоке содержится до 4,5% лактозы, в женском молоке – до 7,5 %.

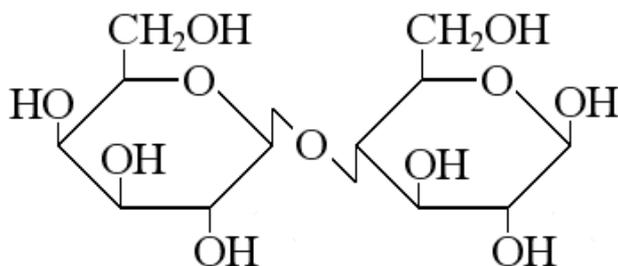


Рис. 26. Схематичная формула молекулы β – Лактозы

Лактоза состоит из остатков β – D – галактопиранозы и D – глюкопиранозы, связанных β – 1,4 – гликозидной связью, в образовании которой принимают участие аномерный атом галактопиранозы, имеющий β -конфигурацию, и спиртовый гидроксил С-4 D-глюкопиранозы. Аномерный атом глюкапиранозного фрагмента может иметь как α (α - лактоза), так и β – конфигурацию (β - лактоза).

Сахароза состоит из α – D - глюкопиранозы и β -D- фруктофуранозы (рисунок 27). В сахарозе обе аномерные ОН-группы связаны гликозидной

связью, и, следовательно, сахароза относится к невосстанавливающим дисахаридам). В растениях сахароза является растворимым резервным сахаром.

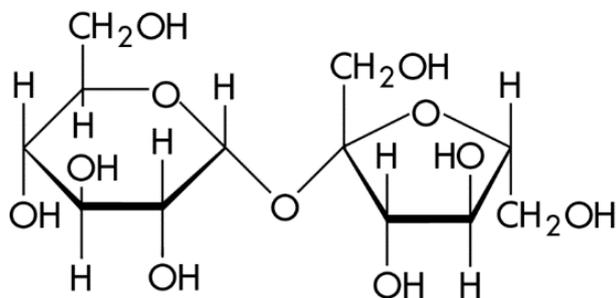


Рис. 27. Схематичная формула сахарозы

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 энергитическим 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), (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 (рисунок 28).

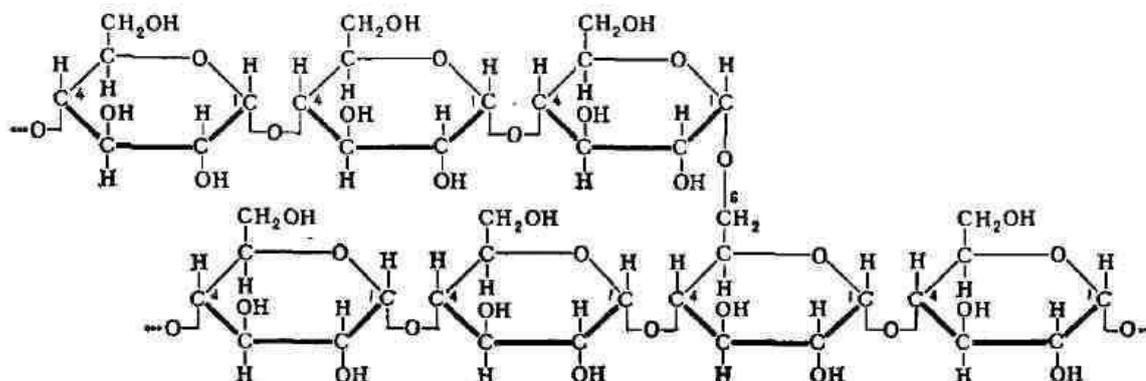


Рис. 28. Структурная формула гликогена

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 положениях $\alpha - 1,6$.

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 10 - Важнейшие представители полисахаридов

Полисахарид	Моносахарид 1	Моносахарид 2	Тип связи	Тип связи в точках ветвления	Источник
Мурамин	N-ацетилглюкозамин	N-ацетилмурановая кислота	$\beta-1,4$		Клеточные стенки бактерий
Декстран	α -D-глюкопираноза		$\alpha-1,6$	$\alpha-1,3$	Слизи бактерий
Крахмал	α -D-глюкопираноза		$\alpha-1,4$	$\alpha-1,6$	Хлоропласт листьев, плоды, семена, клубни

					растений
Целлюлоза	β -D-глюкопираноза		β -1,4		Клеточные стенки растений
Агароза	D-галактоза	3,6-ангидрогалактоза	β -1,4	β -1,3	Красные водоросли (агар)
Инулин	D-фруктоза		β -2,1		Запасающие клетки растений
Гликоген	D-глюкопираноза		α -1,4	α -1,6	Печень, мышцы человека, животных
Хитин	N-ацетилглюкозамин		β -1,4		Наружный скелет насекомых, ракообразных, клеточные стенки мицелл грибов
Гиалуроновая кислота	N-ацетилглюкозамин	Глюкуроновая кислота	β -1,4 β -1,3		Соединительные ткани человека и животных

На конце полисахаридных цепей находится восстанавливающий остаток моносахарида. Поскольку доля конечного 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.

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 (моча, кровь).

В зависимости от условий окисления моносахаридов образуются различные продукты. В щелочной среде альдозы способны восстанавливать катионы металлов (медь, серебро, висмут). 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.

Реакция Троммера

В основе пробе Троммера лежит окислительно-восстановительный процесс: в щелочной среде при нагревании альдегидная группа сахара окисляется, а гидрат окиси меди (голубого или синего цвета) восстанавливается в гидрат закиси меди (осадок желтого цвета) или в закись меди (кирпично-красный осадок), (рисунок 29). Углевод при этом дает различные продукты окисления, так как при окислении в щелочной среде моносахариды претерпевают глубокие изменения с расщеплением углеродной цепи. Углеводы, не имеющие свободной альдегидной группы пробу Троммера не дают.

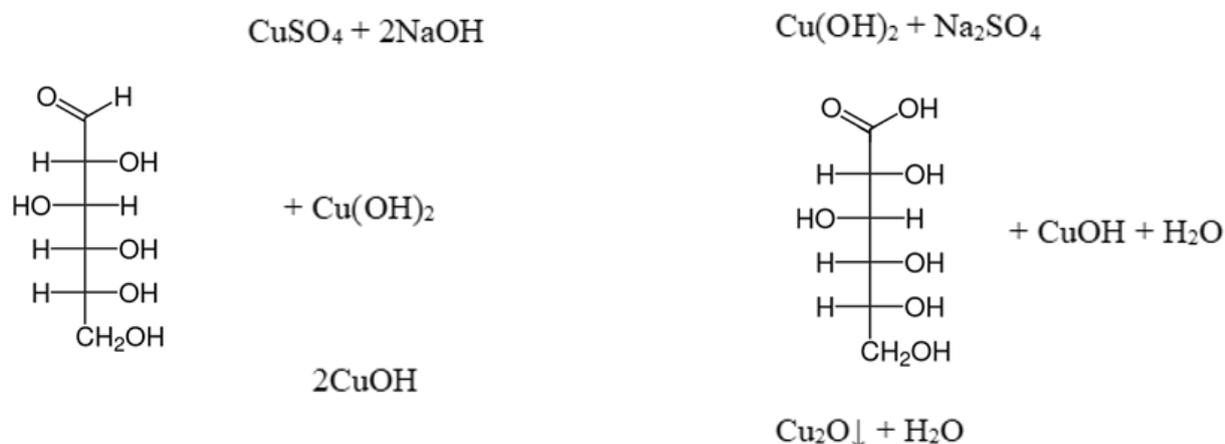


Рис. 29. Схема реакции глюкозы сульфатом меди в щелочной среде

Реактивы

1. Глюкоза, 5% раствор
2. Гидроксид натрия NaOH, 10% раствор

Сульфат меди CuSO₄, 5% раствор

Материалы и оборудование

1. Стеклоанная пробирка
- . Держатель пробирки
 - . Горелка

Техника

К 1 мл 5% раствора глюкозы приливают 1 мл 10% раствора щелочи и 2 капли 5% раствора сульфата меди. Содержимое пробирки окрашивается в голубой цвет. Осторожно нагревают содержимое пробирки до кипения. Наблюдают выпадение желтого осадка гидроксид меди (I) или красного осадка оксида меди (I). Взаимодействие глюкозы с реактивом Фелинга представлена на рисунке 30.

.2 Реакция Фелинга

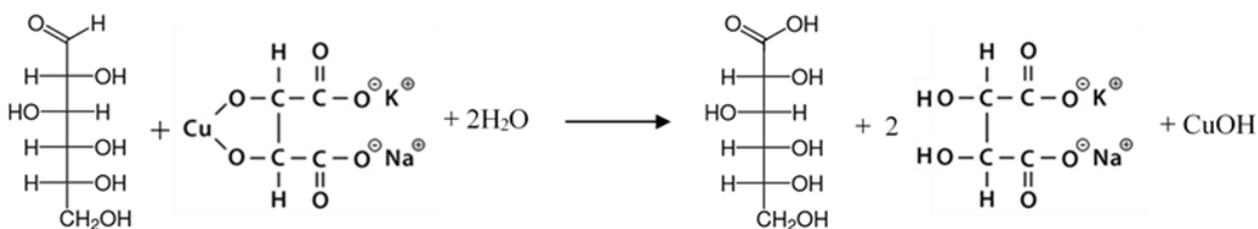


Рис. 30. Взаимодействие глюкозы с реактивом Фелинга

Реактивы

1. Раствор глюкозы, 5 %
2. Реактив Фелинга

Материалы и оборудование

1. Стеклоанная пробирка, 1 шт
2. Кипящая водяная баня, снабженная термометром

Техника

К 1 мл 5% раствора глюкозы приливают равный объем реактива Фелинга и нагревают пробирку до кипения. Наблюдают появление красного осадка.

Реакция серебряного зеркала по Толленсу

Схема реакции глюкозы с нитратом серебра представлена на рисунке 31.

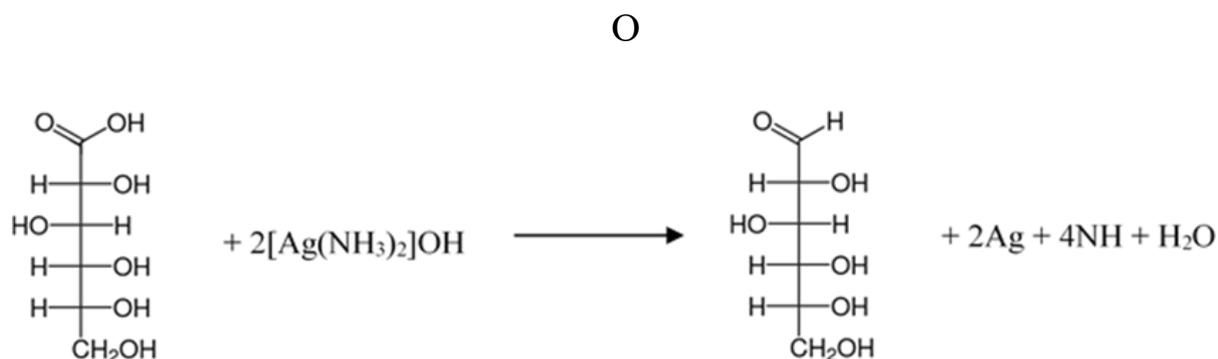


Рис. 31. Схема реакции глюкозы с нитратом серебра

Реактивы

1. Нитрат серебра AgNO_3 , 3% раствор
2. Гидроксид натрия NaOH , 10% раствор
3. Раствор глюкозы, 5 % раствор

Материалы и оборудование

1. Стеклянная пробирка, 1 шт
2. Кипящая водяная баня, снабженная термометром
3. Держатель для пробирки

Техника

В пробирку наливают 1 мл раствора нитрата серебра, 1 мл 10% NaOH . Затем к содержимому пробирки добавляют 2 мл раствора глюкозы, перемешивают и осторожно нагревают на водяной бане. Наблюдается 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 (H_2SO_4 , HCl) происходит дегидратация моносахаридов (отщепление трех молекул воды). Альдопентозы при этом образуют фурфурол (рисунок 32).

Альдо- и кетогексозы при нагревании с H_2SO_4 , HCl дают 5-гидроксиметилфурфурол (рисунок 33).

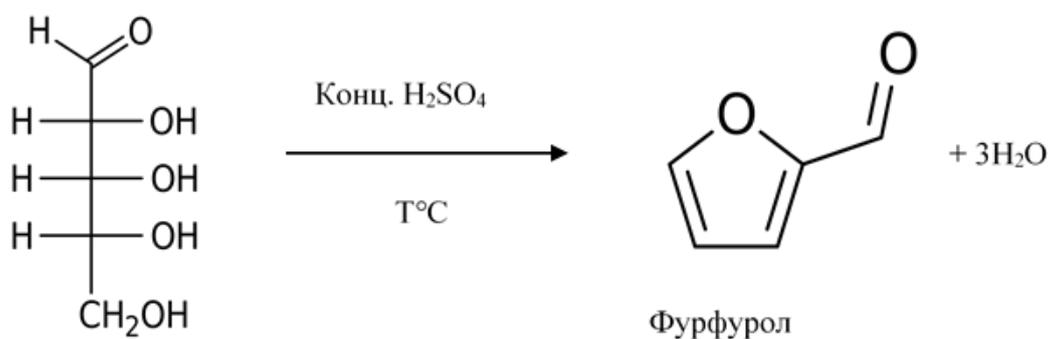


Рис. 32. Схема взаимодействие глюкозы с сильными кислотами

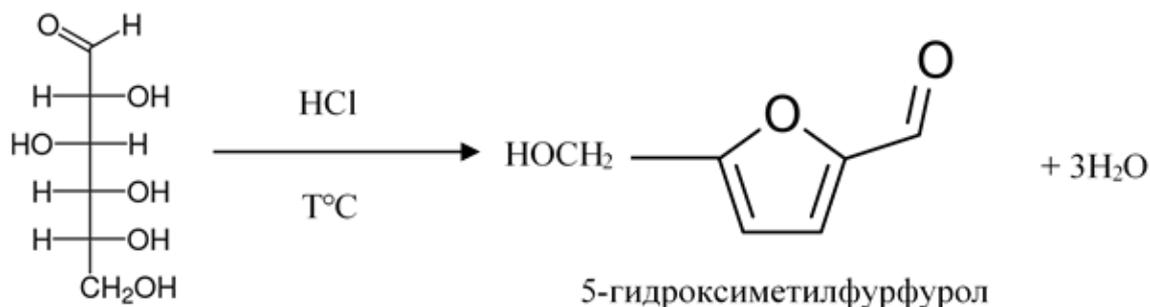


Рис. 33. Схема взаимодействие глюкозы с сильными кислотами

Фурфурол и 5-гидроксиметилфурфурол способны вступать в реакции конденсации с фенолами (α -нафтолом, резорцином, флороглюцином) и ароматическими аминами (анилин, дифениламин) 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.

Реакция Подобедова-Молиша

Реакция с α -нафтолом является чувствительной и широко используется для обнаружения моносахаридов.

Продукты дегидратации пентоз и гексоз (фурфурол и 5-гидроксиметилфурфурол) соединяясь с 2 моль α -нафтола образуют продукты конденсации красного и красно-фиолетового цвета (рисунок 34):

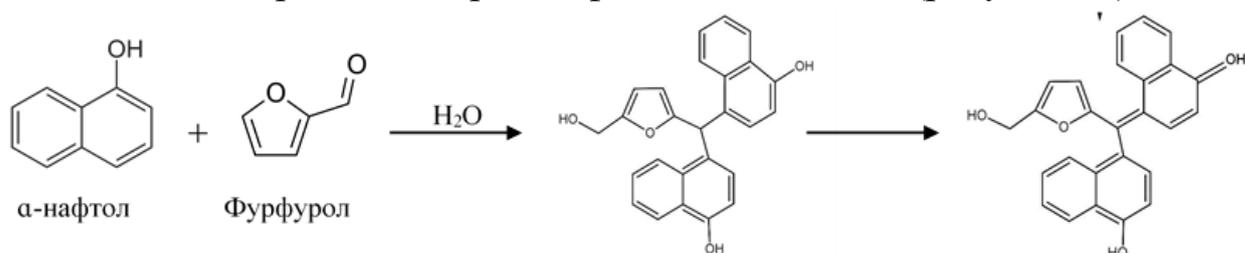


Рис. 34. Схема взаимодействия α -нафтолом с фурфуролом

Реактивы

1. Глюкоза, 1% раствор
2. Рибоза, 0,1% раствор
3. Спиртовой раствор α -нафтола, 1% раствор
4. Концентрированная серная кислота
5. Фруктоза, 1% раствор

Материалы и оборудование

Стеклянные пробирки, 2 шт

2. Держатель для пробирок, 2 шт

Техника

Берут две пробирки, в одну приливают 2 мл 0,1% раствора рибозы, в другую - 2 мл 1% раствора глюкозы и в обе пробирки добавляют по мл 1% раствора α -нафтола и осторожно по стенке пробирки приливают 1 мл концентрированной серной кислоты, которая опускается на дно пробирок. На дне или на границе раздела жидкостей образуются красно-фиолетовые кольца.

5.2.2 Реакция Селиванова

Продукт конденсации кетоз оксиметилфурфурол дает с резорцином соединение, окрашенное в вишнево-красный цвет (рисунок 35):

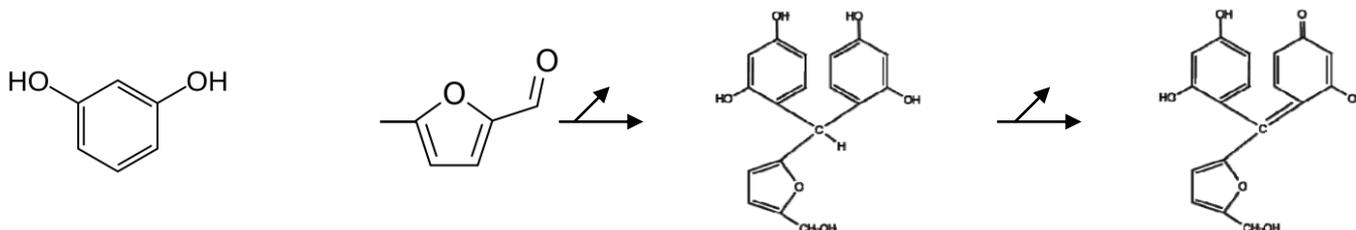


Рис. 35. Схема реакции оксиметеллфурфуrolа с резорцином

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

Реактивы

1. Глюкоза, 1% раствор
2. Фруктоза, 1% раствор
3. Реактив Селиванова

Материалы и оборудование

1. Стеклянные пробирки, 2 шт

2. Держатель для пробирок, 2 шт

3. Кипящая водяная баня, снабженная термометром

Техника

В две пробирки наливают по 2 мл реактива Селиванова, затем в одну прибавляют 2 капли 1% раствора фруктозы, в другую 2 капли 1% раствора глюкозы. Обе пробирки помещают в кипящую водяную баню и оставляют на 5 мин. За это время в пробирке с фруктозой появляется вишнево-красное окрашивание.

Гидролиз сахарозы и открытие продуктов гидролиза

В молекуле сахарозы связь между остатками глюкозы и фруктозы образуется за счет двух гликозидных гидроксильных групп. Сахароза обладает восстановительными свойствами. После гидролиза сахарозы образуются моносахариды (рисунки 36), которые можно обнаружить, например, реакцией Троммера - глюкозу, а реакцией Селиванова - фруктозу.

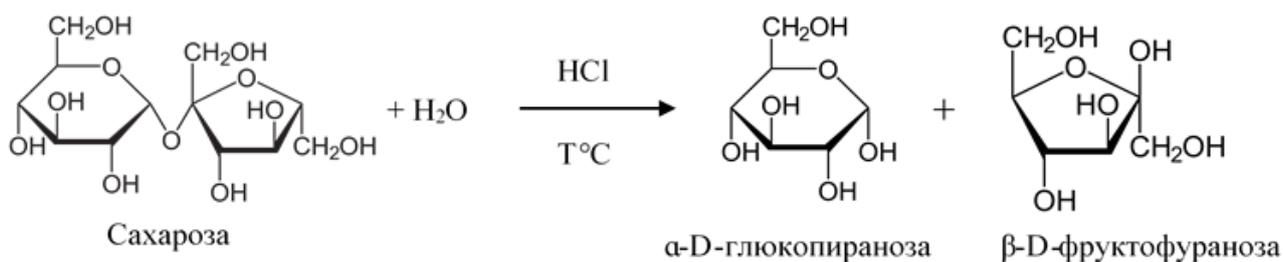


Рис. 36. Схема расщепления сахарозы

Реактивы

1. Сахароза, 5% раствор

2. Фруктоза, 1% раствор

Концентрированной соляная кислота

4. Сухой бикарбонат натрия (или 40% NaOH)

5. Гидроксид натрия NaOH, 10% раствор

Сульфат меди CuSO₄, 5% раствор

. Реактив Селиванова

Материалы и оборудование

1. Стелянные пробирки, 2 шт

2. Стеклопалочки, 2 шт

Держатель для пробирок, 2 шт

3. Кипящая водяная баня, снабженная термометром

Техника

В две пробирки наливают по 4 мл 5% раствора сахарозы, в одну из них добавляют 10 капель концентрированной соляной кислоты, вторая пробирка контрольная. Обе пробирки выдерживают на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После охлаждения гидролизат нейтрализуют сухим бикарбонатом натрия (или 40% NaOH), добавляя его небольшими порциями до тех пор, пока не прекратится выделение углекислого газа. Затем с опытным и контрольным растворами проводят реакцию Троммера и Селиванова. Отмечают изменение окраски в гидролизах 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 гидроксил на конце цепи, и поскольку доля его относительно всей макромолекул весьма невелика, то полисахариды не проявляют восстановительных свойств.

Гидролиз целлюлозы и обнаружение продуктов гидролиза

Целлюлоза не расщепляется ферментами желудочно-кишечного тракта человека. Гидролиз целлюлозы минеральными кислотами происходит значительно медленнее, чем крахмала и требует предварительной обработки целлюлозы 80% раствором серной кислоты (рисунок 37):

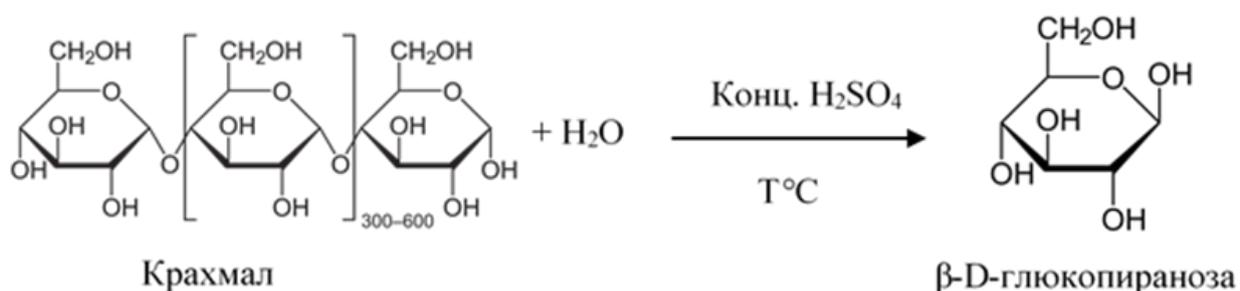


Рис. 37. Схема расщепления крахмала

Реактивы

Небольшое количество ваты (100-200 мг) помещают в 2 большие пробирки

2. Раствор серной кислоты, 3%
3. Раствор серной кислоты, 80%

5. Раствор Фелинга

Материалы и оборудование

1. Большие стеклянные пробирки, 2 шт
2. Стелянные химические пробирки, 2 шт
3. Стеклянные палочки, 2 шт
4. Кипящая водяная баня, снабженная термометром

Техника

Небольшое количество ваты (100-200 мг) помещают в пробирку, добавляют 15 капель 3% раствора серной кислоты и кипятят 10-15 мин. В другой пробирке такое же количество ваты обрабатывают небольшим количеством (15 капель) 80% серной кислоты и растирают вату стеклянной палочкой круговыми движениями до полного растворения. Затем добавляют 15 капель дистиллированной воды и кипятят 5 минут. После охлаждения содержимое пробирок нейтрализуют 40% NaOH и проводят реакцию Фелинга.

Положительная реакция Фелинга свидетельствует о том, что произошел гидролиз целлюлозы и образовался восстанавливающий продукт β -D-глюкопираноза.

Примечания

Реактив Фелинга: А. 200 г сегнетовой соли и 150 г гидроксид 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.

Реактив Селиванова: 0,05 г резорцина растворяют в 100 мл разбавленной (1:1) соляной кислоты

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
- Руководство к лабораторным занятиям по Биологической Химии / Д.М. Зубаиров, В.Н. Тимербаева, В.С. Давыдов. – Москва : Издательство группа “ГЭОТАР-Медиа” , – 392 с.
3. Наглядная биохимия / Я. Кольман, К. – Г. Рем. – Москва : Издательство лаборатория знаний, 2020. – 509 с.
4. Биохимия с упражнениями и задачами: учебник для вузов / Е.С. Северин, А.И. Глухов, В.А. Голеченко, О.В. Корлякова, С.А. Силаева, Т.А. Титова. – под ред. Чл. – корр. РАН Е.С. Северина. – М.:ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 384 с.
- Теория лабораторных биохимических исследований (основы биохимии) / Л.М. Пустовалова. – Изд. 6-е, перераб. – Ростов н/Д : Феникс, 2014. – 397 с.
- Биохимия: руководство к практическим занятиям: учебное пособие / Под ред. Проф. Н.Н. Чернова. – Москва: ГЭОТАР – Медиа, 2009. – 240 с.
7. Лабораторная оценка показателей метаболизма животных и растительных объектов: методические рекомендации к выполнению лабораторных работ / Е. О. Данченко, А.А. Чиркин, О.М. Балаева-Тихомирова, Т.А. Толкачева. – Витебск: ВГУ имени П.М. Машерова, 2020. – 50 с.