

# **БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ**

## **ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ**

**для студентов специальности  
1-31 01-02 Биология.**

**Направление специальности  
1-31 01 01-02 Биология (научно-  
педагогическая деятельность).**

**Специализация 1-31 01 01-02 05 Биохимия”**

Автор-составитель – доцент кафедры химии « УО ВГУ им. П.М. Машерова», кандидат химических наук **В.П. Быстряков**

Рецензенты:

доцент кафедры химии УО “ВГТУ”, кандидат химических наук,  
доцент Т.Н. Соколова,  
доцент кафедры химии УО “ВГУ им. П.М. Машерова”,  
кандидат химических наук, доцент С.Г. Степин

В лабораторном практикуме содержатся обучающие задачи, задачи для самостоятельного решения, описание лабораторных работ с теоретическим введением и методикой выполнения, задания и вопросы для защиты лабораторных работ. Теоретический материал содержит необходимые структурные, конфигурационные и конформационные формулы соединений, схемы химических превращений, 5 таблиц и 5 рисунков. Практикум предназначен для студентов 4 курса биологического факультета, обучающихся по специализации Биохимия.

# СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
<b>ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ</b>	
1 Введение. Аминокислоты. Химические свойства	10
2 Пептиды	19
3 Белки. Анализ аминокислотного состава	25
4 Белки. Первичная структура	29
5 Белки. Методы разделения белков и аминокислот	34
6 Белки. Последовательная деградация белков по методу Эдмана	39
7 Сложные белки	43
8 Пространственная структура пептидов и белков	46
9 Биологическая роль белков	47
10 Ферменты	47
11 Нуклеозиды	47
12 Нуклеотиды	50
13 Нуклеиновые кислоты. Первичная структура	52
14 Вторичная структура нуклеиновых кислот	53
15 Нуклеопротеиды	56
16 Моносахариды	58
17 Дисахариды	69
18 Олигосахариды	71
19 Полисахариды. Методы изучения строения	72
20 Растительные полисахариды	74
21 Полисахариды животного происхождения	75
22 Гликопротеины и протеогликаны	78
23 Гликозидазы и гликозилтрансферазы. Лектины	81
24 Липиды. Физико-химические свойства	82
25 Методы исследования липидов	83
26 Нейтральные липиды	86
27 Липопротеины крови	91
28 Жирные кислоты	92
29 Фосфолипиды	96
30 Антибиотики. Пенициллины, цефалоспорины и родственные антибиотики	100
31 Антибиотики. Стрептомицин и другие аминогликозидные антибиотики	101
32 Антибиотики-каналообразователи. Грамицидины.	102
33 Витамин А. Каротиноиды	102
34 Витамины В <sub>1</sub> , В <sub>2</sub>	103
35 Витамины В <sub>3</sub> , В <sub>5</sub> , В <sub>6</sub>	104
36 Витамин В <sub>9</sub> . Сульфаниламидные препараты	105
37 Витамин В <sub>12</sub>	109
38 Витамины С, Н	110
39 Витамины Е, К, кофермент Q	112
40 Витамины D. Растительные стеринны	114
41 Желчные кислоты	118
42 Половые гормоны	121

43	Гормоны коры надпочечников	125
44	Применение оптической спектроскопии в биорганической химии	126
45	ИК-спектроскопия и спектроскопия КР в биорганической химии	127
46	Рентгеноструктурный анализ и электронная микроскопия в биорганической химии	127
47	Спектроскопия ЯМР и ЭПР в биорганической химии	127
48	Компьютерное моделирование биомолекул	127

Репозиторий ВГУ

## ВВЕДЕНИЕ

**Характеристика учебной дисциплины “Биоорганическая химия”.**

Биоорганическая химия – учебная дисциплина специализации Биохимия в системе подготовки специалиста специальности Биология. Биоорганическая химия – область химической науки, которая изучает строение, свойства и механизмы функционирования биологически активных органических молекул, в первую очередь, биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов, и выясняет зависимость биологического действия от структуры органического вещества. Для этого используются методы органической и физической химии, а также физики и математики.

**Роль и место учебной дисциплины в системе подготовки специалиста.** Учебная дисциплина «Биоорганическая химия» создает углубленную базу знаний специализации Биохимия. Изучение этой дисциплины продиктовано необходимостью, прежде всего более глубокого понимания студентами данной специализации связи между строением органических веществ и их биологическими функциями. Этому служит изучение современных методов определения строения сложных биополимеров, в том числе методов избирательного расщепления биополимеров, а также методов синтеза биополимеров и более простых биорегуляторов. Этот аспект биоорганической химии имеет не только теоретическое, но и все большее практическое значение. Биоорганическая химия тесно связана с практическими задачами медицины и сельского хозяйства (получение витаминов, гормонов, антибиотиков и других лекарственных средств, стимуляторов роста растений и регуляторов поведения животных и насекомых), химической, пищевой и микробиологической промышленности. Важным для студентов данной специализации является также понимание химизма взаимодействия биологически активных веществ с живой клеткой или ее компонентами. Практическое значение этого состоит в создании оптимально активных соединений определенного типа действия.

Изучение данной дисциплины позволит будущим специалистам – биологам более продуктивно решать задачи, связанные с химическими процессами, происходящими в биологических системах, в том числе живых организмах, а также задачи анализа и синтеза практически важных соединений

**Задачи изучения дисциплины в соответствии с учебным Образовательным стандартом “Высшее образование. Специальность «Биология”:**

- сформировать представление о возможностях биоорганической химии для объяснения свойств и поведения биологически активных

органических молекул, в первую очередь, биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов;

- сформировать представление о требованиях к среде обитания и возможностях сохранения здоровья с точки зрения биоорганической химии;

- сформировать знания о строении, свойствах и механизмах функционирования биологически активных органических молекул, в первую очередь, биополимеров и низкомолекулярных биорегуляторов, в связи с молекулярными механизмами физиологических процессов, принципами регуляции обмена веществ, основными физиологическими процессами растительной клетки, основными чертами метаболизма клеток;

- сформировать знания реакционной способности биологически активных органических веществ и свойств биополимеров, о зависимости биологического действия от структуры органического вещества.

Сформировать умения использовать полученные знания для решения практических задач, в частности, для прогноза последствий антропогенных воздействий на биосферу и планированию мероприятий по ее охране.

#### **Характеристика рекомендуемых методов и технологий обучения.**

В соответствии с учебным планом, в обучении планируется сочетание лекций, лабораторных занятий и самостоятельной работы студентов.

В связи с отсутствием учебных пособий полностью удовлетворяющих содержанию и требованиям учебной дисциплины "Биоорганическая химия", основную часть знаний студенты должны получать на лекциях. Цель лабораторных работ – закрепление знаний теоретических основ предмета, а также привитие студентам навыков экспериментальной работы и умения делать соответствующие выводы.

Формы контроля: тестовый контроль; защита лабораторной работы; зачет (7 семестр); экзамен (8 семестр).

**Общее количество часов в соответствии с тематическим учебным планом – 252, из них 162 часов аудиторных.**

#### **Распределение аудиторного времени по видам занятий**

Лекции	Лабораторные Занятия	СРКП
66	96	32

## Примерный тематический план лекций

1. Введение. Аминокислоты.
2. Пептиды.
3. Белки. Первичная структура белков.
4. Химическая модификация белков.
5. Пространственная структура пептидов и белков (2 лекции).
6. Биологическая роль белков.
7. Нуклеозиды и нуклеотиды.
8. Первичная структура нуклеиновых кислот.
9. Вторичная структура нуклеиновых кислот (2 лекции).
10. Олигосахариды. Полисахариды.
11. Гликопротеины и протеогликаны.
12. Гликозидазы и гликозилтрансферазы.
13. Лектины клеток животных.
14. Липиды. Строение и классификация липидов. Методы исследования липидов. Нейтральные липиды.
15. Фосфолипиды Гликолипиды. Липиды – клеточные биорегуляторы.
16. Оксипирины.
17. Методы синтеза липидов.
18. Биологические мембраны. Мембранные белки.
19. Особенности мембран различных клеток. Рецепция.
20. Искусственные мембранные системы. Липосомы.
21. Антибиотики (2 лекции).
22. Витамины (2 лекции).
23. Стероиды (2 лекции).
24. Феромоны и гормоны насекомых. Регуляторы развития растений, фунгициды. Инсектициды. Токсины.
25. Физико-химические методы исследования биологически активных соединений. Оптическая спектроскопия.
26. Рентгеноструктурный анализ биополимеров. Электронная микроскопия.
27. Спектроскопия ЭПР и ЯМР.
28. Компьютерное моделирование биомолекул.

## ЛИТЕРАТУРА

### Основная

1. Бендер М., Бергсон Р., Комияма М. Биоорганическая химия ферментативного катализа. М.: Мир, 1987. (Электронный вариант кафедры)
2. Бергельсон Л.Д. Мембраны, молекулы, клетки. М., 1982.
3. Зенгер В.. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М.: Мир, 1987.
4. Кнорре Д.Г., Мызина С.Д.. Биологическая химия: Учеб. для студентов хим., биол. и мед. спец. вузов. 3-е изд., испр. – М.: Высшая школа, 2002.
5. Ленинджер А.. Основы биохимии. Т. 1-3. М.: Мир, 1985.
6. Мецлер Д. Биохимия. Т. 1-3. М.: Мир, 1980.
7. Овчинников Ю.А.. Биоорганическая химия. М.: Просвещение, 1987. (Электронный вариант кафедры).
8. Общая органическая химия. Т.10. Нуклеиновые кислоты, аминокислоты, пептиды, белки. Т. 11. Липиды, углеводы. Ред. Е. Хаслам. М.: Химия, 1986.
9. Племенков В.В. Введение в химию природных соединений. Казань: 2001. (Электронный вариант кафедры).
10. Сорочинская Е.И. Биоорганическая химия СПб, 1998. (Электронный вариант).
11. Страйер Л. Биохимия. Т. 1-3. М.: Мир, 1985.
12. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю. И.. Биоорганическая химия. М.: Дрофа, 2006.
13. Химия биологически активных природных соединений./ Ред. Н.А. Преображенский, Р.П. Евстигнеева. М.: Химия, 1976.
14. Фрайфелдер Д.. Физическая биохимия: применение физико-химических методов в биохимии и молекулярной биологии. М.: Мир, 1980.
15. Якубке Х.-Д., Ешкайт Х.. Аминокислоты, пептиды, белки. М.: Мир, 1985.

### Дополнительная

1. Быстряков В.П. Экологические основы бионеорганической и биоорганической химии: УМК для студентов специальности 1-33 01 01 Биоэкология/В.П. Быстряков и др. Витебск: ВГУ им. П.М. Машерова, 2008.
2. Дьюга Г., Пенни К. Биоорганическая химия. Химические подходы к механизму действия ферментов. М.: Мир, 1983. (Электронный вариант кафедры).

3. Желдакова Р.А. Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов: УМК: Минск: БГУ, 2005.
4. Методы исследования углеводов/Под ред. А.Я. Хорлина. М.: Мир, 1975.
5. Овчинников Ю.А. Химия жизни. Избранные труды. М. 1990.
6. Перспективы биоорганической химии и молекулярной биологии. М., 1986.
7. Сенчук В.В. Биохимия. Ч. 1. Биомолекулы. Минск: БГУ, 2005.
8. Справочник биохимика./Досон Р. и др.М.: Мир, 1991.
9. Чиркин А.А., Данченко Е.О. Биохимия с основами молекулярной биологии: УМК: Витебск: ВГУ им П.М. Машерова, 2006.
10. Чиркин А.А., Пышненко О.В. Основы биоэнергетики и катализа. Витебск: УМК: ВГУ им. П.М. Машерова, 2009.
11. Vitamin E. Biochemistry and health implications. N. Y., 1989.

Ресурсы Интернет (библиотека сайта [www.molbiol.ru](http://www.molbiol.ru))

#### *Примечания*

- 1) текст выделенный полужирным шрифтом, в том числе курсивом, носит характер ключевых терминов – обязателен для запоминания;*
- 2) текст, напечатанный мелким шрифтом, а также термины, напечатанные курсивом обычной жирности, носят справочный характер и не обязательны для запоминания.*

## Лабораторное занятие 1

### Тема. Введение. Аминокислоты. Химические свойства.

**Цель:** углубить знания строения и химических свойств важнейших  $\alpha$ -аминокислот для дальнейшего изучения тем «Пептиды», «Белки».

*Исходный уровень.*

*Из курса органической химии:* Кислотность и основность органических соединений. Водородная связь. Реакции нуклеофильного замещения в карбоксильной группе. Получение амидов кислот и их гидролиз. Химические свойства аминогруппы. Основность и нуклеофильность аминогруппы. Окисление тиолов и восстановление дисульфидов.

*Из курса биохимии:* Аминокислоты – структурные мономеры белков. Строение и классификация аминокислот, стереоизомерия, физико-химические свойства, методы разделения и обнаружения аминокислот, протеиногенные и непротеиногенные, заменимые и незаменимые аминокислоты.

#### План занятия

1. Инструктаж по технике безопасности.
2. Решение ситуационных задач.
3. Лабораторная работа.

#### Обучающая задача 1

При гниении белков под действием микроорганизмов (в тканях трупа, в толстом кишечнике живых организмов) обнаруживаются диамины — кадаверин и путресцин. Из каких  $\alpha$ -аминокислот и в результате какой реакции получают эти диамины?

#### Решение

**Общий подход.** Одним из способов получения первичных аминов служит реакция декарбоксилирования аминокислот.  $\alpha$ -Аминокислоты в организме декарбоксилируются под действием ферментов декарбоксилаз с участием кофермента пиридоксальфосфата, а в лабораторных условиях — при нагревании в щелочной среде. Образующиеся в организме амины носят название биогенных.

Отщепление термодинамически стабильной молекулы диоксида углерода от молекулы карбоновой кислоты в щелочной среде протекает через образование промежуточного карбаниона.



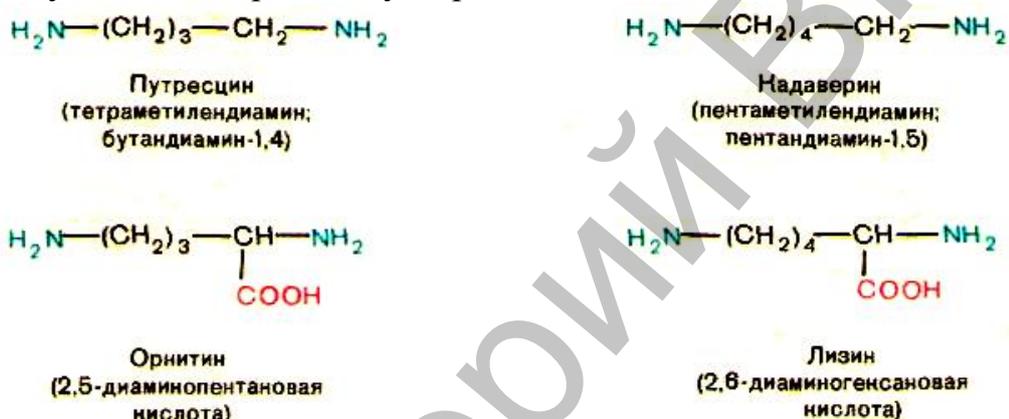
Карбоновая кислота



Углеводород

Декарбоксилирование карбоновых кислот *in vitro* происходит в довольно жестких условиях: при прокаливании солей, а также при кипячении их щелочных растворов. Наличие в алифатическом радикале кислоты заместителей, например, амино-, оксо- или гидроксигрупп, обладающих — I-эффектом, способствует стабилизации карбаниона. Поэтому  $\alpha$ -амино-,  $\alpha$ -оксо-,  $\alpha$ -гидроксикислоты декарбоксилируются легче, чем соответствующие незамещенные карбоновые кислоты.

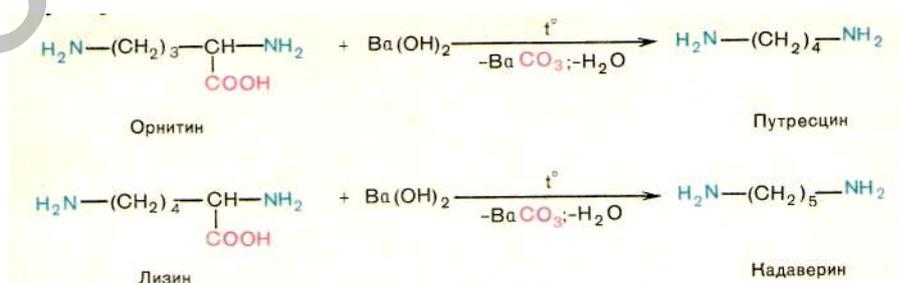
**Этап 1.** Биогенные амины — путресцин и кадаверин — содержат в молекуле по две аминогруппы и, следовательно, получают при декарбоксилировании диаминомонокислот, имеющих соответствующие по строению углеродные цепи.



Образовавшиеся в организме свободные  $\alpha$ -аминокислоты — лизин и орнитин — декарбоксилируются либо ферментами декарбоксилазами с участием кофермента пиридоксальфосфата, либо бактериями кишечника.

Орнитин не входит в состав белков. В организме эта  $\alpha$ -аминокислота является промежуточным соединением в синтезе аргинина. Большинство микроорганизмов синтезирует орнитин из глутаминовой кислоты, имеющей в цепи 5 углеродных атомов.

В лабораторных условиях путресцин и кадаверин получают при кипячении щелочных растворов орнитина и лизина соответственно. Протекающую реакцию благоприятствует использование гидроксидов бария или кальция, связывающих диоксид углерода.



**Заключение.** Путресцин (бутандиамин-1,4) получается путем декарбоксилирования  $\alpha$ -аминокислоты орнитина, кадаверин (пентандиамин-1,5) — лизина. Декарбоксилирование  $\alpha$ -аминокислот *in vitro* происходит при кипячении их водных растворов с основаниями, лучше всего с гидроксидами бария  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  и кальция  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , поглощающими диоксид углерода; в организме эта реакция осуществляется с помощью ферментов (декарбоксилазы).

### Задачи для самостоятельного решения

- 1.1. Из какой  $\alpha$ -аминокислоты путем декарбоксилирования получается биогенный амин гистамин?
- 1.2. Какой биогенный амин получается при декарбоксилировании треонина?
- 1.3. Декарбоксилированием какой аминокислоты получается  $\gamma$ -аминомасляная кислота? Можно ли отнести  $\gamma$ -аминомасляную кислоту к группе биогенных аминов?
- 1.4. В каких условиях проводится декарбоксилирование  $\alpha$ -аминокислоты триптофана *in vitro*? Какое соединение получится в результате реакции?
- 1.5. Конечным продуктом декарбоксилирования аспарагиновой кислоты (моноаминодикарбоновая кислота) является этиламин. Какая из двух карбоксильных групп будет отщепляться первой? Назовите продукт, получающийся при декарбоксилировании одной карбоксигруппы аспарагиновой кислоты.

### Обучающая задача 2

Заболевание фенилкетонурия связано с нарушением синтеза тирозина из фенилаланина и накоплением в организме токсичных продуктов дезаминирования фенилаланина. Какие соединения получают в результате окислительного и неокислительного дезаминирования фенилаланина?

#### Решение

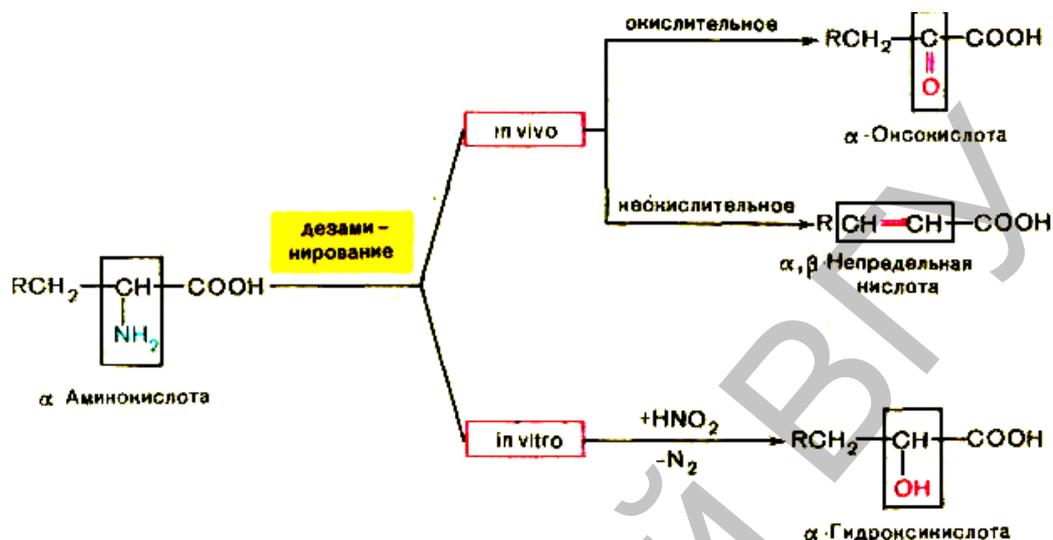
**Общий подход.**  $\alpha$ - Аминокислота фенилаланин в организме под действием фермента (фенилаланингидроксилаза) гидроксилируется в  $\alpha$ -аминокислоту тирозин.



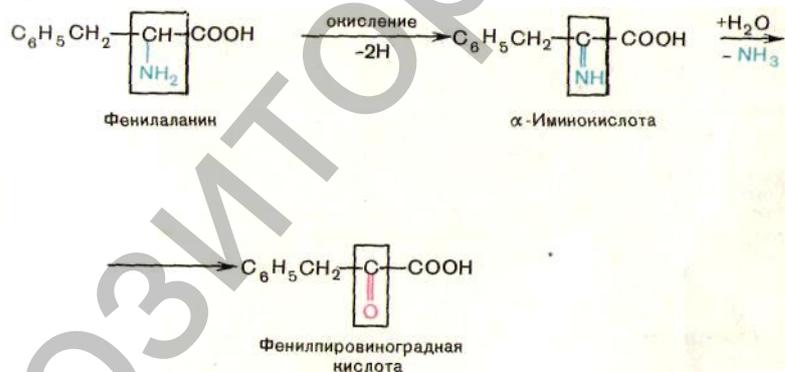
В отсутствие этого фермента или при его недостаточной активности в организме накапливается фенилаланин. При его дезаминировании (удаление азотсодержащей функциональной группы) получается оксокислота — фенилпировиноградная кислота, которая и вызывает токсический эффект.

Дезаминирование не затрагивает углеродного скелета  $\alpha$ -аминокислоты, поэтому у продуктов дезаминирования сохраняется способность включаться в другие обменные процессы. Кроме того,

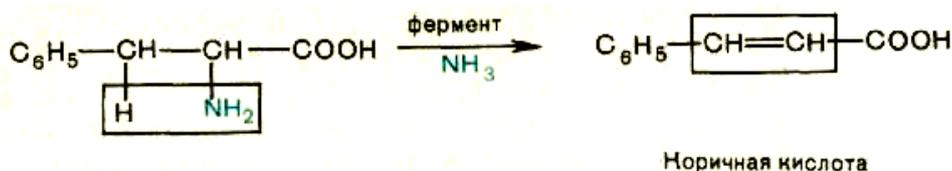
через реакцию дезаминирования осуществляется генетическая связь  $\alpha$ -аминокислот с другими типами органических кислот.



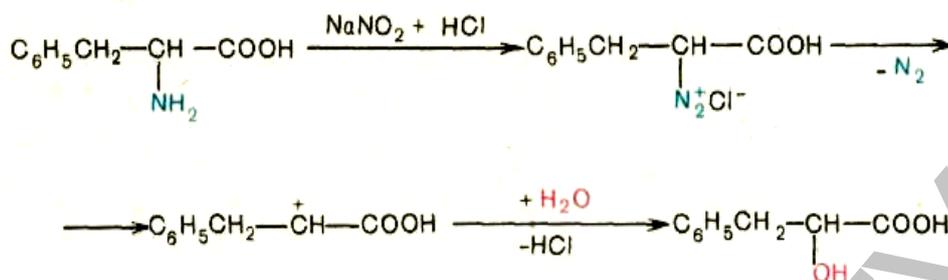
**Этап 1.** Окислительное дезаминирование  $\alpha$ -аминокислот в организме протекает под действием ферментов (оксидазы) с участием коферментов НАД<sup>+</sup>, НАДФ<sup>+</sup>. На первой стадии реакции фенилаланин окисляется (дегидрируется) с образованием соответствующей  $\alpha$ -иминокислоты.



При неокислительном дезаминировании происходит удаление  $\text{NH}_2$ -группы в виде термодинамически устойчивой молекулы аммиака с образованием двойной связи. Аналогичная реакция *in vitro* протекает при нагревании только для  $\beta$ -аминокислот.



Удаление  $\text{NH}_2$ -группы и замена ее на гидроксильную происходит *in vitro* под действием азотистой кислоты. Фенилаланин в результате этой реакции превращается в гидроксикислоту.



**Заключение.** В результате окислительного дезаминирования фенилаланина образуется фенилпировиноградная кислота, неокислительного дезаминирования — коричная кислота. При дезаминировании *in vitro* под действием азотистой кислоты образуется 2-гидрокси-3-фенилпропановая кислота.

### Задачи для самостоятельного решения

2.1. Потовые выделения больных шизофренией содержат специфическую по запаху 3-метилгексанон-2-овую кислоту. Дезаминированием какой аминокислоты можно получить данное соединение? Будет ли этот процесс окислительным?

2.2. Какие продукты получаются при окислительном и неокислительном дезаминировании триптофана?

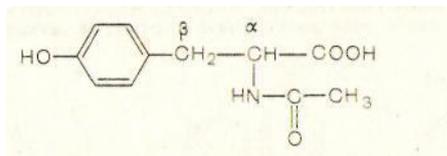
2.3. Какое соединение получится при действии азотистой кислоты на фенилаланин?

2.4. При действии азотистой кислотой на равные объемы растворов лизина и лейцина одинаковой концентрации из одной пробирки выделился вдвое больший объем азота, чем из другой. В какой пробирке находился раствор лизина?

2.5. В результате окислительного дезаминирования аминокислоты получена пировиноградная кислота. Какая аминокислота была подвергнута дезаминированию?

### Обучающая задача 3

Укажите кислотные центры и расположите их в порядке уменьшения кислотности в молекуле защищенной  $\alpha$ -аминокислоты — N-ацетилтирозине:

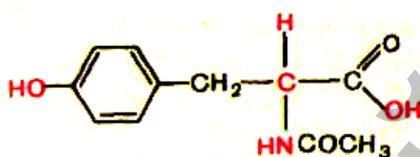


### Решение

**Общий подход.** Согласно теории Бренстеда, описывающей кислоты как доноры протонов, органические соединения, содержащие C—H, N—H, O—H, S—H и другие X—H связи, можно рассматривать как кислоты, способность которых к диссоциации меняется в широких пределах. Качественную оценку кислотности соединений или отдельных кислотных центров в молекуле проводят путем сравнения

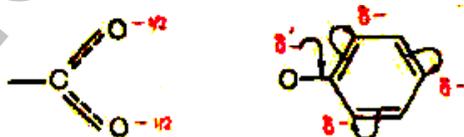
относительной стабильности (устойчивости) соответствующих анионов. В свою очередь стабильность анионов непосредственно связана с кислотностью: чем стабильнее анион, тем сильнее сопряженная ему кислота.

В молекуле N-ацетилтирозина два OH-, один NH- и несколько CH-кислотных центров. Из возможных CH-кислотных центров ( $\alpha$ -CH-,  $\beta$ -CH-,  $C_{\text{аром}}\text{—H-}$ ), обладающих очень низкой кислотностью, примем во внимание только наиболее сильный  $\alpha$ -CH-кислотный центр, находящийся между двумя электроноакцепторными группами (ацетиламинной—NH—CO—CH<sub>3</sub> и карбоксильной—COOH). Для решения задачи нужно сравнить относительную кислотность NH-,  $\alpha$ -CH- и двух OH-кислотных центров.



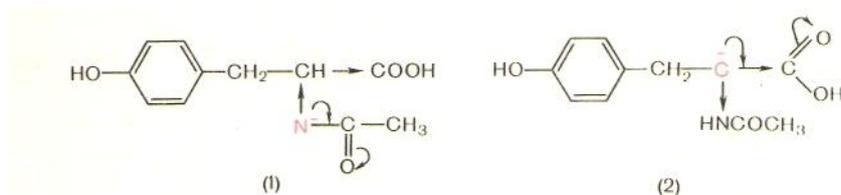
**Этап 1.** В четырех рассматриваемых кислотных центрах с протоном связаны атомы элементов только одного II периода (C, N, O). Исходя из их электроотрицательности можно сделать вывод о том, что OH-кислотные центры среди них будут наиболее сильными.

Кислотность обоих OH-центров определяется влиянием непосредственно связанных с ними фрагментов молекулы: карбонильной группы и бензольного кольца. Для качественной оценки кислотности этих центров сравним стабильность соответствующих им анионов: карбоксилат-иона—COO<sup>-</sup> и феноксид-иона C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sup>-</sup>. В карбоксилат-ионе отрицательный заряд в результате *p,π*-сопряжения равномерно распределен между двумя атомами кислорода, что обуславливает высокую стабильность этого аниона; в феноксид-ионе отрицательный заряд менее делокализован, так как в делокализации принимают участие менее электроотрицательные атомы углерода бензольного кольца.



Кроме того, CH<sub>3</sub>CONH-группа, стабилизирующая карбоксилат-ион за счет отрицательного индуктивного эффекта, дополнительно увеличивает кислотные свойства COOH-группы в N-ацетилтирозине. Таким образом, из двух OH-кислотных центров карбоксильный гидроксил является более кислым, чем фенольный.

**Этап 2.** Для качественной оценки силы  $\alpha$ -CH- и NH- кислотных центров сравним стабильность соответствующих анионов.



Степень делокализации отрицательного заряда анионах за счет  $p, \pi$ -сопряжения приблизительно одинакова.

Различие в стабильности анионов 1 и 2 обусловлено главным образом большей электроотрицательностью атома азота в сравнении с атомом углерода. Анион 1 более стабилен, чем карбанион 2, и, следовательно, NH-кислотный центр в N-ацетилтирозине будет несколько сильнее, чем CH-кислотный центр.

**Заключение.** Кислотные центры (два OH-,  $\alpha$ -CH- и NH) молекулы N-ацетилтирозина по уменьшению кислотности располагаются в следующем порядке: карбоксильный гидроксил > фенольный гидроксил > NH- >  $\alpha$ -CH-. При физиологических значениях pH среды (7,2—7,4) в молекуле N-ацетил-тирозина будет диссоциирована только карбоксильная группа.

#### Обучающая задача 4

При отравлении хлоридом ртути(II) (сулема) в качестве противоядия при первой помощи используют яичный белок. Какое химическое взаимодействие лежит в основе обезвреживания сулемы?

#### Решение

**Общий подход.** Токсическое действие солей тяжелых металлов (ртуть, серебро, медь, свинец, стронций и др.) основано на образовании нерастворимых солей с белками, что является причиной денатурации белков. Соли с металлами образуют карбоксильные группы кислых  $\alpha$ -аминокислотных остатков. Кислые (моноаминодикарбоновые) — аспарагиновая и глутаминовая — кислоты в образовании пептидных связей участвуют только одной карбоксигруппой. Вторая, «дополнительная», карбоксигруппа вступает в реакции, характерные для этой функциональной группы (образование солей, сложных эфиров, амидов и др.).

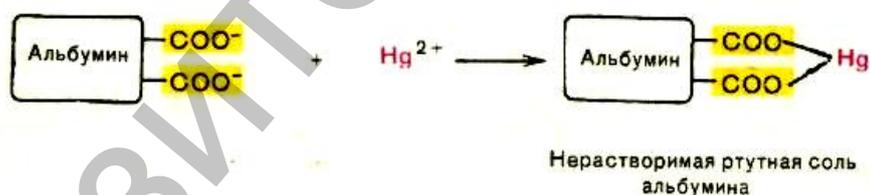


Если молекула белка содержит «дополнительных» карбоксильных групп больше, чем аминогрупп, то белок будет кислым. Изоэлектрическая точка кислых белков лежит в области значений рН среды ниже 7,0 (см. табл. 1).

Таблица 1 **Изоэлектрические точки некоторых белков**

Белки	Изоэлектрическая точка (pI)
<b>Кислые:</b>	
альбумин яйца	4,84-4,90
глобулин сыворотки	5,4-5,5
казеин	4,6
<b>Нейтральные:</b>	
гемоглобин крови	6,79
<b>Основные:</b>	
папаин	9,0
клупеин	12,4

**Этап 1.** Согласно табл.1, яичный альбумин является кислым белком с pI 4,7 — 4.8. т.е. в его состав входят кислые α-аминокислоты. Взаимодействие альбумина с сулемой схематично можно представить следующим образом.



Образование нерастворимой соли вызывает изменение вторичной структуры белковой молекулы яичного альбумина, что приводит к необратимой денатурации белка.

Обезвреживание сулемы яичным альбумином заключается в том, что сулема расходуется на образование соли с внесенным извне яичным альбумином—белком, обладающим кислым характером, и не вызывает денатурации белков самого организма. Полученные нерастворимые соли не опасны для организма и выводятся из него в неизменном виде.

**Заключение.** В основе обезвреживания сулемы лежит способность яичного альбумина образовывать с тяжелыми металлами нерастворимые соли. Яичный альбумин, образуя соли с ртутью, "предохраняет" от денатурации белки самого организма.

### **Задачи для самостоятельного решения**

- 4.1. Какой из белков — пепсин (рI 2.75) или казеин (рI 4,6) — эффективнее во взаимодействии с солями стронция?
- 4.2. В практике были известны случаи отравления отработанным фиксажем для фотографии, в котором имеются соли серебра. Какой из белков крови — глобулин (рI 5,4) или гемоглобин (рI 6.8) — денатурируется в первую очередь при отравлении солями серебра? Напишите в общем виде схему взаимодействия солей серебра с наиболее активным белком.

### **Лабораторная работа**

#### **Опыт 1. РЕАКЦИЯ ГЛИЦИНА С ФОРМАЛЬДЕГИДОМ**

В пробирку поместите 5 капель 1% раствора глицина (57) и добавьте 1 каплю индикатора метилового красного (16). Раствор окрашивается в желтый цвет (нейтральная среда). К полученной смеси добавьте равный объем формалина. Отметьте появление красной окраски (кислая среда). Данная реакция под названием «*формольное титрование*» используется для количественного определения карбоксильных групп в  $\alpha$ -аминокислотах.

#### **Задания и вопросы для защиты лабораторной работы**

1. Напишите уравнение реакции взаимодействия глицина с формальдегидом.
2. Каковы причины изменения окраски индикатора?
3. Какое практическое применение имеет реакция  $\alpha$ -аминокислот с формальдегидом?

#### **Опыт 2. ОБРАЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОЙ СОЛИ МЕДИ ГЛИЦИНА**

В пробирку поместите 1 мл 1% раствора глицина (57). Добавьте на кончике лопаточки сухой карбонат меди(II) (30) и смесь нагрейте. Раствор окрашивается в синий цвет.

#### **Задания и вопросы для защиты лабораторной работы**

1. Напишите схему взаимодействия глицина с карбонатом меди(II).
2. Какой цвет характерен для растворов комплексных солей меди?

#### **Опыт 3. АМФОТЕРНЫЕ СВОЙСТВА $\alpha$ -АЛАНИНА**

1. В пробирку поместите 5 капель 1% раствора  $\alpha$ -аланина (58) и добавьте по каплям 0,1% раствор хлороводородной кислоты, подкрашенный индикатором конго в синий цвет, до появления розово-красной окраски.

2. В пробирку поместите 5 капель 1% раствора  $\alpha$ -аланина (58) и по каплям добавьте 0,1% раствор гидроксида натрия, подкрашенный фенолфталеином, до исчезновения окраски.

## Задания и вопросы для защиты лабораторной работы

1. Напишите уравнение реакции взаимодействия  $\alpha$ -аланина с гидроксидом натрия. Почему изменяется окраска индикатора в ходе реакции?
2. Напишите уравнение реакции взаимодействия  $\alpha$ -аланина с хлороводородной кислотой. Почему изменяется окраска индикатора в ходе реакции?
3. Почему  $\alpha$ -аминокислоты способны взаимодействовать с кислотами и щелочами?

## Лабораторное занятие 2

### Тема. Пептиды.

**Цель:** Сформировать знания строения и методов химического синтеза пептидов.  
*Исходный уровень. Тема 1.*

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

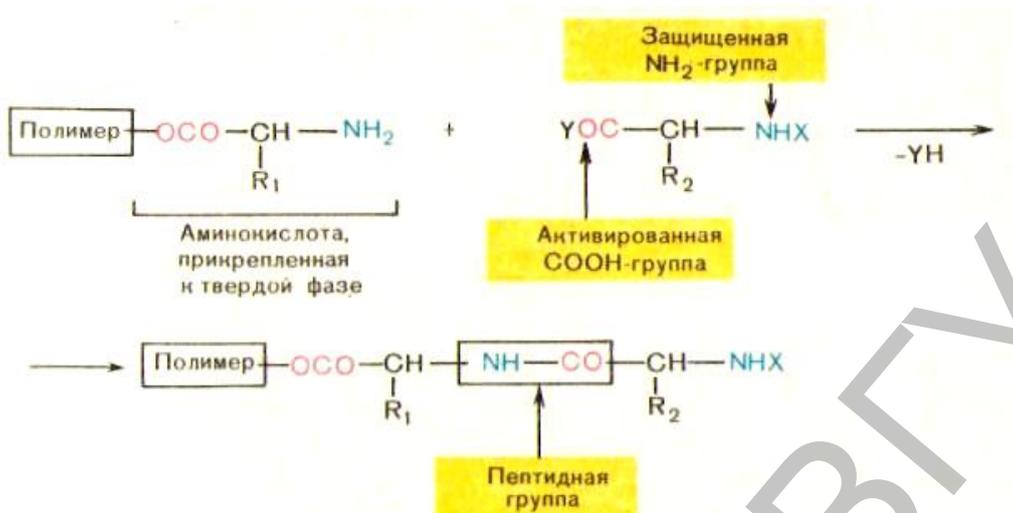
### Обучающая задача 1

В биосинтезе белка карбоксильная группа  $\alpha$ -аминокислоты активируется путем получения смешанного ангидрида с коферментом АТФ. Какой способ активации карбоксильной группы применяется в твердофазном синтезе пептидов?

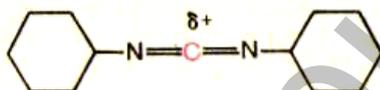
#### **Решение**

**Общий подход.** Образование пептидной связи между карбоксигруппой одной  $\alpha$ -аминокислоты и аминогруппой другой  $\alpha$ -аминокислоты протекает по механизму нуклеофильного замещения. Электрофильность субстрата (карбоксигруппы) не высока вследствие  $p, \pi$ -сопряжения гидроксигруппы с карбонильной группой. Поэтому в реакциях, протекающих по механизму нуклеофильного замещения у тригонального атома углерода карбоксильной группы, необходимо использовать катализатор или активировать карбоксильную группу переводом ее в ангидрид или хлорангидрид.

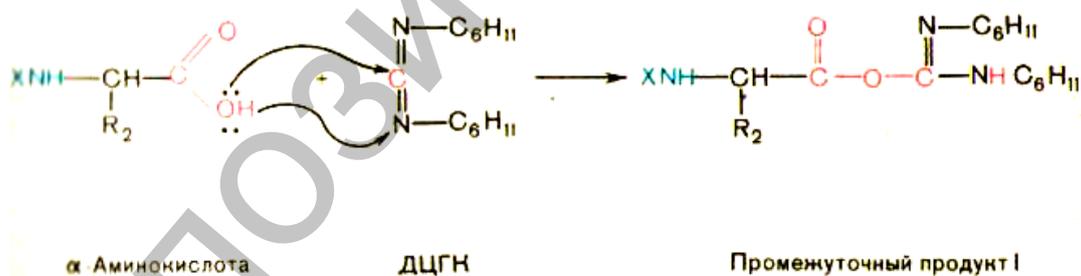
В твердофазном синтезе пептидов  $\alpha$ -аминокислота, химически связанная с поверхностью твердого носителя (полимер) и имеющая свободную  $\text{NH}_2$ -группу, взаимодействует с другой молекулой  $\alpha$ -аминокислоты с *защищенной* аминогруппой и *активированной* карбоксильной группой.



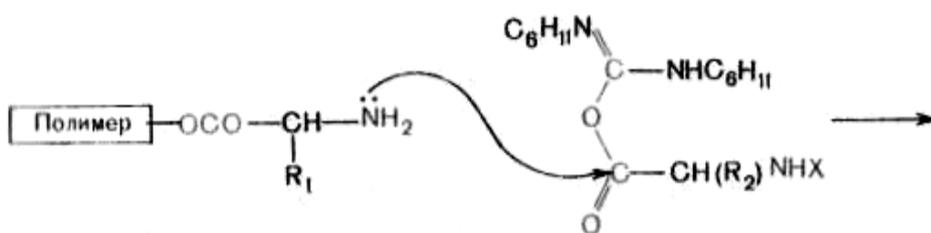
**Этап 1.** Активация карбоксильной группы осуществляется путем взаимодействия с *дициклогексилкарбодиимидом* (ДЦГК) — соединением, содержащим *кумулятивные* двойные связи между атомом углерода и атомами азота.

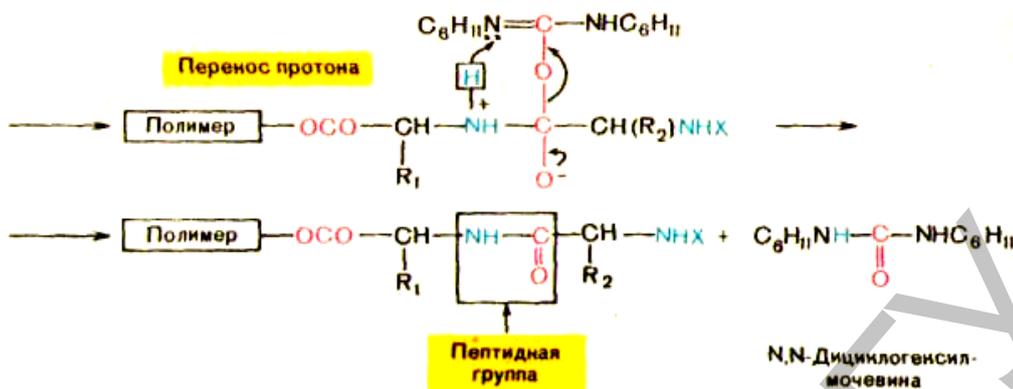


Кумулированные двойные связи обладают повышенной реакционной способностью. При взаимодействии с кислотами ДЦГК образует промежуточные соединения, которые по химическому строению и реакционной способности подобны ангидридам.



Реакционноспособный ангидрид вступает во взаимодействие с аминогруппой  $\alpha$ -аминокислоты, фиксированной на полимере.





**Заключение.** В твердофазном синтезе пептидов карбоксильная группа  $\alpha$ -аминокислот активируется путем взаимодействия с дициклогексилкарбодиимидом, что приводит к образованию высокореакционного ангидридоподобного промежуточного продукта, который и вступает в дальнейшее взаимодействие с  $\alpha$ -аминокислотой, фиксированной на твердой фазе.

### Задачи для самостоятельного решения

1. Напишите схему реакции взаимодействия дициклогексилкарбодиимида с изолейцином.
2. Синтезируйте твердофазным способом дипептид Тир-Гис.
3. Используя классический метод защиты аминогруппы и активации карбоксигруппы, синтезируйте дипептид Асп-Фен.

### Обучающая задача 2

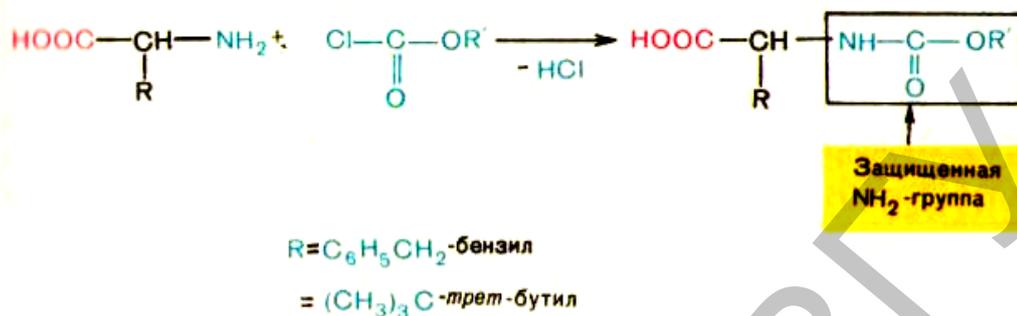
В биосинтезе белка имеется стадия защиты аминогруппы  $\alpha$ -аминокислоты с помощью кофермента ацетил-КоА. Какая химическая реакция, используемая в классическом синтезе пептидов, служит аналогом этой стадии? Используйте ее на примере синтеза дипептида Гли-Лей.

#### Решение

**Общий подход.** Для осуществления синтеза пептида с заданной последовательностью  $\alpha$ -аминокислот одной из операций является защита аминогруппы. С помощью реакции **ацилирования** в аминогруппу вводят электроноакцепторный заместитель, что приводит к снижению активности аминогруппы. Поскольку наилучшими **ацилирующими реагентами** являются ангидриды и хлорангидриды кислот, то они и применяются для защиты.

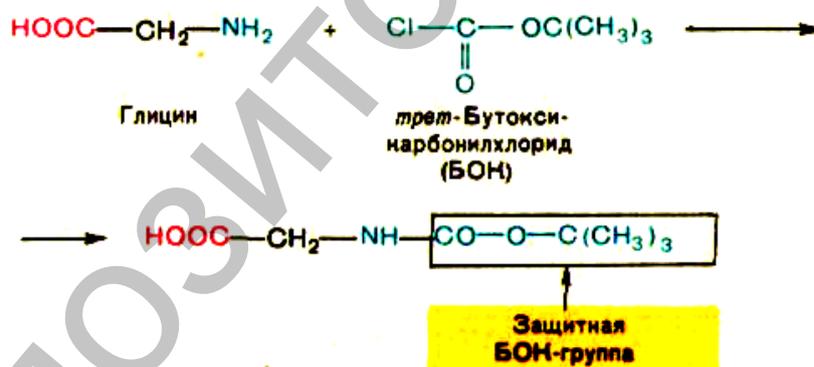
По окончании синтеза защиту снимают. Если защиту проводить ангидридами и хлорангидридами карбоновых кислот, то снятие защиты методом гидролиза в кислой среде может затронуть в синтезируемом пептиде пептидные связи. Поэтому указанные производные практически не используются для защиты.

Поиски наиболее удобных реагентов привели к производным хлорангидрида угольной кислоты, таким как *карбобензоксихлорид*  $C_6H_5CH_2OCOC1$  и *трет-бутоксикарбонилхлорид*  $(CH_3)_3COCOC1$ .

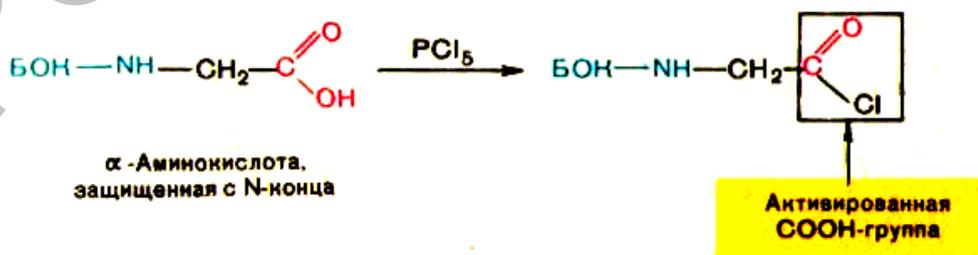


В случае использования карбобензоксихлорида защиту снимают путем восстановления водородом (*гидрогенолиз*) в присутствии платинового катализатора. При этом пептидная связь не затрагивается, *трет-бутоксикарбонильную* группу (**БОК-группа**) снимают действием галогенводорода в уксусной кислоте.

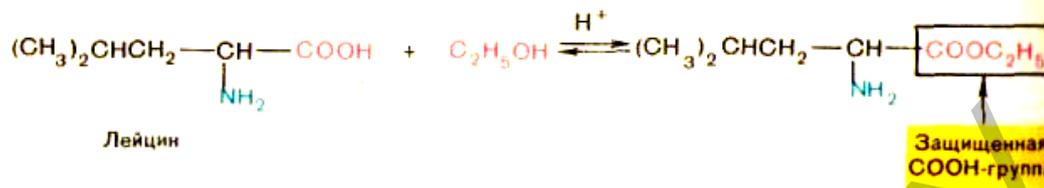
**Этап 1.** Из названия синтезируемого дипептида Гли-Лей следует, что N-концевой  $\alpha$ -аминокислотой должен быть глицин, аминогруппа которого не будет участвовать в образовании пептидной связи. Для этого проведем ее защиту *трет-бутоксикарбонилхлоридом*.



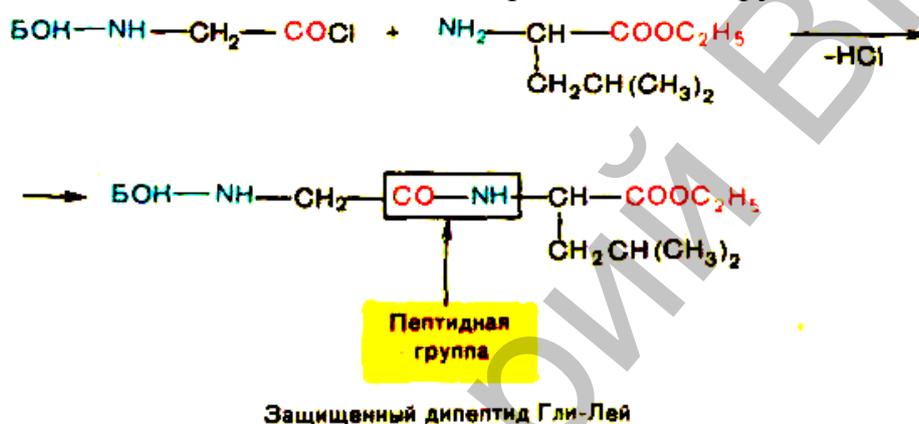
Следующий этап синтеза дипептида—активация карбоксигруппы N-защищенного глицина.



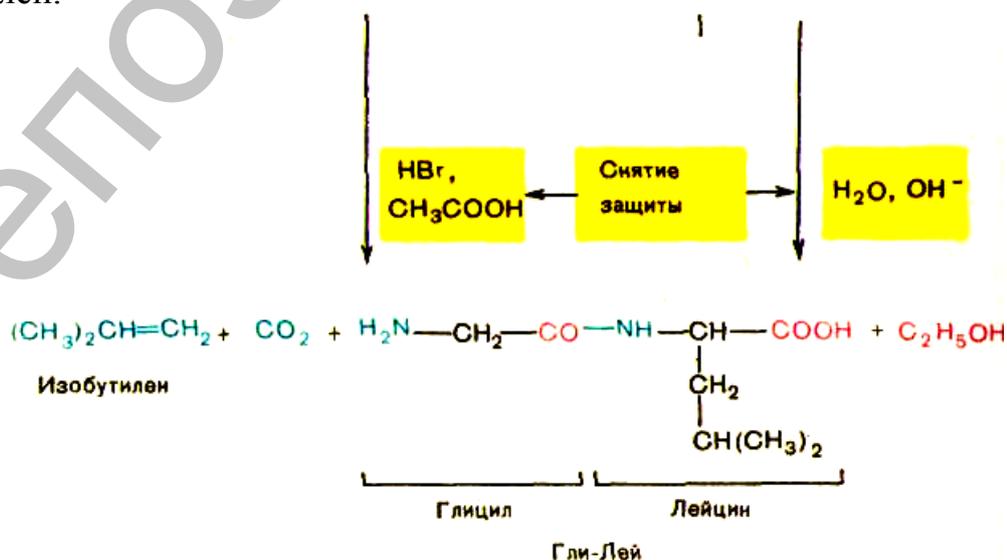
**Этап 2.** Защиту карбоксигруппы другой  $\alpha$ -аминокислоты—лейцина—осуществляют с помощью реакции этерификации



Синтез дипептида происходит путем взаимодействия глицина, защищенного по аминогруппе и активированного по карбоксильной группе, и лейцина, защищенного по карбоксильной группе.



**Этап 3.** Завершающей стадией является снятие защиты с амино- и карбоксигрупп. Сложноэфирную защиту снимают гидролизом в щелочной среде, так как пептидная связь в щелочной среде расщепляется труднее. БОК-группу с аминогруппы снимают действием раствора галогенводорода в уксусной кислоте. Реакция протекает с образованием промежуточного продукта *трет*-бутилкатиона, превращающегося в изобутилен.



**Заключение.** В классическом синтезе пептидов для защиты аминогруппы используется реакция ацилирования, которая протекает по механизму нуклеофильного замещения. В качестве ацилирующих реагентов на практике применяются производные хлорангидрида угольной кислоты — *трет*-бутоксикарбонилхлорид.

### Задачи для самостоятельного решения

1. Какие дипептиды можно получить из метионина и гистидина? Напишите эти дипептиды, используя трехбуквенные обозначения кислот.
2. Используя методы защиты и активации, синтезируйте дипептид Вал-Лиз.

### Обучающая задача 3

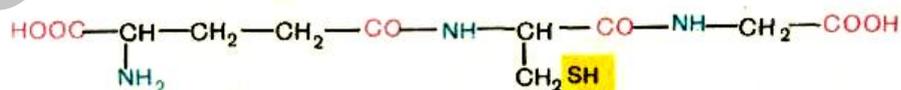
Глутатион — участник окислительно-восстановительных превращений серосодержащих веществ в организме. Какая функциональная группа глутатиона обеспечивает его участие в окислительно-восстановительных реакциях

#### Решение

**Общий подход.** Окисление органических соединений по существу состоит в удалении электронов из молекулы. Органические соединения в основном содержат ковалентные связи, в которых электроны объединены попарно. Реакции окисления протекают как с гомолитическим, так и с гетеролитическим разрывом связей (электронных пар). При гетеролитическом окислении электронные пары переходят от одной частицы к другой как единое целое. При гомолитическом окислении электроны из органической молекулы удаляются по одиночке с помощью активных радикалов.

Гетеролитическое окисление может происходить под действием электрофильных реагентов, обладающих сродством к электрону. Гетеролитические окислители обычно атакуют легко доступные электронные пары таких атомов, как кислород, азот или сера, т. е. атомов, обладающих нуклеофильным характером. Таким образом, реагенты электрофильного характера выступают в роли окислителей, а нуклеофильного — в качестве восстановителей.

**Этап 1.** Глутатион состоит из трех  $\alpha$ -аминокислотных остатков (трипептид).



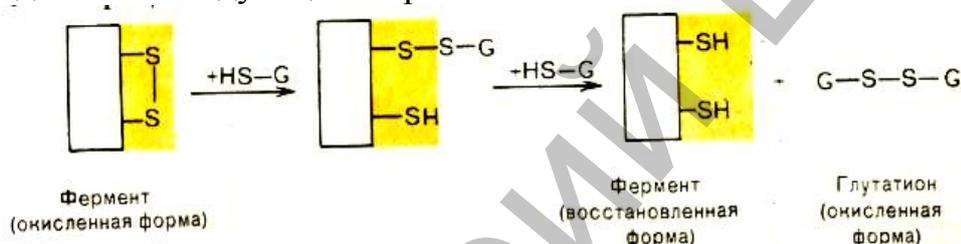
$\gamma$ -Глутамилцистеинилглицин, глутатион, G SH

Тиольная группа — SH и цистеиновом остатке обуславливает нуклеофильные и восстанавливающие свойства глутатиона. Под действием окислителей тиольная группа легко окисляется, при этом две молекулы тиола связываются между собой дисульфидной связью с

образованием дисульфидов  $R - S - S - R$ . В связи с легкой окисляемостью тиольной группы  $\alpha$ -аминокислота цистеин  $H_2SCH_2CH(NH_2)COOH$  в свободном виде в организме содержится в незначительном количестве.

Глутатион содержится в организме одновременно в восстановленной (обозначается GSH) и в окисленной ( $G - S - S - G$ ) формах в соотношении  $\sim 20:1$ , т. е. преимущественно в восстановленном виде. Таким образом, в глутатионе цистеиновый остаток «сохраняется» в восстановленной форме.

**Этап 2.** Глутатион взаимодействует с серосодержащими ферментами, тиольные группы которых находятся в окисленной форме, то есть в виде дисульфидных групп. В общем виде этот процесс можно представить следующим образом.



Перешедший в восстановленную форму фермент способен далее участвовать в реакциях восстановления субстратов. Окисленный глутатион восстанавливается ферментативным путем в GSH.

**Заключение.** Глутатион,  $\gamma$ -глутамилцистеинилглицин, в своем составе содержит свободную тиольную группу  $-SH$ . Тиольная группа восстанавливает многие окисленные соединения, в том числе и дисульфидную группу  $-S - S -$  ферментов.

### Лабораторная работа

#### Опыт. Биуретовая реакция на пептидную связь.

В пробирку поместите 5—6 капель раствора яичного белка (на общем столе), добавьте равный объем 10% раствора гидроксида натрия (2) и по стенке добавьте 1—2 капли раствора сульфата меди(II) (12). Наблюдается появление красно-фиолетовой окраски.

#### Задания и вопросы для защиты лабораторной работы.

1. Напишите схему образования биурета.
2. Каковы внешние признаки положительной биуретовой реакции?
3. Все ли белки дают биуретовую реакцию?

### Лабораторное занятие 3

#### Тема. Белки. Анализ аминокислотного состава.

**Цель:** приобретение навыков идентификации аминокислот, формирование знаний об определении N-концевых аминокислотных остатков.

*Исходный уровень.* Строение, химические свойства аминокислот, входящих в состав белков.

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### **Лабораторная работа**

#### **Опыт 1. Ксантопротеиновая реакция на тирозин.**

В пробирку поместите 5 капель 1% раствора тирозина (59) и добавьте 3 капли концентрированной азотной кислоты (на общем столе). Смесь нагрейте до появления желтой окраски. Пробирку охладите, и добавьте по каплям раствор аммиака до появления оранжевой окраски. Ксантопротеиновую реакцию дают и другие  $\alpha$ -аминокислоты, содержащие ароматический цикл.

#### **Задания и вопросы для защиты лабораторной работы.**

1. Напишите уравнение реакции взаимодействия тирозина с концентрированной азотной кислотой.
2. Какие  $\alpha$ -аминокислоты будут давать подобную реакцию?
3. Почему при добавлении аммиака окраска полученного раствора изменяется от желтой в оранжевую?

#### **Опыт 2. Ксантопротеиновая реакция белков.**

В пробирку поместите 10 капель раствора яичного белка и 2 капли концентрированной азотной кислоты. Содержимое пробирки осторожно нагрейте, все время встряхивая. Раствор и осадок окрашиваются в желтый цвет. Охладив пробирку, осторожно добавьте 1—3 капли 10% раствора гидроксида натрия (2) до появления ярко-оранжевой окраски.

#### **Задания и вопросы для защиты лабораторной работы.**

Какие  $\alpha$ -аминокислоты в составе белка можно открыть с помощью ксантопротеиновой реакции?

#### **Опыт 3. Цветная реакция на цистеин.**

В пробирку поместите 5 капель 1% раствора цистеина (60). Добавьте 2 капли 10% раствора гидроксида натрия (2). Нагрейте смесь до кипения, а затем добавьте 2 капли 10% раствора ацетата свинца(II) (31). Наблюдается выпадение осадка меркаптида свинца(II) серо-черного цвета.

#### **Опыт 4. Реакция на присутствие в белке серосодержащих $\alpha$ -аминокислот.**

В пробирку поместите 10 капель раствора яичного белка (на общем столе) и вдвое больший объем 10% раствора гидроксида на-

трия (2). Содержимое пробирки перемешайте, нагрейте до кипения (1—2 мин). К полученному щелочному раствору добавьте 5 капель 10% ацетата свинца(II) (31) и вновь прокипятите. Отметьте появление серо-черного осадка.

#### **Задания и вопросы для защиты лабораторной работы.**

1. Напишите в общем виде схему реакции белка с ацетатом свинца(II).
2. Какие  $\alpha$ -аминокислоты в составе белка можно открыть данной качественной реакцией?

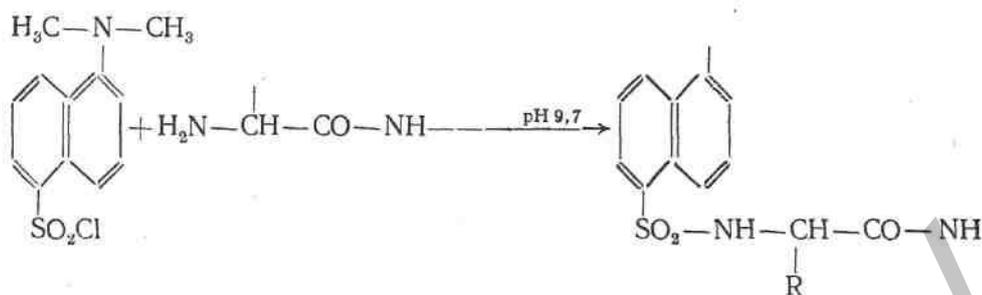
#### **Опыт 5. Определение N-концевых аминокислот методом динитрофенилирования.**

**Теоретическое введение.** В основе метода динитрофенилирования лежит реакция свободных  $\text{NH}_2$ -групп белка или пептида с **2,4-динитрофторбензолом (ДНФБ)** в щелочной среде, при которой образуются соответствующие динитрофенильные производные (**ДНФ-производные**). В реакцию с ДНФБ, кроме свободных  $\alpha$ - $\text{NH}_2$ -групп, вступают также  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ -группа лизина,  $\text{SH}$ -группа цистеина,  $\text{OH}$ -группы оксиаминокислот и имидазольный гетероцикл гистидина. ДНФ-производное белка или пептида подвергают полному кислотному гидролизу. N-концевые ДНФ-амино-кислоты экстрагируют из гидролизатов эфиром, отделяя их от свободных аминокислот и ДНФ-производных по другим функциональным группам аминокислот, которые растворимы в воде. Идентификацию ДНФ-производных аминокислот проводят с помощью электрофореза или хроматографии на бумаге или в тонком слое. Так как ДНФ-аминокислоты окрашены в желтый цвет, они не требуют дополнительного проявления на хроматограммах.

Реакцию белков и пептидов с ДНФБ и все последующие манипуляции следует проводить в темноте, так как ДНФ-производные на свету разлагаются. Необходимо также учитывать, что ДНФ-аминокислоты разрушаются и при кислотном гидролизе (особенно сильно разрушаются ДНФ-производные глицина, пролина, оксипролина, цистеина, триптофана, что требует дифференциальных условий гидролиза).

#### **Опыт 6. Определение N-концевых аминокислот дансильным методом.**

Аминогруппы белков и пептидов при щелочных значениях  $\text{pH}$  взаимодействуют с флуоресцентным красителем диметиламинафта-ленсульфонилхлоридом (дансилхлоридом, ДНС—Cl):



Помимо  $\alpha$ - и  $\beta$ -аминогрупп дансилхлорид вступает в реакцию с ОН-группами тирозина, SH-группами цистеина и имидазольными кольцами гистидина (два последних соединения неустойчивы при щелочных значениях pH), а также с аммиаком, растворенным в воде. При взаимодействии ДНС—Cl с аммиаком образуется дансилсульфонамид (ДНС—NH<sub>2</sub>). При щелочных значениях pH, дансилхлорид подвергается гидролизу с образованием дансилсульфоновой кислоты (ДНС—ОН). После окончания **реакции дансирования** модифицированный белок или пептид подвергают кислотному гидролизу. Большинство **дансильных производных** аминокислот (**ДНС-аминокислот**), а также ДНС—NH<sub>2</sub> и ДНС-ОН достаточно стабильны при гидролизе в 6 н. HCl при 105 °С в течение 4-10 ч. Однако в указанных условиях! полностью разрушается ДНС-триптофан, частично разрушаются дансильные производные метионина, карбоксиметилцистеина и пролина. Для надежной идентификации трех последних соединений следует уменьшать время гидролиза до 4 ч. С другой стороны, вследствие того, что пептидные связи, образованные остатками алифатических аминокислот (валина, лейцина, изолейцина), обладают большой устойчивостью к кислотному гидролизу, в ходе кратковременного гидролиза они разрываются не полностью. Это может приводить к образованию **дансированных** дипептидов и усложнять интерпретацию получаемых результатов. Чтобы избежать указанных трудностей, **дансированный** образец белка или пептида делят на две пробы, одну из которых гидролизуют в течение короткого (4 ч), а другую — в течение продолжительного (10—16 ч) времени. ДНС-аминокислоты (так же, как ДНС—ОН и ДНС—NH<sub>2</sub>) обладают интенсивной флуоресценцией (максимум возбуждения около ~ 370 нм), что обеспечивает высокую чувствительность описываемого метода.

**Реактивы:** NaHCO<sub>3</sub> - 0,2 М раствор; раствор дансилхлорида в ацетоне - 2 мг/мл; указанный раствор не следует долго хранить; HCl - 5,7 М раствор.

**Ход работы.** Реакцию проводят в маленьких пробирках (высота 40—45 мм, внутренний диаметр 3—4 мм) или в специальных пробирках, снабженных шлифом с краном. Образец пептида или белка (10—20 нмоль) вносят капилляром на дно пробирки. Содержимое пробирки высушивают в вакуум-эксикаторе. В пробирку добавляют 10—20 мкл 0,2 М раствора NaHCO<sub>3</sub> и снова высушивают в вакуум-эксикаторе.

Цель высушивания состоит в удалении следов аммиака, мешающего проведению реакции. К высушенному образцу добавляют равные объемы {10—20 мкл) бидистиллированной воды, свободной от аммиака, и ДНС—С1 в ацетоне и инкубируют при 37 °С 30—40 мин. Об окончании реакции можно судить по исчезновению желтой окраски раствора. Образец помещают в вакуум-эксикатор и упаривают досуха. Добавляют 30—60 мкл 5,7 М. НС1, после чего пробирки без шлифов запаивают, а пробирки со шлифом и краном подключают к вакуумному насосу, вакуумируют и герметически закрывают. Образцы подвергают гидролизу при 105 °С в течение 4—18 ч. Пробирки охлаждают, вскрывают, образец высушивают досуха в вакуум-эксикаторе или на роторном испарителе.

Описанная процедура разработана для пептидов и небольших белков, хорошо растворимых в воде или растворах бикарбоната натрия. Если белок не растворяется в этих условиях, дансирование можно проводить в 0,2 М растворе NaHCO<sub>3</sub>, содержащем 0,1%-ный додецилсульфат натрия. В этом случае, однако, возникает необходимость удаления додецилсульфата натрия до проведения кислотного гидролиза. Этого можно достичь, осаждая дансированный белок 2—3-кратным объемом ацетона и последующей 2—3-кратной отмывкой осадка ацетоном.

Для идентификации ДНС-аминокислот используют методы высоко- и средневольтного электрофореза на бумаге, тонкослойной хроматографии на пластинках, покрытых силикагелем или полиамидом, а также высокоэффективную жидкостную хроматографию высокого давления (ВЭЖХ). В зависимости от используемого метода удастся детектировать от  $1 \cdot 10^{-10}$  моль (метод ВЭЖХ) до  $5 \cdot 10^{-9}$  моль (электрофорез на бумаге) дансированных производных, что обеспечивает более чем 100-кратное повышение чувствительности по сравнению с определением N-концевых аминокислот методом динитрофенилирования (см. выше).

На электрофореграммах и тонкослойных пластинках все ДНС—аминокислоты и ДНС—NH<sub>2</sub> видны в виде ярко-желтых пятен, ДНС—ОН — в виде ярко-голубого пятна.

#### **Лабораторное занятие 4**

##### **Тема. Белки. Первичная структура.**

Цель темы: Сформировать знания стратегии определения первичной структуры белков, ферментативных и химических методов фрагментации полипептидной цепи.

Исходный уровень.

- 1) *Строение, химические свойства, реакции идентификации аминокислот, входящих в состав белков.*
- 2) *Строение пептидов. Пептидная связь.*

### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

## **Лабораторная работа** **Теоретическое введение.**

### **1. Ферментативный гидролиз трипсином и химотрипсином.**

#### Расщепление трипсином

Трипсин расщепляет пептидные связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы лизина и аргинина. К гидролизу трипсином устойчивы связи лизина и аргинина с пролином (лиз—про и арг—про). Замедление гидролиза этим ферментом наблюдается тогда, когда остатки лизина и аргинина находятся рядом со свободными  $\alpha$ -амино- и  $\alpha$ -карбоксильными группами, а также в участках полипептидной цепи с повышенным содержанием основных аминокислот (связи лиз—лиз, арг—арг, лиз—арг и арг—лиз расщепляются только частично). Селективность расщепления трипсином можно повысить путем блокирования  $\varepsilon$ -NH<sub>2</sub>-групп лизина (например, ангидридами янтарной, малеиновой или *цитраконовой* кислот) или же гуанидиновых группировок аргинина (дикетонowymi реагентами, такими как диацетил, циклогександион, фенилглиоксаль и др.). Гидролизу трипсином могут подвергаться связи, образованные и остатками цистеина, после превращения его в аминокэтилцистеин обработкой белка этилендиаминном.

Гидролиз трипсином проводят при 37° С в щелочной среде (рН 8,0— 8,6). Для гидролиза удобно пользоваться «летучими» буферными растворами (после высушивания гидролизаты не содержат солей), например, раствором бикарбоната аммония. Постоянство рН среды поддерживают подщелачиванием 2 н. раствором NaOH. Время гидролиза (от 2 до 12 ч) зависит от природы анализируемого белка. Иногда время гидролиза увеличивают до 24 ч. Отношение фермента к белку 1:100 или 1:50 (по весу). При длительном гидролизе во избежание автолиза фермент нередко добавляют к субстрату двумя или тремя порциями.

Высокий процент в большинстве белков лизина и аргинина приводит при гидролизе трипсином к появлению сравнительно большого числа относительно мелких пептидов. Их анализируют методом пептидных карт на бумаге или в тонком слое, а также с помощью хроматографии на колонках и электрофорезом.

*Действие трипсина можно изучить на примере расщепления белка мышц миозина, приводящего к образованию тяжелого меромиозина.*

## Расщепление химотрипсином

Химотрипсин преимущественно расщепляет пептидные связи, в образовании которых участвуют карбоксильные группы ароматических аминокислот. Кроме того, гидролизу химотрипсином могут быть подвергнуты связи, образованные лейцином, валином, метионином и аспарагином.

Гидролиз химотрипсином проводят при 37° С в щелочной среде (рН 8,0—8,6). Отношение фермента к белку 1 : 100 (по весу). При длительном гидролизе фермент к субстрату добавляют двумя или тремя порциями. Природа буфера, используемого для гидролиза, зависит от характера последующей работы. При разделении пептидов гидролизата хроматографическими и электрофоретическими методами на бумаге или в тонком слое удобно пользоваться «летучими» буферными растворами, например 0,5% -ным раствором  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (рН 8,2). При гидролизе химотрипсином получают сравнительно мелкие пептиды. Для изучения действия химотрипсина можно получить фрагменты миозина и провести их анализ.

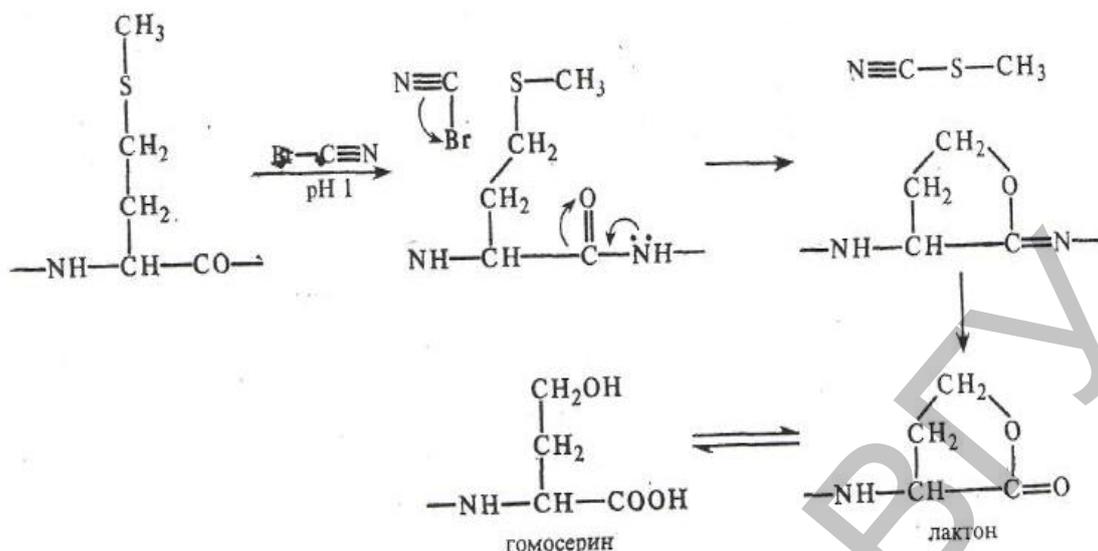
### **2. Химический гидролиз.**

Полипептидные цепи при ферментативном гидролизе расщепляются на большое число сравнительно мелких пептидов, что затрудняет их разделение и идентификацию. Поэтому за последнее время все более широкое распространение приобретают методы химического расщепления пептидных связей, образованных аминокислотами, редко встречающимися в белках. Это позволяет получать ограниченное число крупных пептидов.

Среди методов расщепления полипептидных цепей химическим путем наибольшее распространение получили гидролиз белка по остаткам метионина (бромцианом), тирозина (N-бромсукцинимидом), триптофана (o-йодозобензойной кислотой и BNPS-скатолом) и по остаткам цистеина.

### РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО ОСТАТКАМ МЕТИОНИНА

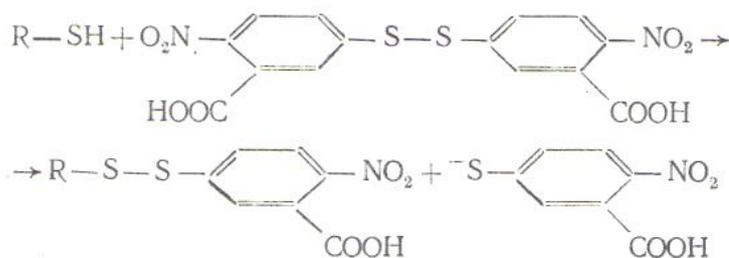
Взаимодействие метионина с *бромцианом* и последующее расщепление полипептидной цепи протекает при сильно кислых значениях рН по схеме, представленной ниже:

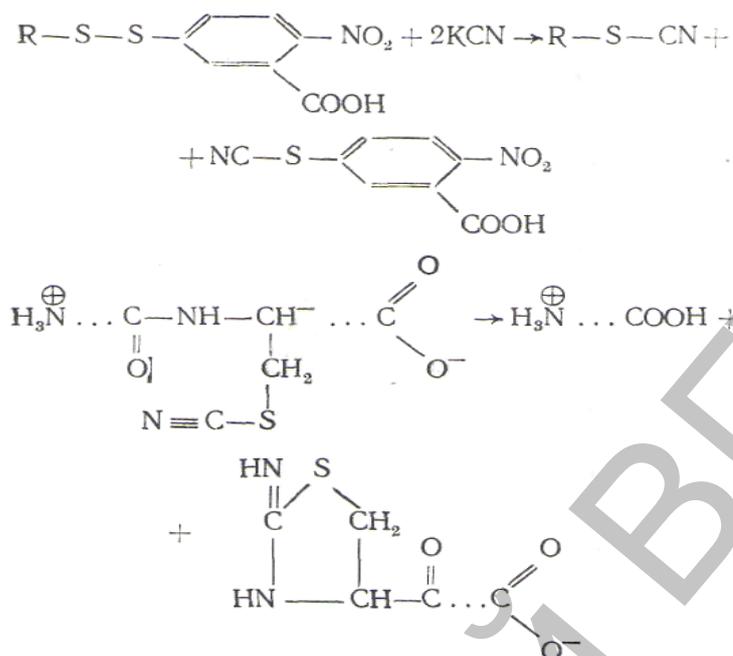


Как видно из схемы, если расщепление происходит по одиночному остатку метионина внутри полипептидной цепи, то образуются 2 пептида, на С-конце одного из которых расположен остаток гомосерина. Если в полипептидной цепи есть 2 расположенных по соседству остатка метионина, то помимо двух пептидов образуется свободный гомосерин. Свободный гомосерин образуется и в том случае, если остаток метионина расположен на N-конце белка или пептида. Химическое расщепление полипептидной цепи бромцианом высокоспецифично и, как правило, протекает с высоким выходом.

#### РАСЩЕПЛЕНИЕ ПО ОСТАТКАМ ЦИСТЕИНА

Метод расщепления состоит из следующих этапов: 1) остатки цистеина (или цистина) восстанавливают путем добавления избытка *дитиотреитола*; 2) сульфгидрильные группы модифицируют *5',5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислотой)* (ДТНБ); 3) модифицированный белок обрабатывают избытком цианистого калия, в результате чего SH-группы в структуре белка превращаются в SCN-группы; 4) при щелочных значениях pH (pH 8—9) в присутствии 6—8 М растворов мочевины или гуанидинхлорида происходит разрыв полипептидной цепи вблизи остатков β-тиоцианоаланина:



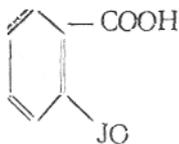


Полнота расщепления полипептидной цепи зависит от окружения модифицированных остатков цистеина. Если с остатками цистеина соседствуют остатки валина, пролина, лейцина, тирозина, лизина, аланина и аспарагиновой кислоты, то расщепление идет на 90—95%.

### Опыт. Расщепление по остаткам триптофана

**Теоретическое введение.** Известно несколько соединений, используемых для расщепления белка по остаткам триптофана: N-бромсукцинимид, BNPS-скатол (2-(2-нитрофенилсульфонил)-3-метил-3-броминдоленин), диметилсульфоксид в соляной кислоте и *o*-йодозобензойная кислота. Эти соединения действуют, как мягкие окислители триптофана. Однако механизмы реакций пока до конца не известны.

Наибольшей селективностью и эффективностью в отношении гидролиза пептидных связей, в образовании которых участвует триптофан, характеризуется *o*-йодозобензойная кислота:



Выход продуктов гидролиза колеблется от 70 (связи триптофана с валином и изолейцином) до 100% (связи со всеми остальными аминокислотами). При блокировании SH-групп в белках окислению при ее использовании подвергаются только остатки метионина. Селективность гидролиза зависит от качества используемого препарата: примеси в виде *o*-йодоксибензойной кислоты приводят к разрыву связей по остаткам тирозина. Для разрушения *o*-йодоксибензойной кислоты применяют *n*-крезол.

*Реактивы:* *o*-йодозобензойная кислота, гуанидинхлорид — 4 М раствор в 80%-ной уксусной кислоте, *p*-крезол,  $\beta$ -меркаптоэтанол,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  - 20%-ный раствор.

**Ход работы.** Сухой образец белка растворяют в минимальном объеме 4 М раствора гуанидинхлорида в 80%-ной уксусной кислоте (концентрация белка 1 — 10 мг/мл). К раствору белка добавляют *o*-йодозобензойную кислоту, предварительно растворенную в минимальном объеме того же раствора. Содержимое пробы преинкубируют с *p*-крезолом в течение 2—3 ч. Используют 0,2 моль *p*-крезола на 1 моль *o*-йодозобензойной кислоты. Белок и *o*-йодозобензойную кислоту берут в соотношении 1:2 (по весу). Гидролиз ведут в темноте при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакцию останавливают добавлением  $\beta$ -меркаптоэтанола. Реакционную смесь обессоливают на колонке (1,5X45 см) с сефадексом G-50 (fine), уравновешенной 20%-ным раствором уксусной кислоты. Гидролизат подвергают лиофилизации.

Анализ полученного гидролизата проводят при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

## Лабораторное занятие 5

### Тема. Белки. Методы разделения белков и аминокислот.

**Цель:** Сформировать: 1) представление о хроматографических методах анализа аминокислотного состава; 2) умение проводить колоночную гель-фильтрацию.

#### Исходный уровень.

- 1) Реакции идентификации аминокислот, входящих в состав белков.
- 2) Теоретические основы хроматографических методов разделения.

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Лабораторная работа

#### **Опыт 1. Хроматографический анализ смеси аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге**

**Теоретическое введение.** Довольно точным и доступным является метод распределительной хроматографии на бумаге (модификация адсорбционной хроматографии). При этом методе в качестве адсорбента используют специальную фильтровальную бумагу. Хроматографию проводят в закрытой камере, чтобы избежать испарения растворителя (рис.1).

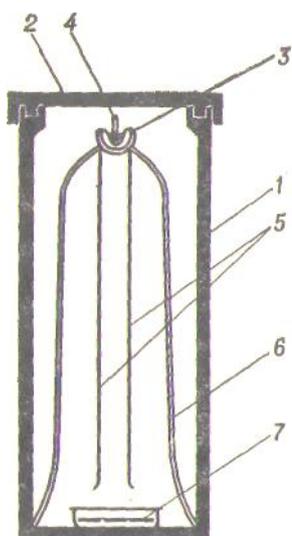


Рис. 1. Закрытая камера для распределительной хроматографии на бумаге (в разрезе):

1 — камера; 2 — крышка; 3 — лодочка с растворителями, в которую погружены верхние концы бумажных полос; 4 — предметное стекло, закрепляющее бумажные полосы; 5 — полосы бумаги—хроматограммы; 6 — подставка для лодочки с растворителем; 7 — кювета с растворителями.

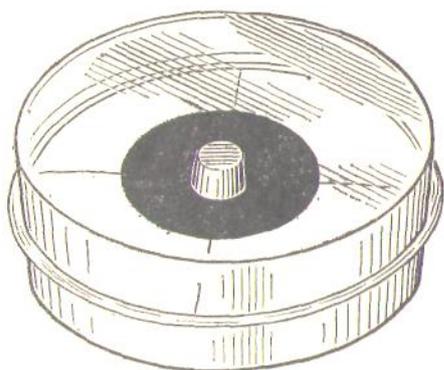


Рис. 2. Двухкамерная хроматограмма гидролизата белка на бумаге

Разделение смеси аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге используют для определения аминокислотного состава белка, для качественного и количественного определения аминокислот в биологических жидкостях и тканях. Этот метод позволяет выделить отдельные вещества из небольшого количества сложной смеси (рис, 2).

**Радиальная хроматография** является одной из разновидностей метода распределительной хроматографии.

**Принцип метода.** Отдельные аминокислоты обладают различной растворимостью в двух частично смешивающихся жидкостях, одной из которых является вода, другой — водонасыщенный органический растворитель, например фенол.



**Рис. 3.** Бумажный диск в чашке Петри.

Диск разделен на четыре части. Фенол движется (темное пятно) от центра к периферии и увлекает за собой аминокислоты, нанесенные в каждой четверти диска.

Из двух частично смешивающихся жидкостей один растворитель должен быть полярным (неподвижная фаза), а другой неполярным — подвижная фаза. Более гидрофобная аминокислота или другое вещество, лучше растворяющееся в неполярном растворителе, движется с большей скоростью от линии старта, чем гидрофильная аминокислота. В результате этого смесь аминокислот по окончании хроматографического разделения оказывается на разном расстоянии от линии старта.

Радиальную хроматографию проводят на бумаге в чашке Петри (рис. 3). Растворитель перемещается от центра к периферии и захватывает аминокислоты, которые распределяются концентрическими кругами и обнаруживаются после высушивания бумаги и проведения нингидриновой реакции

**Ход работы.** 1. В центре бумажного диска или квадрата из хроматографической бумаги, стороны которого на 1 см больше диаметра чашки Петри, делают вырез около 1 см в диаметре. Простым карандашом диск делят на 4 части по диагоналям, затем помещают его на ножку, сделанную из фильтровальной бумаги в виде трубочки высотой 2 см, вставленной в вырез диска (см. рис. 3). Диск следует держать за края, чтобы избежать появления отпечатков пальцев на хроматограмме.

2. Отступив от центра на 1 см, в каждом секторе диска обводят простым карандашом кружки и обозначают их цифрами 1, 2, 3, 4. Наносят капилляром небольшое количество (1—2 капли) исследуемых растворов аминокислот: аланина (1), глутамина (2) и лейцина (3). В четвертый сектор (4) наносят смесь аминокислот. При нанесении исследуемых аминокислот в каждый кружок следят за тем, чтобы капля наносимого раствора не заходила за кружок. После нанесения раствора бумагу необходимо просушить на воздухе в течение 10 мин, чтобы не было влажного пятна.

3. На дно чашки Петри (одного диаметра с крышкой ее) наливают 10

мл водонасыщенного раствора фенола так, чтобы ножка диска погрузилась в раствор. Чашку Петри накрывают крышкой и проводят хроматографическое разделение в течение 40—50 мин при комнатной температуре. По ножке растворитель поднимается вверх и распределяется по окружности бумажного диска, увлекая за собой нанесенные аминокислоты. При этом происходит разделение исследуемой смеси на отдельные аминокислоты, движущиеся с разной скоростью, соответственно коэффициентам их распределения между водой и фенолом. Когда фронт растворителя дойдет почти до края бумажного диска, крышку чашки Петри снимают, на нее кладут бумажный диск, удерживая пинцетом его края, и помещают в термостат при температуре 90—100°C на 10 мин с целью устранения растворителя— фенола и фиксации аминокислот.

4. Для выявления пятен аминокислот хроматограмму опрыскивают 0,2% раствором *нингидрина* (ацетоновым или спиртовым) либо сухую хроматограмму быстро, одним движением, смачивают раствором нингидрина, налитым в чашку Петри, и вновь высушивают в сушильном шкафу при температуре 90—100°C в течение 5 мин. При этом проявляются аминокислоты в виде отдельных трех полос, окрашенных в розово-фиолетовый цвет, где каждое пятно соответствует определенной аминокислоте

Сравнивая расположение пятен в исследуемой смеси с положением пятен в отдельных аминокислотах, устанавливают присутствие в смеси определенных аминокислот. Для каждой аминокислоты рассчитывают коэффициент распределения —  $R_f$  или скорость перемещения по формуле:  $R_f = a/b$ , где  $a$  — расстояние в миллиметрах, пройденное аминокислотой от места нанесения аминокислоты до середины ее пятна;  $b$  — расстояние в миллиметрах от места нанесения аминокислоты (линии старта) до фронта растворителя. Чем меньше растворимость аминокислоты в воде и чем больше ее растворимость в феноле или в другом органическом растворителе, тем быстрее она движется вслед за фронтом органического растворителя, тем больше величина  $R_f$ , и, наоборот, чем больше ее растворимость в воде и меньше в органическом растворителе, тем медленнее аминокислота будет передвигаться и тем меньше величина  $R_f$ . Коэффициент распределения  $R_f$  — величина постоянная для каждой аминокислоты при постоянных условиях опыта (температура, сорт бумаги, растворитель). Сравнивают коэффициент распределения известных стандартных аминокислот с коэффициентом распределения аминокислот, полученных для исследуемой смеси и определяют наличие отдельных аминокислот в исследуемом материале.

## **Опыт 2. Колоночная гель-фильтрация.**

Для метода гель-фильтрации используются так называемые молекулярные сита — инертные гидратированные полисахаридные материалы, представляющие собой пористые гранулы. Их получают из бактериальных полисахаридов (*сефадексы*), агара или полимеризованных акриламидных гелей (*акрилекс*).

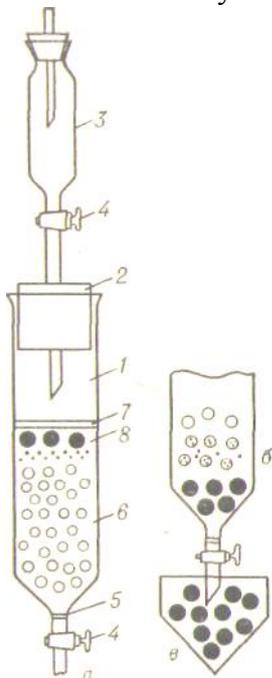
Принцип метода. Молекулы разных размеров различают по способности проходить через поры внутрь гранул геля. Небольшие молекулы, эффективно проникающие внутрь гранул сквозь поры, проходят через колонку, заполненную гелем, медленнее, чем вещества, молекулы которых слишком велики. Об эффективности разделения смеси судят по составу вытекающего из колонки раствора (*элюат*).

При работе с колонкой необходимо соблюдать следующие правила (рис.4). 1. Над гелем должен находиться слой изотонического раствора хлорида натрия, чтобы гель не высыхал. 2. При отсутствии капельницы изотонический раствор хлорида натрия добавляют в колонку аккуратно через воронку из маленького стаканчика, регулируя скорость элюирования, открыв нижний зажим колонки. 3. При разделении смеси для гель-фильтрации необходимо следить, чтобы в колонке был ток жидкости (т.е. открыт зажим снизу).

**Ход работы.** Колонку для разделения вещества заполняют гелем, полученным при гидратировании акрилекса Р-200 изотоническим раствором хлорида натрия. На поверхность геля наносят 2-3 капли фракционирующего раствора, представляющего собой смесь трех веществ: насыщенного раствора голубого декстрана (относительная молекулярная масса порядка  $10^7$ ), рибофлавина (относительная молекулярная масса около  $3 \cdot 10^2$ ) и гемоглобина (относительная молекулярная масса  $64,5 \cdot 10^3$ ). В качестве фракционирующего раствора можно использовать также смесь (1:1) двух веществ: насыщенного раствора голубого декстрана и насыщенного раствора бихромата калия —  $K_2C_2O_7$  (относительная молекулярная масса — 294, 22). Фракционирующий раствор (смесь 3 или 2 веществ) должен сначала впитаться гелем, затем в колонку вносят 2 раза по 2 мл изотонического раствора хлорида натрия. После этого подключают капельницу с изотоническим раствором хлорида натрия, предназначенным для элюирования (вымывания) разделяемых веществ. По мере прохождения через колонку элюирующего изотонического раствора хлорида натрия смесь разделяется на фракции, окрашенные в различные цвета. Каждую фракцию собирают в отдельную центрифужную пробирку. В соответствии с относительной молекулярной массой быстрее всего элюируется декстран (голубой), затем гемоглобин (красный) и рибофлавин или бихромат калия (желтый).

#### Рис. 4. Схема устройства для гель-фильтрации.

*a* — до разделения веществ; *б* — после разделения веществ; *в* — элюирование разделенных веществ с колонки. Светлые кружки — гель; черные кружки — большие молекулы; точки — маленькие молекулы.



1 — колонка; 2 — пробка со стеклянной трубкой; 3 — капельница, содержащая элюирующий раствор; 4 — кран (или зажим); 5 — кружок фильтровальной бумаги, соответствующий внутреннему диаметру колонки; 6 — поверхность суспензии геля (акрилекс Р-200) определенной пористости; 7 — изотонический раствор хлорида натрия, слой 2—3 мм (предохраняет суспензию от высыхания); 8 — смесь фракционируемых веществ

### Лабораторное занятие 6

#### Тема. Белки.

#### Последовательная деградация белков по методу Эдмана

**Цель:** Сформировать знание метода Эдмана и представления о его использовании для определения первичной структуры белков.

Исходный уровень.

- 1) Строение изотиоцианатов (неорганическая химия)
- 2) Физико-химические методы анализа: газовая хроматография, масс-спектрометрия, ВЭЖХ.
- 3) тема 5.

План:

1. Решение ситуационных задач
2. Идентификация фенилтиогидантоиновых производных аминокислот методом ВЭЖХ. Изучение условий хроматографирования и хроматограмм.

#### Обучающая задача 1

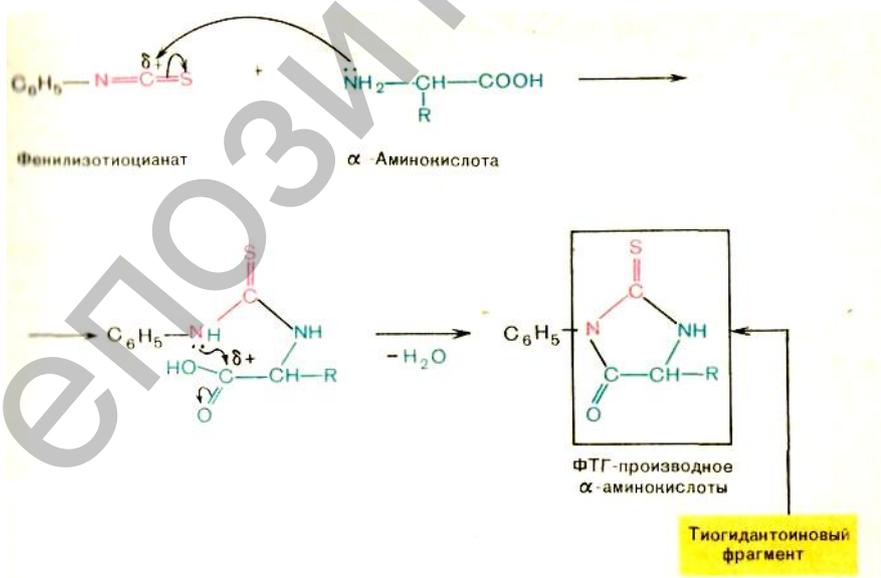
При деградации по Эдману тетрапептида *тафтсина*, недостаток которого в организме вызывает рецидивирующие гнойные процессы, последовательно получены фенилтиогидантоиновые производные I, II, III, IV, имеющие следующие значения  $R_f$ : 0,58, 0,78, 0,89, 0,01 соответственно (тонкослойная хроматография, силикагель G, элюент хлороформ — метанол 9:1). Напишите строение тафтсина и назовите его.

## Решение

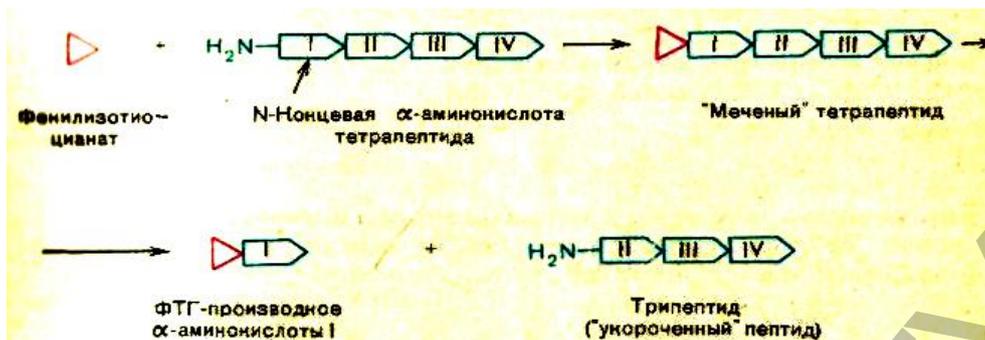
**Общий подход.** Для определения аминокислотной последовательности используют расщепление пептидов по методу Эдмана. Метод основан на взаимодействии *фенилизотиоцианата* с  $\alpha$ -аминокислотами с образованием *фенилтиогидантоиновых (ФТГ) производных*. ФТГ-производные  $\alpha$ -аминокислот различаются по температурам плавления и по значению  $R_f$  в хроматографическом анализе (табл. 2).

Таблица 2 Значение  $R_f$  на тонком слое силикагеля G ФТГ-производных некоторых  $\alpha$ -аминокислот

ФТГ-производных $\alpha$ -аминокислот.	Элюентные системы, объемные отношения	
	Хлороформ – метанол 9:1	Хлороформ - муравьиная кислота 20:1
Аланин	0,77	0,44
Аргинин	0,01	0
Лизин	0,78	0,34
Метионин	0,81	0,54
Пролин	0,89	0,70
Тирозин	0,59	0,22
Треонин	0,58	0,17

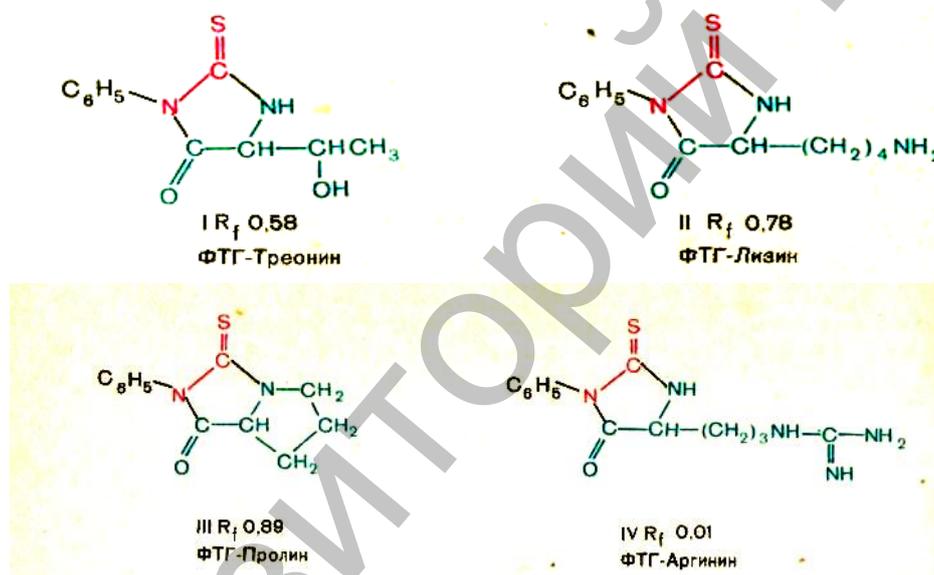


Сущность метода состоит в последовательном отщеплении  $\alpha$ -аминокислот от полипептида, начиная с N-концевой  $\alpha$ -аминокислоты.

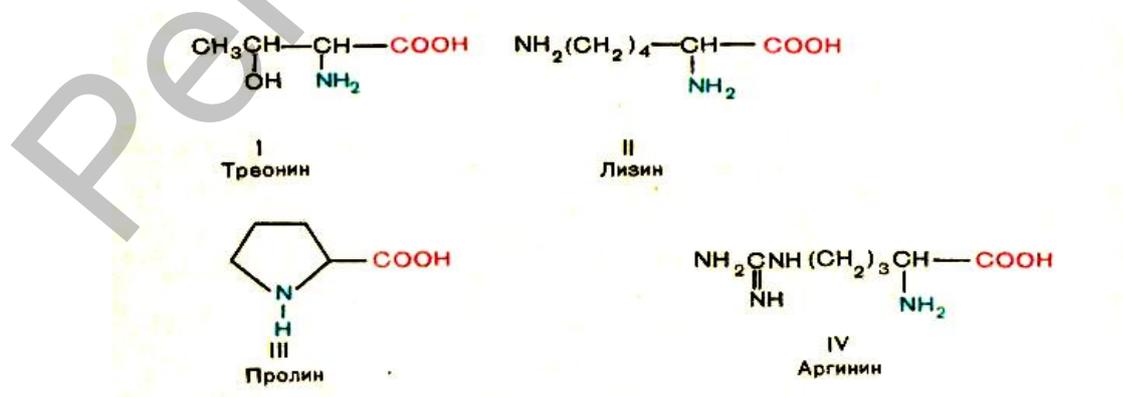


Образующиеся ФТГ-производные идентифицируют с помощью хроматографических методов.

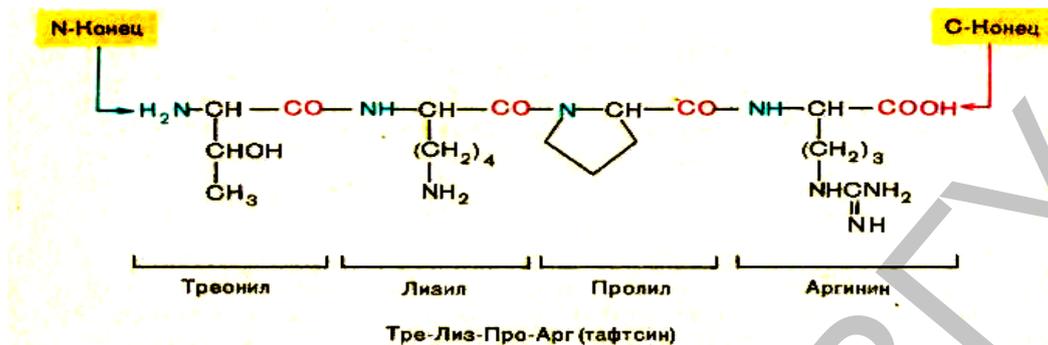
**Этап 1.** В табл. 1 находим, что полученным значениям  $R_f$  соответствуют следующие ФТГ-производные α-аминокислот:



**Этап 2.** По данным хроматографического анализа устанавливаем, что в образовании тетрапептида участвовали следующие α-аминокислоты:



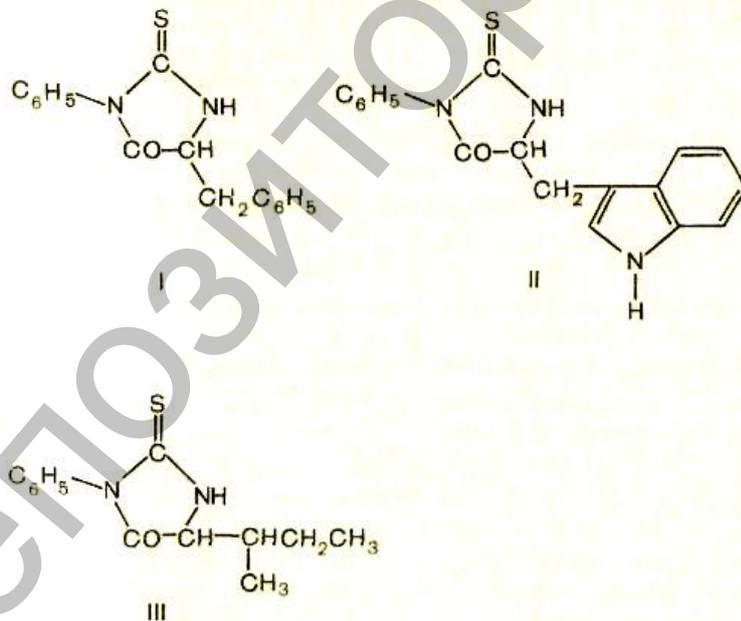
Таким образом, первичная структура тафтсина может быть представлена следующей формулой:



**Заключение.** Тафтсин — тетрапептид, в котором α-аминокислоты расположены в последовательности: Тре-Лиз-Про-Арг, т. е. это — треониллизилпролиларгинин.

#### Задачи для самостоятельного решения

1. Напишите схему реакции фенилизотиоцианата с аспарагиновой кислотой.
2. Напишите строение ФТГ-производных, образующихся при расщеплении ПО Эдману трипептида Тир-Глу-Ала.
3. Напишите формулу трипептида и назовите его, если при его деградации по Эдману получены ФТГ-производные в последовательности:



4. Напишите строение ФТГ-производных α-аминокислот, полученных деградацией по Эдману трипептида Гис-Сер-Цис.
5. При анализе с помощью ТСХ (силикагель G, хлороформ — муравьиная кислота 20:1) ФТГ-производных трипептида получены следующие значения  $R_f$ : I — 0,44, II — 0,22, III — 0,54 (см. табл. 1). Напишите формулу трипептида и назовите его.

## Лабораторное занятие 7

### Тема. Сложные белки.

**Цель:** Сформировать знания о составе и строении металлопротеинов хромо-и фосфопротеинов.

Исходный уровень.

Знания и представления из курса Основы бионеорганической химии:

1) Химическое строение порфиринов, металлопорфиринов (гема, хлорофилла);

2) Представления о строении металлопротеинов, хромопротеинов (гемоглобина, миоглобина, цитохромов, пероксидазы).

План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Лабораторная работа

#### Опыт 1. Обнаружение геминовой группировки гемоглобина.

#### Теоретическое введение. Хромопротеины.

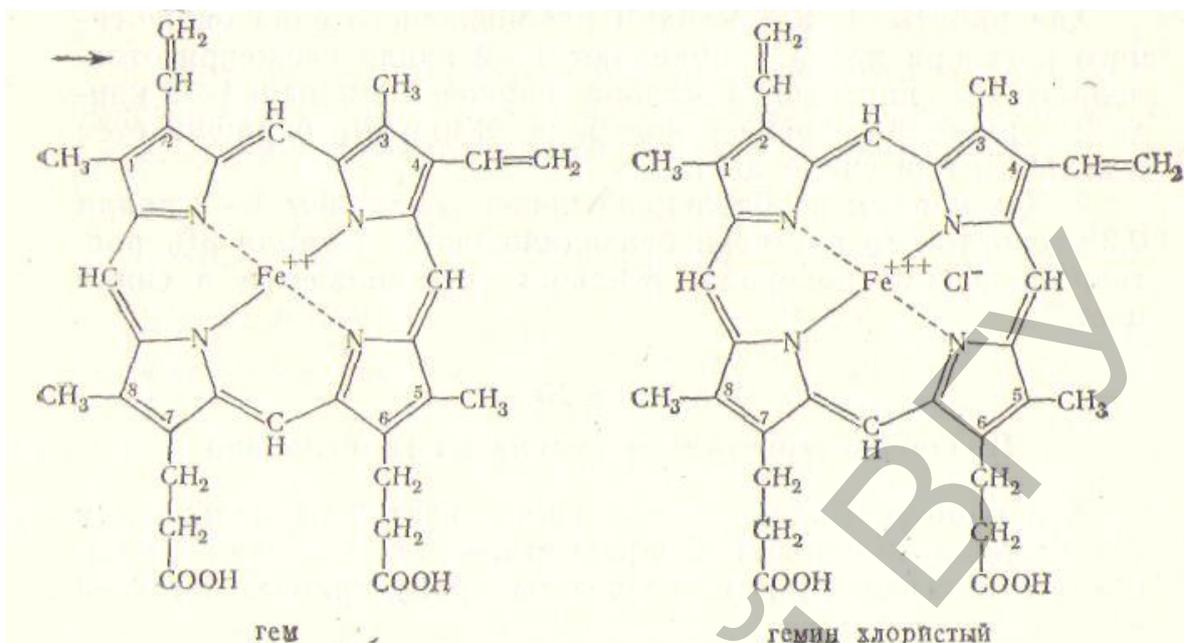
Хромопротеинами называются сложные белки, у которых протетической группой является какое-либо окрашенное соединение небелкового характера, как, например, гем, каротиноиды, флавины и др.

Хромопротеины широко распространены в животном и растительном мире и играют важную роль в окислительно-восстановительных процессах организма. Особенно распространены являются хромопротеины *геминовой* природы. К ним относятся гемоглобин крови, миоглобин или миохром мышечной ткани, некоторые ферменты растительного и животного происхождения, как, например, каталаза, пероксидаза, цитохромы и др.

Гемоглобин состоит из белка глобина и пигментной части — *гема*. Видовая специфичность гемоглобина человека и различных животных обусловлена особенностями в структуре глобинов. Строение гема одинаково во всех сложных белках геминовой природы. По химической природе гем представляет собой соединение протопорфирина с двухвалентным железом.

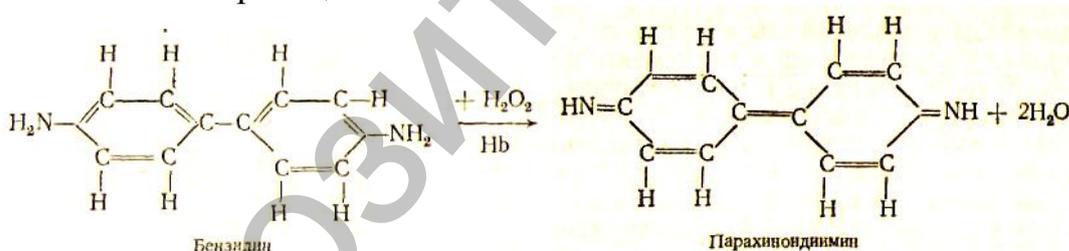
*Протопорфирином* называется такое производное порфина, у которого водороды пиррольных колец в 1-м, 3-м, 5-м и 8-м положениях замещены метильными группами, во 2-м и 4-м — винильными, в 6-м и 7-м — остатками пропионовой кислоты.

При окислении гем превращается в гематин или гемин. У *гемамина* третья валентность железа связана с гидроксильной группой, у *гемина* — с хлором.



Реакция обусловлена способностью гемоглобина катализировать окисление *бензидина* перекисью водорода. Бензидин при этом окисляется в *парахинондиимин* и жидкость приобретает синюю окраску, а при стоянии — красную. Аналогично протекает реакция и с *гваяковой кислотой*. Эти реакции очень чувствительны и служат для обнаружения минимальных количеств крови в биологических жидкостях.

Химизм реакции:



Реактивы, оборудование, исследуемый материал: 1. Перекись водорода, 3% раствор. 2. Бензидин, 1% раствор. 3. Роданид аммония или роданид калия, 1% раствор. 4. Азотная кислота концентрированная. 5. Хлористоводородная кислота, 10% раствор. 6. Пипетки глазные. 7. Кровь, разбавленная водой.

**Ход работы.**

**1. Бензидиновая проба.** В 1-ю пробирку наливают 5 капель крови во 2-ю—5 капель воды. В обе пробирки добавляют по 5 капель 1% раствора бензидина и по 5 капель 3% раствора перекиси водорода. В одной из пробирок жидкость окрашивается в синий цвет.

**2. Обнаружение железа.** На крышку тигля вносят 1—2 капли крови и озоляют, добавив 2—4 капли концентрированной азотной кислоты, продолжают нагревание до образования сухого остатка. Затем остаток растворяют в 10% растворе хлористоводородной кислоты,

прибавив несколько капель, и проводят реакцию на  $\text{Fe}^{+3}$ : к раствору прибавляют 1—2 капли раствора роданида аммония или роданида калия и наблюдают образование роданида железа  $\text{Fe}(\text{CNS})_3$ , окрашивающего жидкость в розовый или красный цвет.

## Опыт 2. Выделение казеиногена из молока и его гидролиз.

### Теоретическое введение. Фосфопротеины.

**Фосфопротеинами** называются белки, которые содержат фосфорную кислоту (0,5—0,9%), связанную, как полагают, с молекулами оксиаминокислот по типу сложных эфиров.



Фосфопротеины нерастворимы в воде, но растворяются в разбавленных щелочах, осаждаются при подкислении или при полунасыщении сернокислым аммонием. К фосфопротеинам относятся: казеин (казеиногены) молока, вителлин яичного желтка, ихтулин рыбьей икры и некоторые ферменты (фосфоорилаза, фосфоглюкомутаза, пепсин).

Казеиноген обладает свойствами кислоты и в молоке находится в виде анионов, растворимых в воде (кальциенат казеиногена). Недиссоциированные молекулы казеиногена малорастворимы в воде. Изoeлектрическая точка казеиногена находится при pH 4,7. Этим объясняется, что при подкислении молока до pH 4,7 молоко свертывается в результате выпадения в осадок казеиногена. Не следует добавлять в молоко избыток кислоты, так как молекулы казеиногена перезаряжаются и вновь переходят в раствор, что мешает осаждению. Свертывание молока возможно и в присутствии молочной кислоты, образовавшейся из лактозы под влиянием молочнокислых бактерий. При ферментативном свертывании молока (действие пепсина) казеиноген подвергается химическим изменениям с образованием из него казеина. Кальцита и соль казеина в противоположность кальциевой соли казеиногена нерастворима в воде. Превращением казеиногена в казеин объясняется ферментативное свертывание молока.

Реактивы, оборудование и исследуемый материал:

1. Уксусная кислота концентрированная. 2. Сульфат меди, 1% раствор. 3. Едкий натр, 10% раствор. 4. Серная кислота, 10% раствор. 5. Молибденовый реактив. 6. Карбонат натрия, 0,1% раствор. 7. Фенолфталеин, 0,5% спиртовой раствор. 8. Азотная кислота конц. 9. Воронки. 10. Фильтры. 11. Пробирки. 12. Стеклянная палочка. 13. Пипетка вместимостью 2 мл. 14. Пробирка для гидролиза (с обратным холодильником). 15. Молоко.

Порядок выполнения работы.

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

2. **Гидролиз казеиногена.** При щелочном гидролизе, казеиногена, выделенного из молока или зерен казеина, происходит его распад на фосфат и белок. После осаждения казеиногена из молока (или 100 мг казеина в виде порошка) все содержимое с фильтра переносят в пробирку для гидролиза с обратным холодильником. Затем смывают осадок с фильтра 2 мл 0,1% раствора карбоната натрия в ту же пробирку и добавляют 4 мл 10% раствора едкого натра. Кипятят на умеренном огне (на асбестовой сетке) 15 мин с момента закипания. После охлаждения к гидролизату добавляют равный объем 0,1% раствора карбоната натрия и проводят реакции на продукты гидролиза.

3. **Обнаружение белка.** Белок обнаруживают биуретовой реакцией (см. ранее).

4. **Обнаружение фосфата (молибденовая проба).** К 10 каплям разведенного гидролизата казеиногена добавляют 1 каплю фенолфталеина и 1 каплю концентрированной азотной кислоты и только после обесцвечивания вносят 20 капель молибденового реактива. Затем доводят раствор до кипения и сразу пробирку охлаждают в струе холодной воды. На дне пробирки появляется желтый осадок фосфорномолибденовоокислого аммония.

## Лабораторное занятие 8

### Тема. Пространственная структура пептидов и белков.

**Цель:** Сформировать: знания типов взаимодействий, определяющих пространственную структуру полипептидов; представления об изучении пространственной структуры пептидов и белков физическими методами.

*Исходный уровень.*

*Из курса биохимии: 1) Понятие о вторичной, третичной, четвертичной структуре белков,  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -структуре; других типах регулярных структур полипептидной цепи. 2) Роль водородных связей.*

План занятия:

1. Решение ситуационных задач
2. Работа с компьютерной информацией.

### **Лабораторное занятие 9**

#### **Тема. Биологическая роль белков.**

**Цель:** Сформировать представления о составе и строении специфичных белков: системы гемостаза, бактериальной системы подвижности, рецепторных, токсинов.  
*Исходный уровень.*

*Курсы физиологии человека и животных и ботаники: понятия о системе гемостаза, бактериальной системе подвижности, системы свертывания крови, фоторецепторных мембранах, рецепторах клеточной мембраны.*

План занятия: Изучение компьютерной информации.

### **Лабораторное занятие 10**

#### **Тема. Ферменты.**

**Цель:** Сформировать знания функциональных групп активных центров ферментов: химотрипсина, лизоцима, карбоксипептидазы А.

*Исходный уровень.*

*Курс биохимии: представления о строении ферментов химотрипсина, лизоцима, карбоксипептидазы А.*

План занятия:

1. Изучение компьютерной информации
2. Тестовый контроль (по темам 9,10)

### **Лабораторное занятие 11**

#### **Тема. Нуклеозиды.**

**Цель темы:** Сформировать знания номенклатуры, структуры, стереохимии химических свойств нуклеозидов, для дальнейшего изучения темы «Нуклеотиды».

*Исходный уровень.*

*Азотистые основания, таутометрия (курс органической химии).*

План занятия:

1. Решение ситуационных задач.
2. тестовый контроль

#### **Обучающая задача**

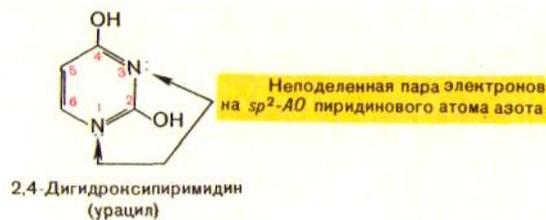
Какие таутомерные формы возможны для урацила и, какая из них участвует в образовании нуклеозида уридина? Напишите строение уридина.

#### **Решение**

**Общий подход.** Урацил — дигидроксипроизводное пиримидина, относится к нуклеиновым основаниям, входящим в состав нуклеи-

новых кислот. **Гидроксипиридины** склонны к таутомерии и могут существовать в лактимной и лактамной формах.

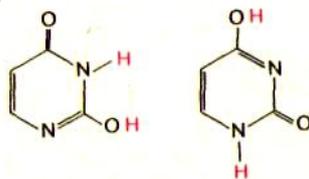
**Этап 1.** Запишем структурную формулу урацила, расположив пиримидиновое кольцо так, как это принято в химии нуклеиновых кислот (атом N-3 справа), и пронумеруем атомы гетероцикла по принятому правилу:



В связи с тем, что атом азота проявляет большую основность, т. е. большее сродство к протону, чем атом кислорода, в молекуле урацила возможно перемещение одного или двух протонов от атомов кислорода к соответствующим атомам азота. При этом возникают различные **таутомеры, т. е. изомеры, находящиеся в равновесии**. В названиях таутомеров отражается состояние атома азота: **аминного**  $N<$  - в **лактимной** и **иминного**  $-N=$  - в **лактимной** форме.

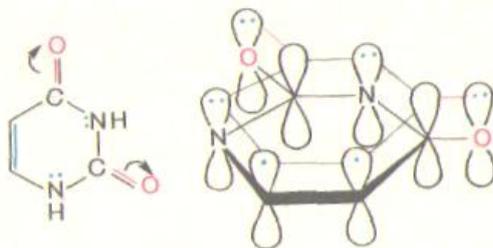


Теоретически можно предположить образование «промежуточных» таутомеров, когда гидроксильные группы вступают в таутомерные превращения поочередно»:

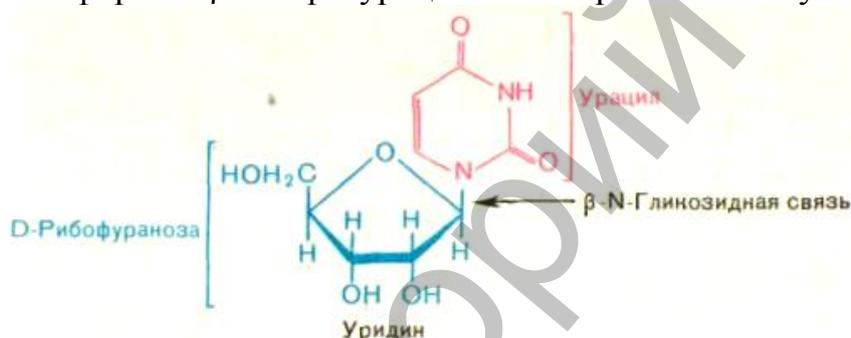


Положение равновесия между таутомерами определяется несколько большей стабильностью лактамной формы. Несмотря на то что в лактамной форме урацила в пиримидиновом цикле нет чередования одинарных и двойных связей, характерного для сопряженных систем, этот гетероцикл сохраняет ароматичность. Объясняется это тем, что все атомы цикла находятся в состоянии  $sp^2$ -гибридизации, цикл имеет плоское строение, и в нем содержится обобщенный секстет  $\pi$ -электронов (по одному  $p$ -электрону от двух атомов углерода, связанных между собой двойной связью, и две неподеленные пары электронов от атомов азота). Атомы углерода карбонильных групп

своих  $p$ -электронов в сопряжение не отдают вследствие сдвига электронной плотности  $\pi$ -связи к более электроотрицательному атому кислорода, но участвуют в передаче «через себя» общего сопряжения.



**Этап 2.** Уридин — это нуклеозид пиримидинового ряда, представляющий собой N-гликозид. В качестве углеводного компонента уридин включает D-рибозу, а в роли агликона выступает урацил. D-Рибоза (как и D-дезоксирибоза) входит в состав нуклеозидов обычно в фуранозной форме с  $\beta$ -конфигурацией аномерного атома углерода.



**Заключение.** Урацил за счет таутомерии существует в лактимной и лактамной формах. Преобладающей является лактамная форма, в которой урацил входит в состав нуклеозида уридина.

#### Задачи для самостоятельного решения

1. Напишите таутомерные превращения тимина. Какой из таутомеров преобладает в равновесной смеси?
2. Напишите возможные таутомерные формы гуанина и укажите более устойчивую форму.
3. Напишите лактим-лактамные превращения цитозина.
4. Напишите строение нуклеозида тимидина. В какой таутомерной форме находится в нем нуклеиновое основание?
5. Напишите строение цитидина и укажите в нем N-гликозидную связь.
6. Напишите строение пуринового нуклеозида дезоксиаденозина.
7. Какое отличие в составе таутомеров будет наблюдаться у минорного нуклеинового основания I-N-метилгуанина по сравнению с гуанином?

## Лабораторное занятие 12

### Тема. Нуклеотиды.

**Цель:** Сформировать знания номенклатуры, структуры, стереохимии химических свойств нуклеотидов.

*Исходный уровень. Из курса биохимии:*

1. Представление о нуклеотидах как мономер нуклеиновых кислот
2. АТФ как важнейший аккумулятор и источник энергии.

План занятия:

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Лабораторная работа

#### Изучение участия пиридиннуклеотидов в биохимических реакциях окисления-восстановления.

**Теоретическое введение.** *Пиридиннуклеотиды*, входящие в качестве коферментов в состав более чем 150 так называемых «пиридинзависимых» дегидрогеназ, играют существенную роль в реакциях окисления-восстановления (главным образом, в процессе дыхания, т. е. в процессе переноса электронов от органических субстратов к молекулярному кислороду). Спектрофотометрическое определение восстановленных пиридиннуклеотидов служит в связи с этим одним из важных методов современной энзимологии.

В основе метода лежит существенное отличие спектров окисленной и восстановленной форм кофермента. Спектр поглощения окисленной формы —  $\text{NAD}^+$  имеет максимум при 260 нм. Для восстановленной формы —  $\text{NADH}$  характерен более длинноволновый максимум поглощения — при 340 нм. Измеряя в ходе окислительно-восстановительной реакции оптическую плотность объекта при 340 нм, можно установить (зная коэффициент поглощения и длину кюветы) количество нуклеотида в пробе. С другой стороны, учитывая, что окисление-восстановление 1 мкмоль кофермента сопровождается восстановлением-окислением 1 мкмоль субстрата, этим же методом можно определить количество прореагировавшего субстрата.

Исследуемая реакция протекает по следующей схеме:



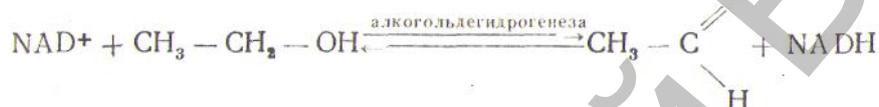
Как правило, все компоненты, кроме определяемого, присутствуют в избытке. В расчетах исходят из величины коэффициента молярной экстинкции  $\text{NADH}$ : при окислении 1 мкмоль кофермента в 1 мл смеси оптическая плотность при 340 нм в кювете толщиной 1 см меняется на 6,22 ед. Количество определяемого вещества в пробе (в мкмольях)  $M$  рассчитывается по формуле:

$$M = \frac{\Delta D_{340}}{6,22} \cdot V,$$

где  $\Delta D_{340}$  — изменение оптической плотности смеси при 340 нм;  $V$  — объем пробы (мл).

### Энзиматический метод количественного определения

Принцип метода. NAD восстанавливается в присутствии этанола и алкогольдегидрогеназы. Количество образовавшегося NADH равно исходному количеству  $NAD^+$  и определяется спектрофотометрически:



$$K_{\text{pH}} = \frac{K}{H^+} = \frac{[\text{ацетальдегид}] \times [NADH]}{[\text{спирт}] \times [NAD]}$$

$$t^{\circ} = 25^{\circ}\text{C} \begin{cases} K_7 = 10^{-4} & (\text{pH} = 7,0) \\ K_{8,8} = 10^{-2} & (\text{pH} = 8,8) \end{cases}$$

При pH = 8,8 и концентрации спирта 0,5 М можно получить практически полное восстановление  $NAD^+$ .

**Реактивы.** 1 Этанол 0,5 М, приготовленный на 0,1 М трис-буфере с pH=10,1 (молекулярная масса этанола 46,07). 2. Алкогольдегидрогеназа: растворить в 1—2 мл дистиллята 1—2 мг белка непосредственно перед использованием. В случае использования суспензии учесть, что одной ферментной единицы (см. обозначения на упаковке белка) достаточно для полного превращения 1 мкмоль субстрата в 1 мин. 3. Раствор  $NAD^+$ : 1—2 мл концентрации 1- 4 мМ; pH = 6,5 (молекулярная масса  $NAD^+$ =633).

Процедура определения. В две спектрофотометрические кюветы помещают по 0,39 мл  $H_2O$  (дистиллят); 2,5 мл раствора этанола 0,5 М на 0,1 М трис-буфере с pH—10,1 и 0,1 мл раствора NAD. В опытную кювету добавить 0,05 мл раствора алкогольдегидрогеназы, содержащего 1—2 мг белка в 1 мл.

Измеряют по точкам спектры поглощения растворов в опытной кювете и в контрольной для области 220—380 нм с шагом 5 нм. Учитывая поглощение контроля, оценивают  $\Delta D_{340}$  в опытной кювете. Рассчитывают количество NADH в растворе и количество прореагировавшего  $NAD^+$ . Последнюю величину сравнивают с исходной.

Спектры поглощения, снятые по точкам, необходимо представить в виде таблиц и графиков (ордината —  $D$ , абсцисса —  $\lambda$  в нм).

## Лабораторное занятие 13

### Тема. Нуклеиновые кислоты. Первичная структура.

**Цель:** Сформировать: 1) знания природы связей в ДНК и РНК и методов определения первичной структуры нуклеиновых кислот 2) навыки проведения ионообменной колоночной хроматографии.

*Исходный уровень. Знания из курса биохимии: первичная структура ДНК (правила Чаргаффа) и РНК.*

#### План занятия:

1. Решение ситуационных задач
2. Лабораторная работа.

### Лабораторная работа

#### **Расщепление РНК панкреатической рибонуклеазой и разделение продуктов методом ионообменной хроматографии.**

**Теоретическое введение.** РНКаза поджелудочной железы гидролизует фосфодиэфирные связи внутри молекулы одноцепочечной высокополимерной РНК. В результате образуется смесь олиго-, ди- и мононуклеотидов, которые могут быть отделены от фермента и субстрата — высокополимерной РНК — геле-хроматографией на колонке. Разделение рибонуклеотидов, различающихся по числу нуклеотидных звеньев, может быть проведено методом ионообменной хроматографии.

#### **ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ НА КОЛОНКЕ С СЕФАДЕКСОМ.**

Реактивы:

1. Натрий-ацетатный буфер — 0,1 М раствор, рН 5,0.
2. Раствор РНК — 0,5%-ный, готовят на растворе № 1.
3. РНКаза из поджелудочной железы быка (0,15—0,25 Е/мл) — 0,5—2 мкг/мл ацетатного буфера. За единицу активности принимают количество фермента, вызывающее уменьшение оптической плотности  $\Delta A_{300}$  на 1 ед. при инкубации с 0,05%-ным раствором РНК при рН 5,0 и  $t=25^{\circ}\text{C}$  в течение 1 мин.
4. NaCl — 0,05 М раствор. 5. Сефадекс G-25 или G-50.

**Ход работы.** Колонку размером 1X20 см заполняют набухшим гелем и уравнивают 0,05 М NaCl. К 1 мл раствора РНК добавляют 1 мл раствора РНКазы и оставляют на 2 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ . После инкубации смесь охлаждают и тотчас наносят на колонку. Элюирование проводят 0,05 М NaCl. Собирают фракции по 3 мл и определяют в них оптическую плотность при 260 нм. Рекомендуются также измерять поглощение при 300 нм, так как в данной области спектра находится максимум поглощения полимерной РНК. Строят график зависимости оптической плотности, от номера фракции или объема элюента.

## Лабораторное занятие 14

### Тема. Вторичная структура нуклеиновых кислот.

**Цель:** Углубить знания природы взаимодействий, стабилизирующих вторичную структуру ДНК.

*Исходный уровень.*

*Знания из курса биохимии: 1) вторичная структура ДНК, типы связей, стабилизирующих ее; типы вторичных структур; 2) таутомерные формы азотистых оснований.*

План занятия:

1. Решение ситуационных задач
2. Лабораторная работа.

#### Обучающая задача

Покажите комплементарное взаимодействие цитозина и продукта его взаимодействия с азотистой кислотой с соответствующими нуклеиновыми основаниями.

#### Решение

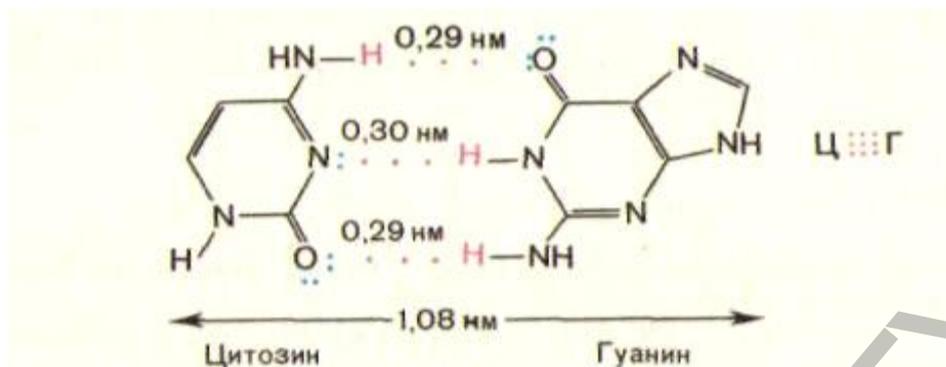
**Общий подход.** Нуклеиновые основания — это производные пиримидина и пурина, содержащие оксо- и аминогруппы. **Комплементарное взаимодействие** между двумя нуклеиновыми основаниями обусловлено образованием водородных связей: а) между атомом водорода аминогруппы одного и атомом кислорода оксогруппы другого основания, б) между неподеленной парой электронов пиридинового атома азота одного основания и атомом водорода пиррольного атома азота другого основания:



Из двух нуклеиновых оснований, образующих комплементарную пару, одно основание пиримидинового, другое — пуринового ряда.

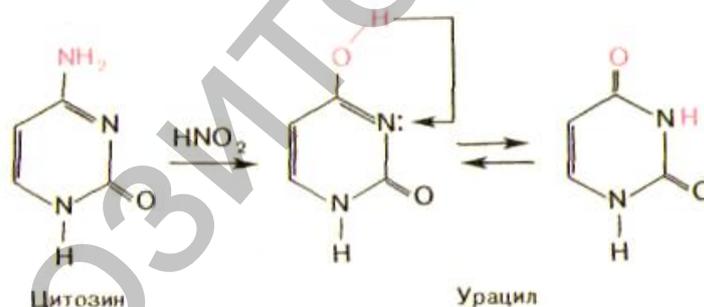
Под действием некоторых физических и химических факторов (мутагенов) в организме могут возникать мутации (от лат. mutatio — изменение), т. е. стойкие изменения наследственных признаков. К мутагенам относится, например, действие ионизирующего излучения, а также ряда химических веществ (гидроксиламин  $\text{NH}_2\text{OH}$ , азотистая кислота  $\text{HNO}_2$  и др.). Под действием мутагенов меняется строение нуклеиновых оснований, в результате чего образуются «неправильные» пары комплементарных оснований.

**Этап 1.** Пиримидиновое основание цитозин комплементарно пуриновому основанию гуанину.

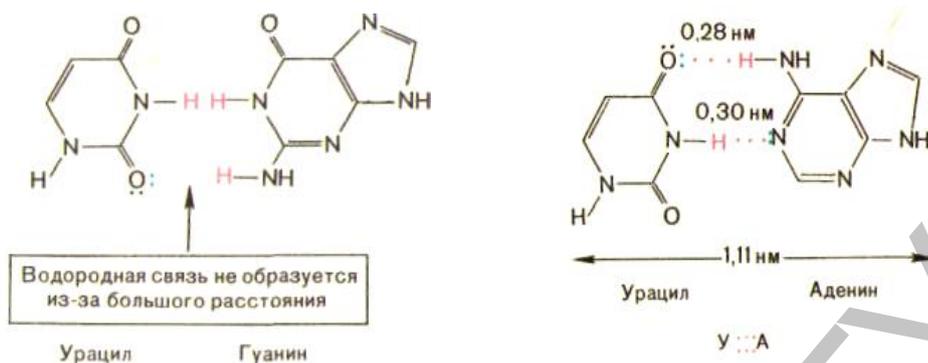


Между цитозином и гуанином образуются три водородные связи: две из них между амино- и оксогруппами, третья между атомом водорода у пиррольного атома азота в гуанине и неподеленной парой пиридинового атома азота в цитозине. Геометрически эта комплементарная пара представляет собой плоскую «площадку» протяженностью 1,08 нм. Плоская конфигурация комплементарных пар оснований позволяет им укладываться внутри спирали ДНК одна над другой подобно стопке пластинок и тем самым сохранять постоянный диаметр двойной спирали на всем ее протяжении.

**Этап 2.** Под действием азотистой кислоты аминогруппа в цитозине превращается в гидроксильную, в результате чего получается другое нуклеиновое основание — урацил.



В лактамной форме урацила отсутствует пиридиновый атом азота (по сравнению с цитозином). Урацил не способен образовывать комплементарную пару с гуанином, однако может спариваться с другим пуриновым основанием — аденином. В этом случае образуются две водородные связи: одна между амино- и оксогруппой, другая — между атомом водорода у пиррольного атома азота и неподеленной парой электронов пиридинового атома азота.



Комплементарная пара УА представляет собой плоскую «площадку» протяженностью 1,11 нм близкую по геометрическим размерам к паре ЦГ

**Заключение.** Нуклеиновое основание пиримидинового ряда — цитозин — за счет водородных связей образует комплементарную пару с нуклеиновым основанием пуринового ряда — гуанином. Под действием азотистой кислоты цитозин превращается в другое пиримидиновое основание — урацил, которое образует комплементарную пару с аденином. Пара ЦГ связана тремя водородными связями, пара УА — двумя.

#### Задачи для самостоятельного решения

1. Выберите пары комплементарных оснований из следующих гетероциклических соединений: пурин, урацил, цитозин, пиримидин, аденин, пиридин, гуанин. Напишите структурные формулы оснований, входящих в состав комплементарных пар.

2. Какое основание получается при действии азотистой кислоты на гуанин? С какими пиримидиновыми основаниями будет образовывать комплементарную пару получающееся основание?

3. Какое основание получается при взаимодействии аденина с азотистой кислотой? Для полученного соединения напишите комплементарное взаимодействие с соответствующим основанием пиримидинового ряда.

4. Какая из двух комплементарных пар — УА или ГА — входит в состав ДНК? Напишите строение этой пары.

### Лабораторная работа

#### Исследование вторичной структуры нуклеиновых кислот по спектрам поглощения комплекса с акридиновым оранжевым.

**Теоретическое введение.** Известно, что краситель акридиновый оранжевый АО обладает ярко выраженной *метахромазией*. Это свойство проявляется в том, что при образовании комплекса между высокомолекулярными соединениями и красителем изменяются оптические свойства АО. При низких концентрациях АО (до  $10^{-6}$  М) максимум спектра поглощения красителя находится при 494 нм (мономерный АО). Со спирализованными участками молекул НК (*нативная*, неповрежденная НК) акридин оранжевый образует комплекс, появле-

ние которого сопровождается смещением максимума поглощения мономеров красителя с 494 до 504 нм. На деспирализованных участках молекул НК (денатурированная НК) краситель всегда образует агрегаты, поглощающие при 474 нм. Таким образом, спектр поглощения комплекса НК—АО отражает особенности вторичной структуры молекул НК.

В данной задаче необходимо проследить спектральные изменения комплекса ДНК—АО при денатурации нагреванием.

**Ход работы.** Для анализа берут раствор ДНК в концентрации 50 мкг в 1 мл фосфатного буфера рН-6,7. Концентрированный раствор АО каплями добавляют к раствору ДНК при постоянном помешивании с таким расчетом, чтобы окончательная концентрация АО стала 210 мкг/мл. Минимальный объем раствора должен составлять 10 мл. Приготовленный раствор комплекса ДНК—АО разделить на две части, одну из которых поместить в водяную баню с 95° на 15 мин с последующим быстрым охлаждением. Измерить в 1 см прямоугольной кювете спектры поглощения чистого красителя АО (концентрация: 10 мкг в 1 мл фосфатного буфера). Затем на том же бланке измерить спектры поглощения нативного комплекса ДНК—АО и денатурированного нагреванием. По характеру спектров сделать вывод о степени поврежденности двухтяжной спирали ДНК.

## **Лабораторное занятие 15**

### **Тема. Нуклеопротеины.**

**Цель:** Сформировать знания химического строения нуклеопротеинов.

*Исходный уровень.*

*Представления из курса биохимии:*

- 1) о строении нуклеопротеинов;
- 2) о гистонах и протаминах как белковой части нуклеопротеинов;
- 3) о гетерогенности гистонов;
- 4) о кислотно-основных свойствах белков.

План занятия:

1. Изучение компьютерной информации.
2. Лабораторная работа.
3. Тестовый контроль (по темам 13-15)

### **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА**

#### **Гидролиз нуклеопротеинов дрожжей**

Для изучения химического состава нуклеопротеинов проводят кислотный гидролиз дрожжей, поскольку они очень богаты нуклеопротеинами. Специфическими реакциями для каждого вещества открывают продукты гидролиза — полипептиды, пуриновые основания, углевод и фосфорную кислоту.

Реактивы, оборудование и исследуемый материал: 1. Серная кислота, 10% раствор. 2. Едкий натр, 10% раствор. 3. Сульфат меди, 1% раствор. 4. Аммиак концентрированный, 5. Нитрат серебра, 2% раствор. 6. Молибденовый реактив. 7. Серная кислота концентрированная. 8. Тимол, 1 % раствор спиртовой. 9.  $\alpha$ -Нафтол, 0,2% спиртовой раствор. 10. Лакмус. 11. Дифениламинный реактив, 1% раствор. 12. Круглодонная колба с воздушным холодильником. 13. Воронка с фильтром. 14. Мерный цилиндр вместимостью 50 мл. 15. Дрожжи пекарские:

**Ход работы.** Помещают 2,5 г пекарских дрожжей в круглодонную колбу вместимостью 100 мл с воздушным холодильником для гидролиза, добавляют 20 мл 10% раствора серной кислоты и колбу закрывают пробкой с длинной стеклянной трубкой. Гидролиз дрожжей проводят при нагревании в течение часа с момента закипания жидкости. После охлаждения гидролизат фильтруют и с фильтратом проводят качественные реакции на составные части нуклеопротеинов.

**Биуретовая реакция на полипептиды.** К 5 каплям гидролизата приливают 10 капель 10% раствора едкого натра до отчетливой щелочной реакции (по лакмусу, опущенному в пробирку), затем 2 капли 1% раствора сульфата меди; появляется розовая или розово-фиолетовая окраска.

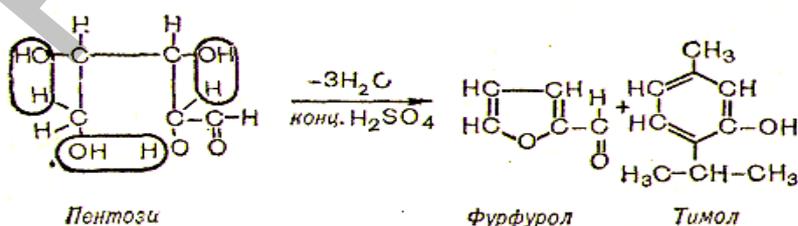
**Серебряная проба на пуриновые основания.** К 10 каплям гидролизата добавляют по каплям крепкий раствор аммиака — приблизительно 10 капель до щелочной реакции (по лакмусу, опущенному в пробирку), затем добавляют 10 капель 2% аммиачного раствора нитрата серебра. При стоянии через 3—5 мин образуется светло-коричневый осадок серебряных солей пуриновых оснований (содержимое пробирки перемешивать при стоянии не надо).

#### Качественная реакция на пентозу (Молиша).

К 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют 3 капли 1 % спиртового раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно приливают 20—30 капель концентрированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется продукт конденсации фурфурола с тимолом красного цвета.

При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз оксиметилфурфурол, которые дают с тимолом продукт конденсации

→красного цвета:



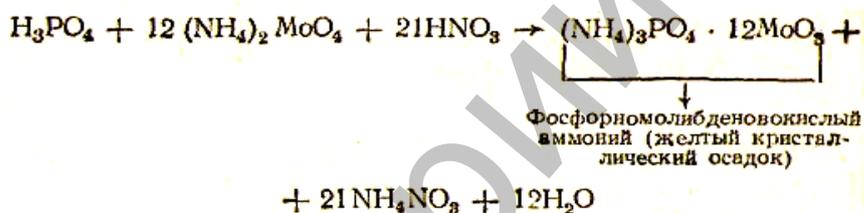
**Качественная реакция на углевод.** К 5 каплям гидролизата дрожжей приливают 3 капли 0,2% спиртового рас-

творя  $\alpha$ -нафтола и 20 капель концентрированной серной кислоты; появляется розово-фиолетовое окрашивание.

**Реакция на дезоксирибозу и рибозу.** Дифениламин с дезоксирибозой дает синее окрашивание, а с раствором рибозы — зеленое. К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 20 капель 1% раствора дифениламина и кипятят в водяной бане в течение 15 мин; при этом образуется сине-зеленое окрашивание.

**Молибденовая проба на фосфорную кислоту.** К 10 каплям гидролизата приливают 20 капель молибденового реактива и кипятят. При этом жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет (не осадок). Пробирку сразу охлаждают в струе холодной воды. На дне пробирки появляется кристаллический лимонно-желтый осадок фосфорномолибденовоокислого аммония.

Молибденовая проба на фосфорную кислоту:



## Лабораторное занятие 16

### Тема. Моносахариды.

**Цель:** Закрепить полученные в курсе органической химии знания стереохимического строения, таутомерных форм моносахаридов как основу для изучения тем «Олигосахариды», «Полисахариды».

*Исходный уровень.*

- 1) Энантиомеры.  $\sigma$ -Диастереомеры.
- 2) Относительная конфигурация. D- и L- Стереохимические ряды.
- 3) Конформация циклогексана.
- 4) Механизм реакций нуклеофильного присоединения  $A_N$  в карбонилсодержащих соединений.
- 5) Строение и свойства (гидролиз) полуацеталей и ацеталей.
- 6) Моносахариды. Номенклатура, Стереохимия и конформация. Аномерный центр: стереохимия, особые свойства гидроксильной группы.

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Обучающая задача 1

Приведите для  $\alpha$ -D-глюкопиранозы строение ее диастереомеров: аномера, энантиомера, эпимера по C-2 и эпимера по C-4.

### Решение

**Общий подход.**  $\alpha$ -D-Глюкопираноза — представитель гексоз. В молекуле гексозы содержится несколько *хиральных* центров, поэтому она существует в виде большого числа стереоизомеров.

Известно, что в простейшем случае, когда молекула содержит только один хиральный центр (глицериновый альдегид, молочная кислота), она существует в виде пары *энантиомеров*, относящихся друг к другу как несовместимые в пространстве предмет и его зеркальное изображение.

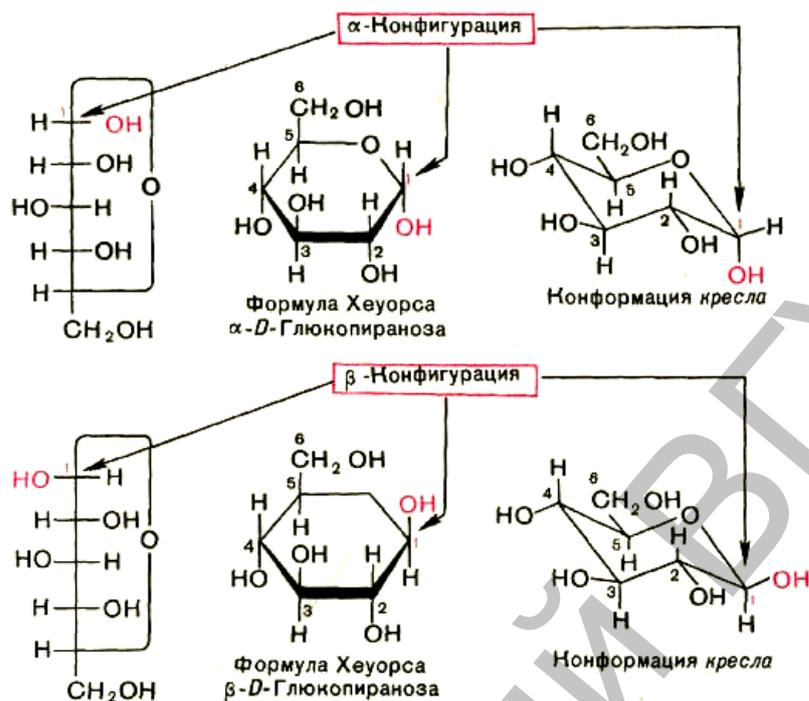
При наличии в молекуле двух хиральных центров появляется возможность существования *диастереомеров*, различающихся конфигурацией одного хирального центра. По мере возрастания в молекуле числа хиральных центров увеличивается общее число диастереомеров с различной конфигурацией одного или нескольких хиральных центров.

В химии моносахаридов диастереомеры, различающиеся конфигурацией только одного углеродного атома, называются *эпимерами*. При этом, если речь идет о различии в конфигурации *гликозидного (аномерного)* атома углерода, то тогда диастереомеры называются *аномерами*. У альдоз таким углеродным атомом является C-1, у кетоз — C-2. Аномеры являются частным случаем эпимеров.

**Этап 1.** Из приведенного в условии задачи названия соединения видно, что молекула D-глюкозы находится в шестичленной циклической (пиранозной) форме в виде  *$\alpha$ -аномера*.

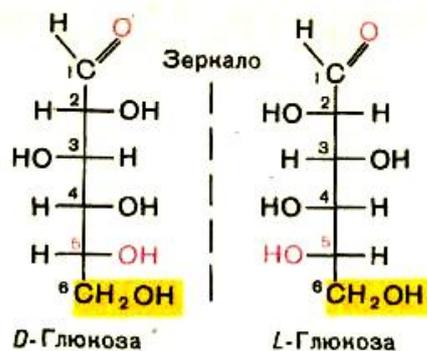
В  $\alpha$ -аномере D-глюкопиранозы атом углерода C-1 имеет конфигурацию, совпадающую с конфигурацией ее «концевого» хирального центра C-5, т. е. атома, определяющего принадлежность к стереохимическому ряду. При различных способах написания стереохимических формул углеводов конфигурация C-1 в  $\alpha$ -аномере изображается таким образом, что *полуацетальная* гидроксильная группа в формуле Колли—Толленса располагается справа от линии углеродной цепи, в формуле Хеурса—под плоскостью пиранозного цикла, в конформационной формуле занимает аксиальное положение.

Другой аномер D-глюкопиранозы ( $\beta$ -аномер) отличается от рассмотренного  $\alpha$ -аномера противоположной конфигурацией хирального атома углерода C-1. Соответственно полуацетальная гидроксильная группа у  $\beta$ -аномера располагается слева от линии углеродной цепи в формуле Колли—Толленса, над плоскостью пиранозного цикла—в формуле Хеурса и занимает экваториальное положение в конформационной формуле.



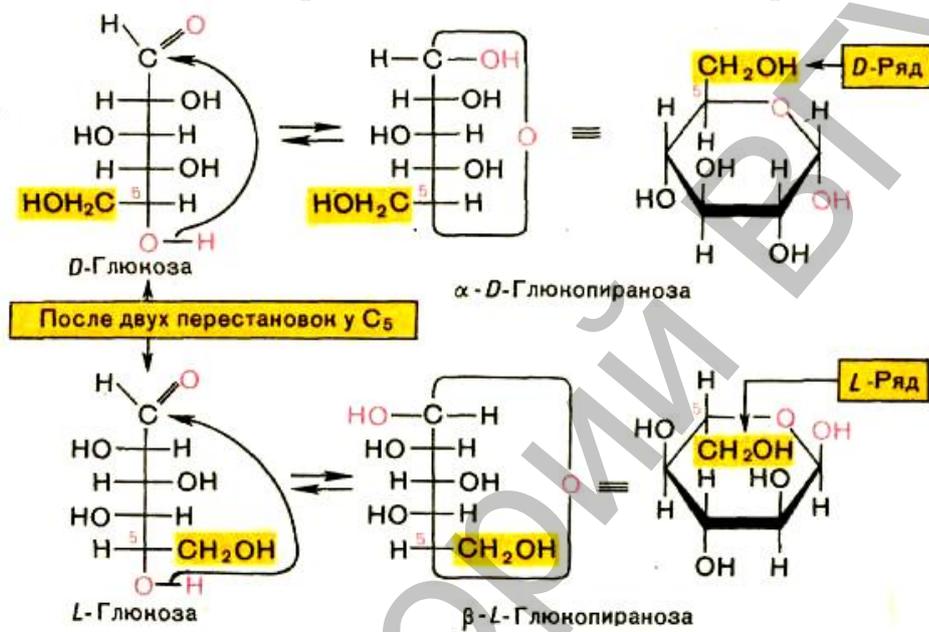
**Этап 2.**  $\alpha$ -D-Глюкопираноза является одним из двух энантиомеров, а именно энантиомером, относящимся к D-стереохимическому ряду. Принадлежность к D-ряду означает, что конфигурация наиболее удаленного от оксогруппы асимметрического (хирального) атома углерода совпадает с конфигурацией хирального центра D-глицеринового альдегида.

Другой энантиомер представляет собой зеркальное изображение молекулы  $\alpha$ -D-глюкопиранозы и относится к L-стереохимическому ряду. У L-глюкозы конфигурация хиральных атомов C-2, C-3, C-4, C-5 противоположна конфигурации этих атомов у D-глюкозы. Запишем строение энантиомеров глюкозы и в открытой форме.

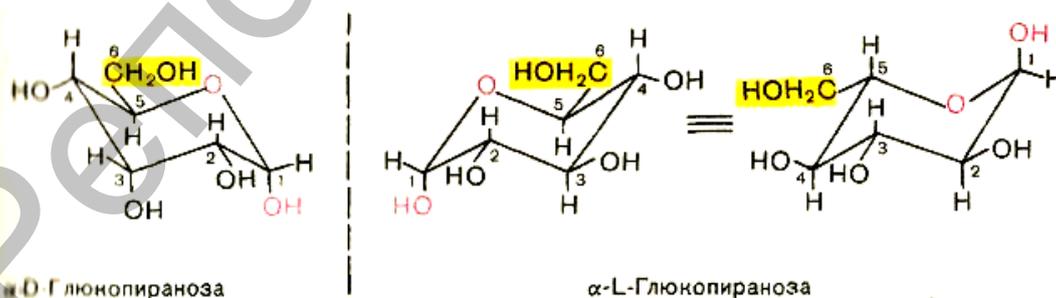


В циклической (пиранозной) форме у того и другого энантиомера возникает дополнительный центр хиральности — аномерный атом углерода C-1. Тогда  $\alpha$ -аномеру D-глюкопиранозы будет соответствовать энантиомер L-ряда, имеющий противоположную конфигурацию всех центров хиральности, включая C-1. Исходя из этого условия, полуацетальная OH-группа энантиомера L-ряда должна располагаться в

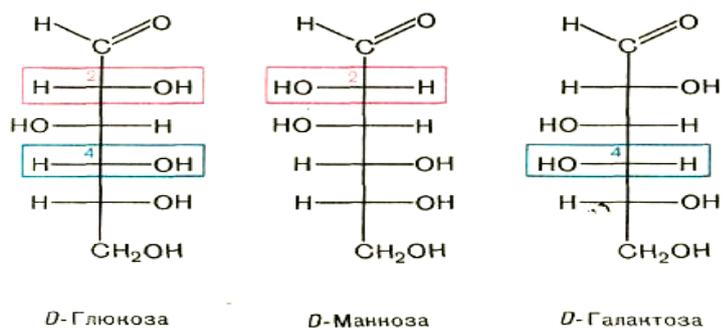
формуле Колли—Толленса слева от линии углеродной цепи, а в формуле Хеуорса—над плоскостью пиранозного цикла. В этом случае конфигурация аномерного атома углерода С-1 в молекуле L-глюкопиранозы совпадает с конфигурацией ее хирального центра С-5, определяющего принадлежность к стереохимическому ряду, т. е. энантиомер находится в α-форме. Следовательно, энантиомером по отношению к α-D-глюкопиранозе является α-L-глюкопираноза.



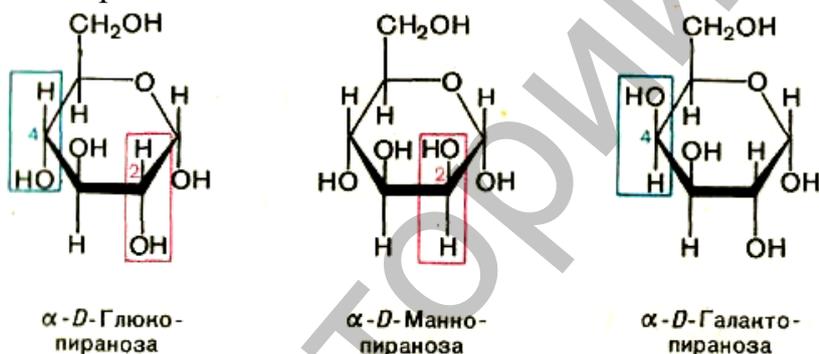
В конформации *кресла* α-D-глюкопиранозы все гидроксильные группы, кроме полуацетальной, занимают экваториальное положение. У α-L-глюкопиранозы в конформации кресла пиранозный цикл представляет собой зеркальное изображение пиранозного цикла α-D-глюкопиранозы, а все гидроксильные группы имеют такое же расположение, как в α-D-глюкопиранозе. Этот «зеркальный» цикл может быть записан общепринятым способом.



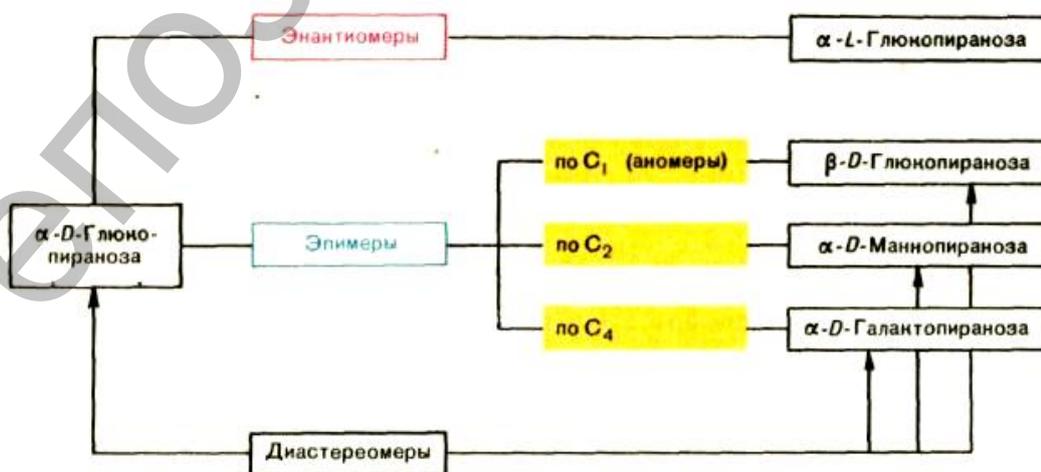
**Этап 3.** Эпимером D-глюкозы, отличающимся от нее конфигурацией С-2, является D-манноза, а эпимером, отличающимся конфигурацией С-4 — D-галактоза.



Исходя из того, что эпимеры различаются конфигурацией только одного хирального атома углерода, *D*-манноза и *D*-галактоза в циклической форме должны отличаться от *D*-глюкозы конфигурацией С-2 и С-4 соответственно, а конфигурация возникающего при циклизации хирального атома углерода С-1 должна быть одинаковой у всех трех эпимеров. Таким образом, по отношению к  $\alpha$ -*D*-глюкопиранозе эпимером по С-2 является  $\alpha$ -*D*-маннопираноза, а эпимером по С-4 —  $\alpha$ -*D*-галактопираноза.



**Заключение.** Соотношение между приведенными выше стереоизомерами  $\alpha$ -*D*-глюкопиранозы можно представить в виде следующей схемы:



### Задачи для самостоятельного решения

1.1. Напишите строение энантимеров рибозы, ксилозы, галактозы. По конфигурации какого хирального центра производится отнесение энантимеров к D- или L-стереохимическим рядам?

1.2. Напишите строение  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров D-рибофуранозы и D-маннопиранозы.

1.3. Напишите строение эпимера, отличающегося от D-галактозы конфигурацией хирального атома углерода C-3. Как называется этот моносахарид?

1.4. Приведите строение диастереомера, отличающегося от D-глюкозы конфигурацией двух хиральных атомов — C-3 и C-4. Как называется этот моносахарид?

1.5. Напишите конформационное строение  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеров D-маннозы в пиранозной форме.

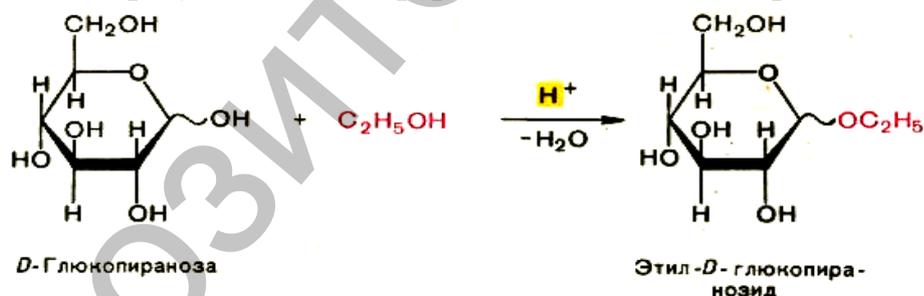
### Обучающая задача 2

Какие продукты образуются при взаимодействии  $\beta$ -D-глюкопиранозы с этанолом в присутствии кислотного катализатора в безводной среде?

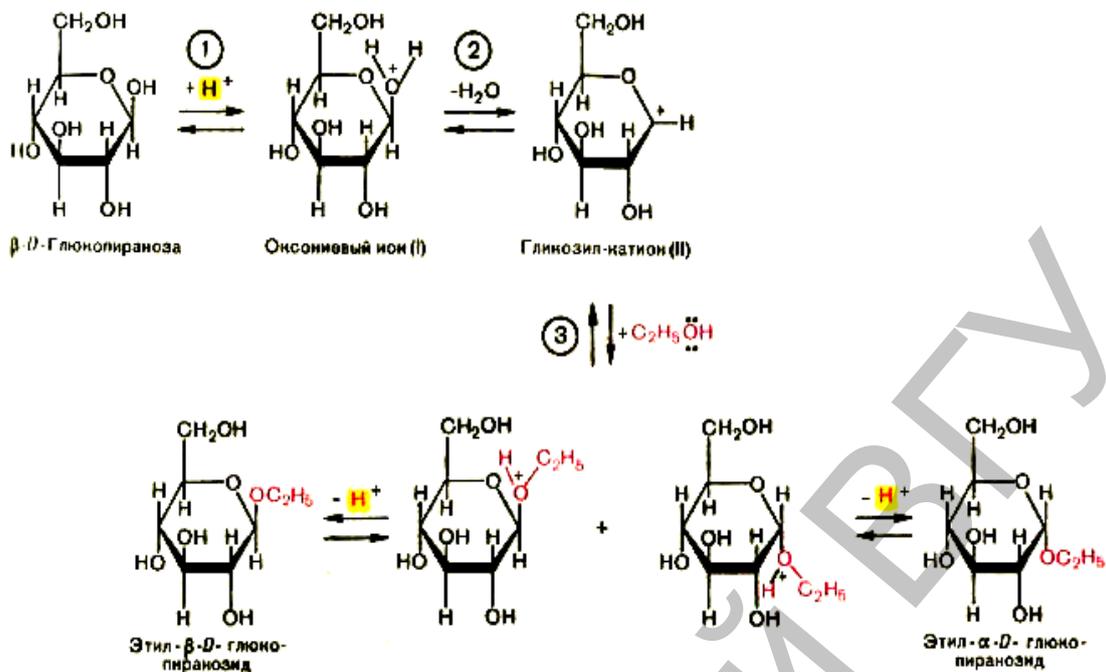
#### Решение

Общий подход. Моносахариды, являющиеся циклическими *полуацетальми*, взаимодействуют со спиртами в присутствии кислотных катализаторов с образованием циклических *ацеталей* (гликозидов).  $\beta$ -D-Глюкопираноза в растворе существует в виде смеси таутомеров (пиранозные и фуранозные формы;  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеры). Из двух видов циклических форм преобладает пиранозная форма.

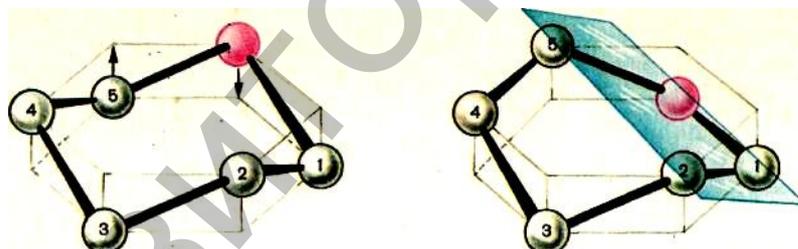
Поскольку  $\beta$ -D-глюкопираноза в растворе подвергается *аномеризации*, то в результате взаимодействия ее с этиловым спиртом одновременно образуются  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы этил-D-глюкопиранозидов.



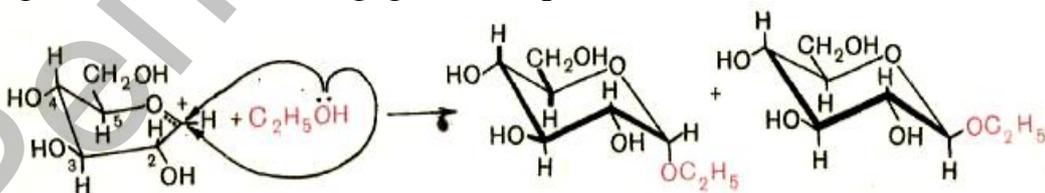
Первоначальным актом взаимодействия  $\beta$ -D-глюкопиранозы с этиловым спиртом является протонирование катализатором атома кислорода полуацетальной гидроксильной группы (1-я стадия). Образующийся оксониевый ион I стабилизируется путем отщепления молекулы воды и превращения в гликозил-катион II (2-я стадия), в котором положительный заряд более делокализован, чем в оксониевом ионе I. Поскольку атом C-1 в гликозил-катионе II находится в состоянии  $sp^2$ -гибридизации, то дальнейшая атака этого атома нуклеофилом (молекула спирта) (3-я стадия) равновероятна с обеих сторон плоскости его расположения, что приводит к двум продуктам реакции — этил- $\alpha$ -O-глюкопиранозиду и этил- $\beta$ -O-глюкопиранозиду:



Однако эти два гликозида образуются не в равном соотношении, что может быть объяснено с позиций конформационных представлений. Пиранозный цикл в гликозил-катионе II имеет конформацию *полукресла*, в которой шестичленное кольцо уплощается: четыре из шести атомов цикла, а именно C-1, C-2, C-5 и атом кислорода, оказываются в одной плоскости.



Наличие плоского участка в конформации полукресла определяет нуклеофильную атаку *гликозил-катиона* II молекулой этилового спирта с двух сторон плоскости. Образуемые  $\alpha$ - и  $\beta$ -формы этилглюкопиранозида имеют конформацию *кресла*.



При этом преимущественно образуется более устойчивый этил- $\alpha$ -D-глюкопиранозид. Меньшая устойчивость этил- $\beta$ -D-глюкопиранозида связана с наличием *аномерного эффекта*.

Стабильностью  $\alpha$ -аномерных форм гликозидов объясняется широкое распространение  $\alpha$ -гликозидных связей в таких полисахаридах, как растительный крахмал, животный крахмал (гликоген), декстраны.

**Заключение.** При взаимодействии  $\beta$ -D-глюкопиранозы с этанолом в безводной кислой среде образуется смесь этил- $\alpha$ -D-глюкопиранозиды и этил- $\beta$ -D-глюкопиранозиды с преобладанием  $\alpha$ -аномера.

### Задачи для самостоятельного решения

2.1. Какие продукты образуются при взаимодействии  $\alpha$ -D-глюкопиранозы с метанолом в безводной кислой среде? Напишите схему реакции с помощью формул Хеурса и конформационных формул.

2.2. Какие продукты образуются при действии этанолом на  $\alpha$ -D-галактопиранозу в присутствии кислотного катализатора в безводной среде? Напишите схему реакции с помощью формул Хеурса и конформационных формул.

2.3. Почему при взаимодействии  $\beta$ -D-галактопиранозы с метанолом в безводной кислой среде преимущественно образуется  $\alpha$ -гликозид? Напишите схему реакции с использованием формул Хеурса и конформационных формул.

2.4. Напишите реакцию получения этил- $\alpha$ -D-маннопиранозиды. Можно ли в качестве исходного моносахарида использовать  $\beta$ -D-маннопиранозу?

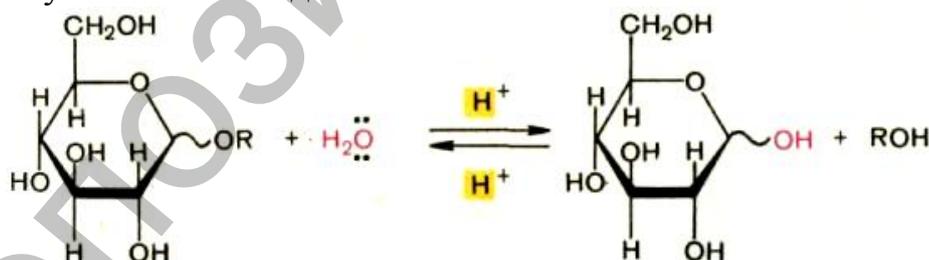
2.5. Напишите реакцию получения этил- $\beta$ -D-рибофуранозиды.

### Обучающая задача 3

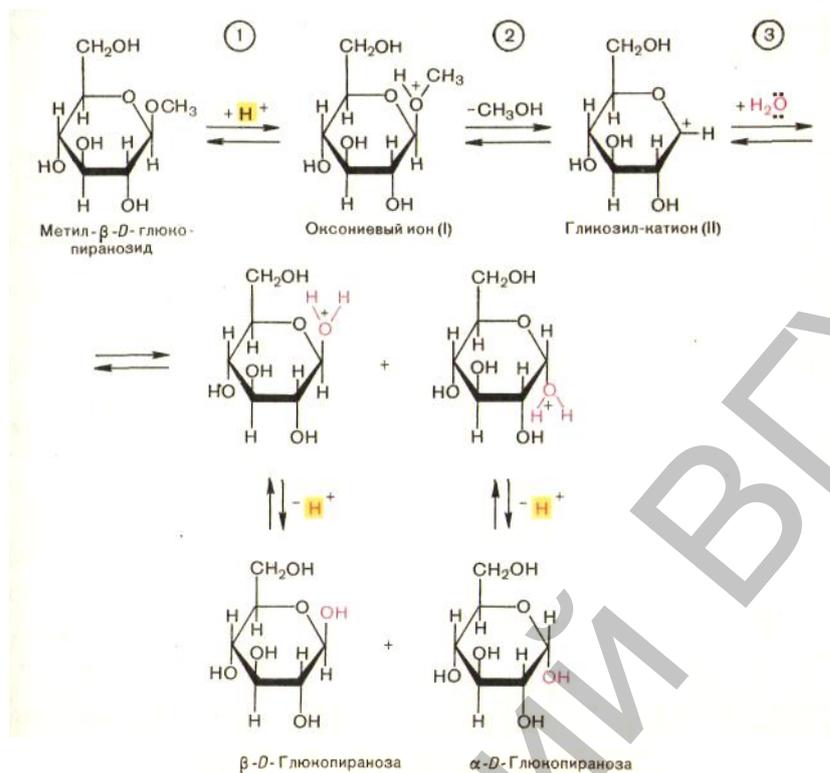
Какие продукты образуются при кислотном гидролизе метил- $\beta$ -D-глюкопиранозиды, метил-2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкопиранозиды и метил-2-амино-2-дезоксид- $\beta$ -D-глюкопиранозиды. Сравните устойчивость этих гликозидов к гидролизу.

### Решение

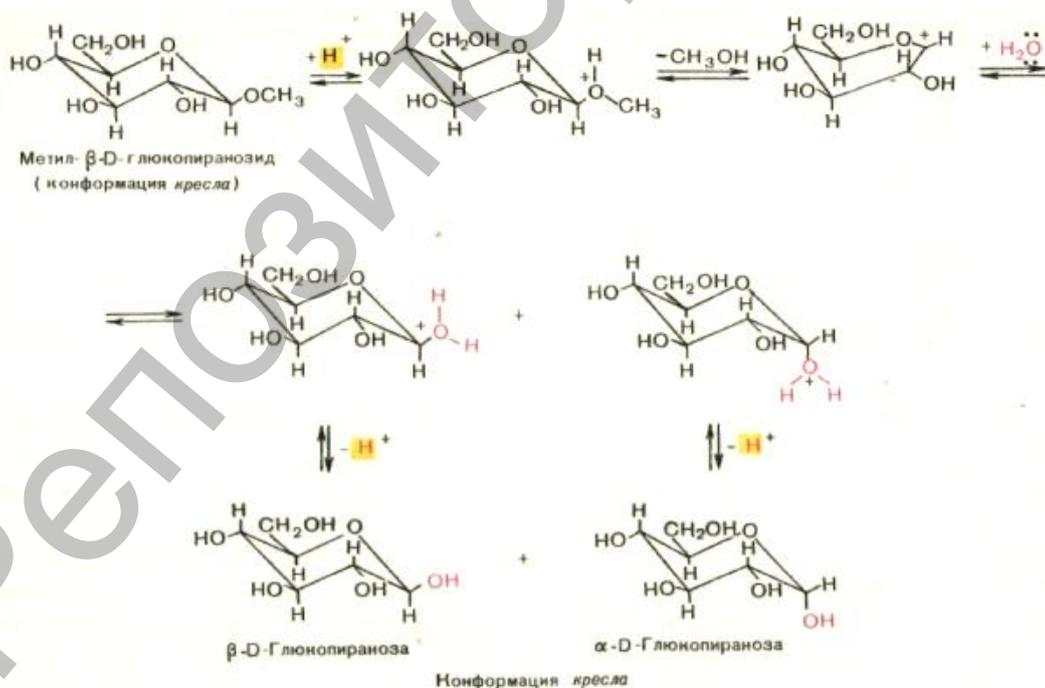
**Общий подход.** Гидролиз в кислой среде является наиболее важной реакцией гликозидов. Гидролиз протекает с образованием спирта и моносахарида и представляет собой реакцию, обратную реакции получения гликозидов.



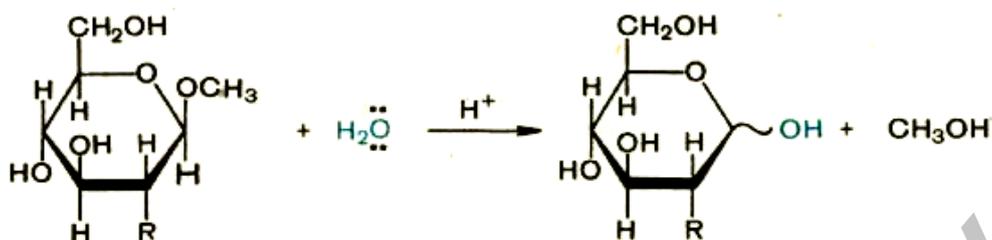
**Этап 1.** Гидролиз метил- $\beta$ -D-глюкопиранозиды начинается с протонирования катализатором гликозидного атома кислорода с образованием оксониевого иона I (1-я стадия). Оксониевый ион I, отщепляя молекулу метилового спирта (2-я стадия), превращается в гликозил-катион II, стабилизированный за счет делокализации положительного заряда. Гликозил-катион II, имеющий атом C-1 в состоянии  $sp^2$ -гибридизации, быстро взаимодействует с нуклеофилом (молекулой воды) (3-я стадия). При этом нуклеофильная атака равновероятна с обеих сторон плоскости расположения тригонального атома C-1. В результате образуются  $\alpha$ - и  $\beta$ -аномеры D-глюкопиранозы:



Процесс гидролиза метил-β-D-глюкопиранозид с привлечением конформационных представлений может быть записан в следующем виде:



**Этап 2.** При гидролитическом расщеплении β-метилгликозидов 2-дезоксид-D-глюкопиранозы и 2-амино-2-дезоксид-D-глюкопиранозы (D-глюкозамин) получаются метанол и соответствующие моносахариды:



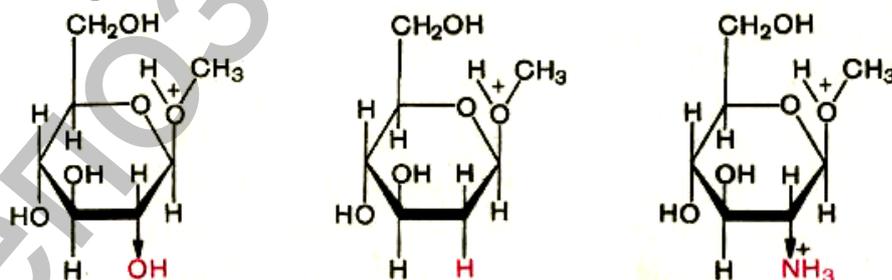
Механизм реакции гидролиза аналогичен рассмотренному в этапе 1.

**Этап 3.** Скорость реакции гидролиза зависит от строения, конфигурации и конформации углеводного остатка, природы *агликона*, кислотности среды и температуры.

Рассматриваемые в настоящей задаче моносахариды различаются характером замещения у С-2. В этом случае особенно заметен индуктивный эффект заместителей в связи с их близким расположением к *гликозидному центру*.

Отрицательный индуктивный эффект ОН-группы у С-2 в метил-β-D-глюкопиранозиде приводит к понижению электронной плотности на гликозидном центре и дестабилизирует образовавшийся оксониевый ион. В связи с отсутствием гидроксильной группы у С-2 в метил-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозиде образующийся оксониевый ион обладает большей стабильностью. Это приводит к заметному повышению скорости кислотного гидролиза 2-дезоксисахаров.

Метил-2-амино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозид (метилгликозид 2-D-глюкозамина), напротив, устойчив к гидролизу, так как аминогруппа в условиях кислотного катализа протонируется в первую очередь, что затрудняет протонирование атома кислорода гликозидной группы, т. е. образование оксониевого иона.



Отношение гликозидов D-глюкопиранозы и ее 2-деокси- и 2-аминопроизводных к гидролитическому расщеплению является одним из факторов, определяющих степень устойчивости макромолекул биополимеров (полисахариды, нуклеиновые кислоты).

**Заключение.** Гликозиды в результате кислотного гидролиза образуют спирт и моносахарид. Устойчивость к гидролизу метилгликозидов 2-дезоксид-D-глюкопиранозы, D-глюкопиранозы и D-глюкозамина возрастает в перечисленном порядке.

### Задачи для самостоятельного решения

3.1. Напишите реакцию гидролиза этил- $\alpha$ -D-глюкопиранозиды в кислой среде. К какому результату будет приводить существование гликозил-катиона в конформации полукресла?

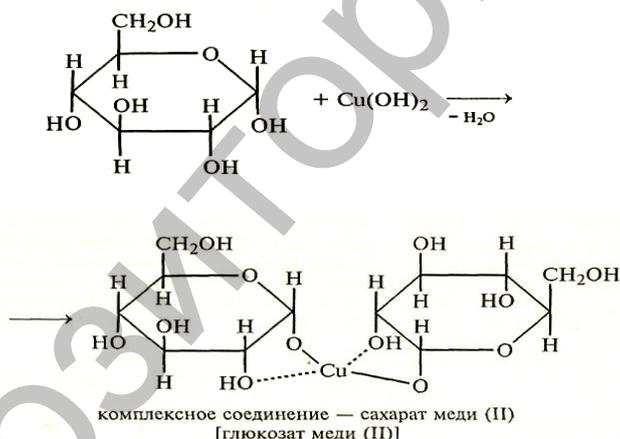
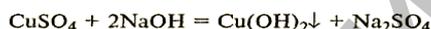
3.2. Напишите реакцию гидролиза метил- $\alpha$ -D-галактопиранозиды, используя формулы Хеурса и конформационные формулы. Объясните возможность образования двух аномерных форм D-галактопиранозы.

3.3. Какой из двух гликозидов—этил-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопиранозид или этил-2-амино-2-дезоксид- $\alpha$ -D-галактопиранозид будет гидролизироваться быстрее?

### Лабораторная работа

#### Опыт 1. Доказательство наличия гидроксильных групп в моносахаридах. (Образование сахара меди (II)).

В пробирке смешивают 1 мл 1%-ного раствора глюкозы и 0,5 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия. Затем по каплям добавляют 5%-ный раствор сульфата меди. Образующийся вначале голубой осадок гидроксида меди (II) при встряхивании растворяется, и получается синий прозрачный раствор сахара меди:



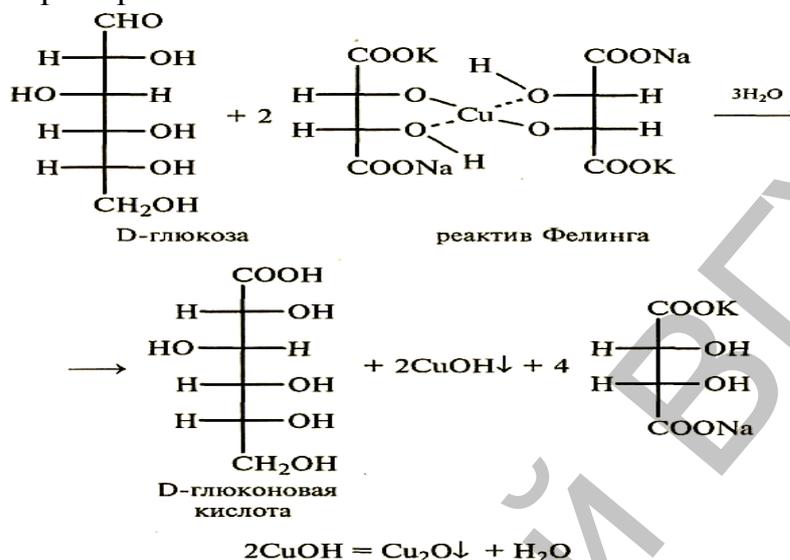
Эта реакция доказывает присутствие в молекуле глюкозы нескольких гидроксильных групп и является качественной реакцией, характерной для многоатомных спиртов.

#### Опыт 2. Окисление моносахаридов реактивом Фелинга

Реактивом Фелинга легко окисляются как альдозы, так и кетозы. Следует отметить, что в реакцию окисления с данным реактивом вступают не сами кетозы, а продукты их щелочной деструкции в присутствии окислителя.

В две пробирки наливают по 1 мл 1%-ного раствора глюкозы и 1%-ного раствора фруктозы. В каждую из них добавляют по 1 мл реактива Фелинга. Содержимое пробирок тщательно перемешивают и нагревают верхнюю часть раствора до начинающегося кипения. В обоих случаях

в верхней части жидкости появляется желтый осадок гидроксида меди (I), переходящий в красно-оранжевый осадок оксида меди (I). Цвет нижней части пробирок не изменяется.



Реактивом Фелинга пользоваться удобнее, чем гидроксидом меди (II), так как при нагревании этого реактива с раствором моносахарида не происходит образование черного осадка оксида меди (II), маскирующего красно-оранжевый цвет осадка оксида меди (I). Реакция с *фелинговой жидкостью* протекает быстрее, поэтому ее широко используют для качественного и количественного определения моносахаридов.

### Вопросы для защиты лабораторной работы

1. Конфигурация какого хирального атома определяет принадлежность моносахаридов к D- или L-стереохимическим рядам? Дайте определение аномеров и эпимеров и напишите конформационные формулы  $\alpha$ - и  $\beta$ -D-глюкопиранозы,  $\alpha$ - и  $\beta$ -D-галактопиранозы,  $\alpha$ - и  $\beta$ -D-маннопиранозы.
2. Какие структурные фрагменты, содержащиеся в молекуле глюкозы, обнаруживаются реакцией с реактивом Фелинга?
3. Чем объясняется наличие восстанавливающих свойств у глюкозы?
4. Объясните причину появления в опыте 2 в верхней части пробирки желтого осадка, переходящего в красно-оранжевый осадок.

## Лабораторное занятие 17

### Тема. Дисахариды. Методы изучения строения.

**Цель:** Сформировать знания химических методов изучения строения дисахаридов как простейших представителей олигосахаридов.

*Исходный уровень.*

- 1) Таутомерия и конформации моносахаридов.
- 2) Восстанавливающие свойства альдокетоз
- 3) Строение восстанавливающих и невосстанавливающих дисахаридов (сахароза, лактоза, мальтоза, целлобиоза).

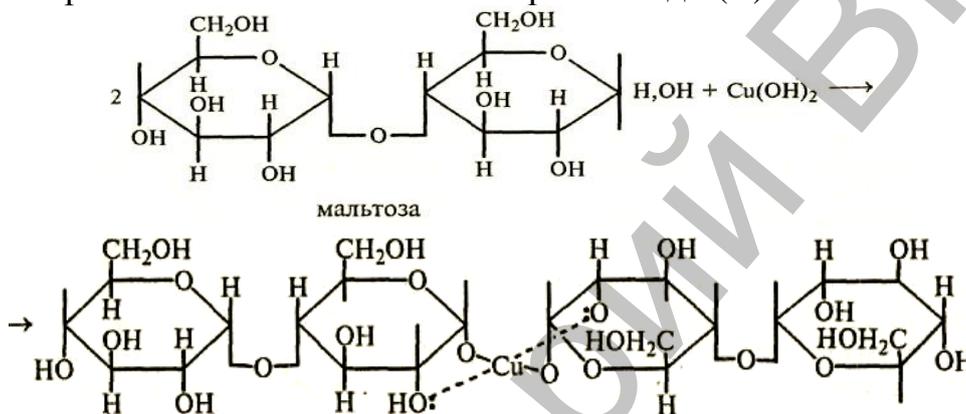
#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

## Лабораторная работа

### Опыт 1. Доказательство наличия гидроксильных групп в дисахаридах.

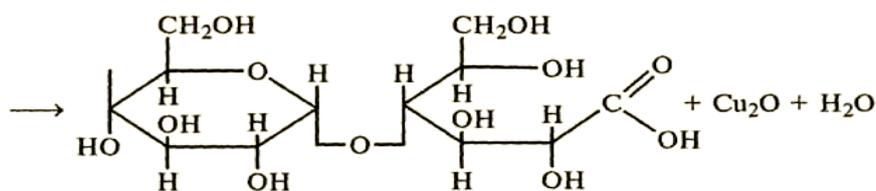
В одну пробирку наливают 1 мл 1%-ного раствора сахарозы, а в другую — 1 мл 1%-ного раствора мальтозы (или лактозы). В каждую из них добавляют по 1 мл 10%-ного раствора гидроксида натрия. Растворы перемешивают, и в обе пробирки по каплям добавляют 5%-ный раствор сульфата меди (II). В обеих пробирках образуется бледно-голубой осадок гидроксида меди (II), который после встряхивания растворяется, и растворы приобретают светло-синюю окраску вследствие образования комплексных сахаратов меди (II):



### Опыт 2. Сравнение свойств восстанавливающих и невосстанавливающих дисахаридов

**Окисление дисахаридов реактивом Фелинга.** В три пробирки наливают по 1,5 мл 1%-ных растворов мальтозы, лактозы и сахарозы. В каждую пробирку добавляют по 1,5 мл реактива Фелинга, жидкости перемешивают и нагревают верхнюю часть растворов на газовой горелке до начинающегося кипения. В пробирках с мальтозой и лактозой появляются оранжево-красные осадки оксида меди (I). Схема реакции окисления мальтозы реактивом Фелинга:





мальтобионовая кислота

Положительную реакцию с фелинговой жидкостью дают восстанавливающие дисахариды (мальтоза и лактоза), в водных растворах которых вследствие таутомерных переходов имеются свободные альдегидные группы. Раствор, содержащий сахарозу, при нагревании до начинающегося кипения не изменяет своей окраски, так как сахароза относится к невосстанавливающим дисахаридам и не окисляется реактивом Фелинга.

Следует помнить, что длительное кипячение раствора сахарозы в щелочной среде приводит к ее расщеплению, и продукты гидролиза могут восстанавливать реактив Фелинга до оксида меди (I).

Напишите уравнение реакции окисления лактозы реактивом Фелинга.

#### Вопросы для защиты лабораторной работы

1. Напишите строение сахарозы (с помощью формул Хеурса). Какую конфигурацию имеют аномерные атомы углерода в остатках D-фруктозы и D-глюкозы, входящих в состав молекулы сахарозы?
2. Почему сахароза не способна к цикло-оксо таутомерии?
3. Объясните причину отсутствия восстанавливающих свойств у сахарозы.
4. Будет ли мутаротировать свежеприготовленный водный раствор сахарозы?
5. Почему свободная D-глюкоза дает положительную пробу Троммера, а D-глюкозный остаток в сахарозе этой пробы не дает?
6. Напишите строение лактозы (с помощью формул Хеурса). Какую конфигурацию имеет аномерный атом углерода в остатке D-галактопиранозы?
7. Какой из моносахаридных остатков в молекуле лактозы способен к цикло-оксо таутомерии?
8. Объясните причину наличия восстанавливающих свойств у лактозы?
9. Напишите конформационное строение мальтозы и целлобиозы.

## Лабораторное занятие 18

### Тема. Олигосахариды

**Цель:** сформировать знания химических методов изучения строения олигосахаридов.

*Исходный уровень. Тема 18*

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Тестовый контроль (по темам 16 -18).

## Лабораторное занятие 19

### Тема. Полисахариды. Методы изучения строения.

**Цель:** сформировать знания химических методов изучения строения полисахаридов.

*Исходный уровень.*

Из курса органической химии:

- 1) *Стереохимическое строение, структурная организация важнейших гомо- и гетерополисахаридов.*
- 2) *Химические свойства полисахаридов.*

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Лабораторная работа

#### **Опыт 1. Реакция гликогена и крахмала с иодом.**

*Реактивы и оборудование:* 1%-ный раствор крахмала, 1%-ный раствор гликогена, сильно разбавленный раствор иода в иодиде калия; пробирки.

В две пробирки наливают по 1 мл раствора крахмала и раствора гликогена и добавляют в каждую по несколько капель раствора иода. В пробирке с раствором крахмала развивается интенсивное синее окрашивание. При нагревании этого раствора до кипения синяя окраска исчезает, а при охлаждении появляется вновь. Гликоген с раствором иода дает красно-бурое окрашивание.

Реакция крахмала и гликогена с иодом представляет собой сложный процесс. Синюю окраску с иодом дает амилоза — одна из фракций крахмала. Амилоза — полисахарид линейного строения, состоящий из остатков  $\alpha$ , D-глюкопиранозы. Ее молекулы имеют структуру спирали, внутри которой есть свободный канал диаметром около 5 мкм, в него внедряются молекулы иода, образуя окрашенные комплексы («соединения включения») за счет взаимодействия с гидроксильными группами моносахаридных остатков. При нагревании молекулы амилозы теряют свою спиралевидную структуру, и окрашенные комплексы разрушаются. При охлаждении спиралевидная структура амилозы и, следовательно, окрашенные комплексы восстанавливаются.

Для полисахаридов с разветвленными цепями (амилопектин и гликоген) наряду с процессами образования комплексов большое значение имеет процесс адсорбции иода на поверхности боковых цепей. Если боковые цепи в молекуле гликогена короткие, то развивается бурая окраска, если они длинные, то темно-красная.

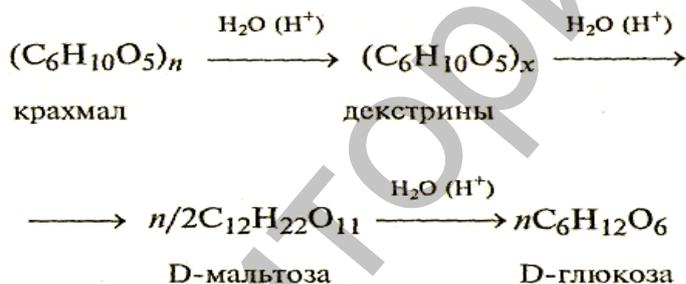
#### **Опыт 2. Гидролиз крахмала**

*Реактивы и оборудование:* 1%-ный раствор крахмала, 10%-ный раствор серной кислоты, разбавленный раствор иода в иодиде калия, 10%-ный раствор гидроксида натрия,

реактив Фелинга, универсальная индикаторная бумага; конические колбы на 100 мл, пипетки, мерные цилиндры на 50 и 10 мл, пробирки.

В коническую колбу на 100 мл вносят 20—30 мл 1%-ного раствора крахмала и 5—7 мл 10%-ного раствора серной кислоты. В 8 пробирок наливают по 1 мл очень разбавленного раствора иода в иодиде калия (светло-желтого цвета), пробирки ставят в штатив. В первую пробирку вносят 1 каплю подготовленного для опыта раствора крахмала. Отмечают образовавшуюся окраску. Затем колбу с реакционной смесью нагревают на асбестовой сетке над небольшим пламенем. Через каждые 2—3 мин отбирают пипеткой пробы раствора и вносят в пробирки с раствором иода. Отмечают постепенное изменение окраски растворов при реакции с иодом. Вначале окраска раствора будет интенсивно синей, затем фиолетовой (*амилодекстрины*), далее — от красно-бурой (*эритродекстрины*) до оранжево-желтой и, наконец, желтой (в дальнейшем эта окраска изменяться не будет). Декстрины расщепляются до дисахарида мальтозы, которая гидролизуется с образованием конечного продукта — D-глюкозы.

Схема гидролиза крахмала:



После того как реакционная смесь перестанет давать окраску с иодом, ее кипятят еще несколько минут, охлаждают и нейтрализуют 10%-ным раствором гидроксида натрия (контроль по универсальной индикаторной бумаге). Отливают в пробирку 1—2 мл гидролизата и добавляют равный объем реактива Фелинга. Верхнюю часть жидкости нагревают на пламени горелки до начинающегося кипения. Выпадает красный осадок оксида меди (I), что свидетельствует о наличии в растворе продуктов глубокого гидролиза крахмала — глюкозы и мальтозы. Напишите уравнения реакций окисления продуктов гидролиза крахмала фелинговой жидкостью.

#### Вопросы для защиты лабораторной работы

1. Какой дисахарид является структурной единицей амилозы? Какой тип гликозидной связи осуществляется в этом дисахариде между остатками D-глюкозы?
2. Какую конформацию имеет полисахаридная цепь амилозы?
3. Чем объясняется образование окрашенного комплекса амилозы с иодом (соединение включения)?
4. Напишите реакцию гидролиза мальтозы, являющейся структурной единицей крахмала. В какой среде происходит эта реакция? Какой моносахарид полу-

- чается в результате полного гидролиза крахмала?
5. Как связано конформационное строение цепи с пространственной структурой? Покажите на примере амилозы и целлюлозы.
  6. Какие полисахариды называются гетерополисахаридами? Назовите компоненты, входящие в состав гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфатов, гепарина. Укажите виды связей между моносахаридными звеньями этих гетерополисахаридов.

## Лабораторное занятие 20

### Тема. Растительные полисахариды.

**Цель:** Углубить знания химического строения растительных полисахаридов во взаимосвязи с их биологической ролью.

*Исходный уровень.*

- 1) *Из курса органической химии - знания строения номенклатуры и химических свойств целлюлозы и крахмала.*
- 2) *Из курса биохимии - знания энергетической функции крахмала, механизма переваривания крахмала.*
- 3) *Из курса ботаники - представления о структурной функции крахмала и целлюлозы в растениях.*

План занятия:

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

### Открытие крахмала в зеленых растениях

Крахмал может быть обнаружен только в зеленых листьях растений; в пожелтевших листьях вследствие отсутствия в них хлорофилла синтеза крахмала не происходит.

**Ход работы.** В 2 пронумерованные пробирки помещают: в первую — зеленый листик растения, во вторую — пожелтевший. В обе пробирки наливают по 1—2 мл дистиллированной воды, и содержимое кипятят 2—3 минуты. Горячую воду сливают и в каждую пробирку наливают по 1 мл этилового спирта. Пробирки помещают в кипящую водяную баню на 3—5 минут и ежеминутно встряхивают. Хлорофилл зеленого листа и ксантофилл желтого листа переходят в спирт и листья обесцвечиваются. Окрашенный спирт сливают в склянку с надписью «хлорофилл», а почти бесцветные листья заливают в тех же пробирках новыми порциями спирта и нагревают еще раз в течение 3—5 минут. Спирт сливают, а листочки промывают несколько раз дистиллированной водой. Затем в каждую пробирку наливают 3—4 мл дистиллированной воды и пробирки помещают в кипящую водяную баню для размягчения тканей листа. Через 5—10 минут воду сливают,

листочки помещают на пронумерованные кусочки фильтровальной бумаги. На отмытые листочки наносят несколько капель 1 % раствора йода. При наличии в листочках крахмала постепенно появляются синие точки и, наконец, весь лист принимает синюю окраску.

## Лабораторное занятие 21

### Тема. Полисахариды животного происхождения.

**Цель:** Сформировать знания о строении и химических свойствах полисахаридов животного происхождения во взаимосвязи с их биологическими функциями.

*Исходный уровень.*

Из курса биохимии:

- 1) знания свойств гликогена и его роли как резервного полисахарида животных
- 2) представления о преимущественно структурной роли гетерополисахаридов
- 3) тема 19

План занятия: Решение ситуационных задач.

#### Обучающая задача 1

Приведите строение полисахарида — действующего начала лекарственного средства *хонсурида*, если известно, что его структурной единицей является дисахарид N-ацетилхондрозин.

#### Решение

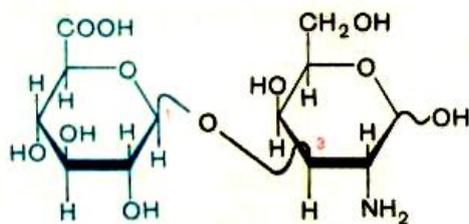
**Общий подход.** Дисахарид *хондрозин* состоит из остатков двух различных моносахаридов: D-глюкуроновой кислоты и D-галактозамина. Следовательно, полисахарид, построенный путем многократного повторения этого дисахаридного фрагмента, относится к гетерополисахаридам.

Гетерополисахариды, построенные из уроновых кислот и аминосугаров, принадлежат к группе полисахаридов соединительной ткани.

**Этап 1.** В состав хондрозина входит D-глюкуроновая кислота в виде  $\beta$ -аномера. Вторым компонентом хондрозина является D-галактозамин, полное название которого 2-дезоксигалактозаминамин.



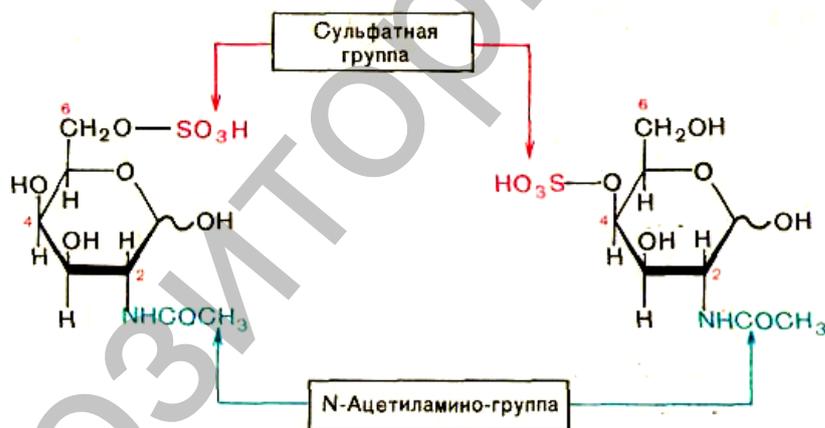
В дисахариде они связаны  $\beta$ -1,3-гликозидной связью, которая встречается реже, чем 1,4- и 1,6-гликозидные связи. 1,3-Гликозидная связь характерна для полисахаридов животного и бактериального происхождения.



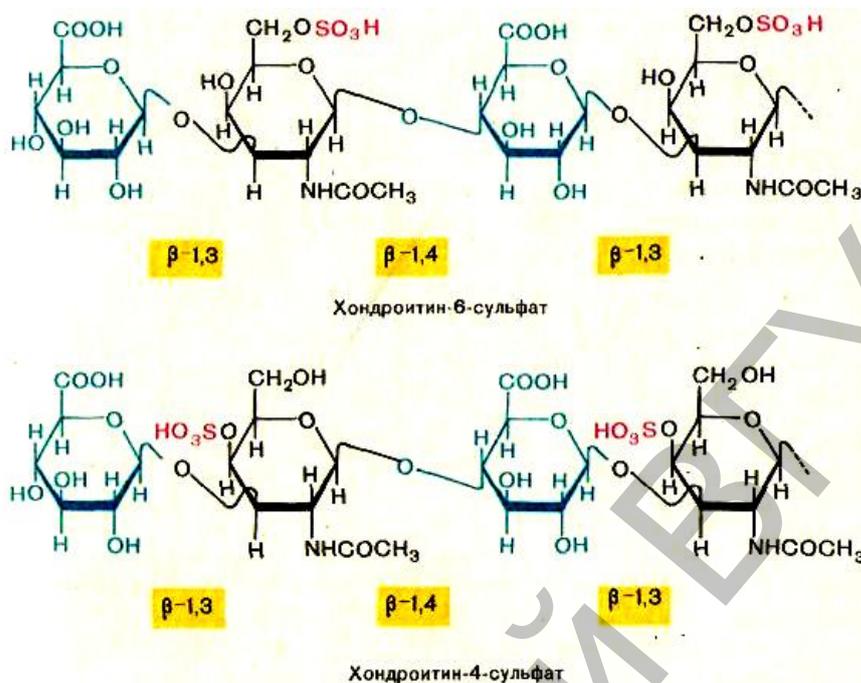
$\beta$ -1,3

Хондрозин

**Этап 2.** Хондрозин является повторяющейся структурной единицей полисахаридов — хондроитинсерных кислот (*хондроитинсульфатов*). В их состав хондрозин входит в виде производных по амино- и гидроксильным группам. В остатке D-галактозамина аминогруппа в положении 2 ацелирована, а гидроксильные группы у C-4 или C-6 этерифицированы серной кислотой.



**Этап 3.** Дисахаридные фрагменты в хондроитинсульфатах связаны  $\beta$ -1,4-гликозидной связью, которая обычно характерна для линейных, неразветвленных полисахаридных макромолекул. В зависимости от положения сульфатных групп различают два вида полисахаридов: хондроитин-4-сульфат и хондроитин-6-сульфат:



**Заключение.** Действующим началом лекарственного средства хонсурида, получаемого из трахей крупного рогатого скота, являются хондроитин-4-сульфат и хондроитин-6-сульфат, представляющие собой неразветвленные полисахаридные цепи, состоящие из чередующихся дисахаридных остатков N-ацетилхондрозина, связанных  $\beta$ -1,4-гликозидными связями. В состав N-ацетилхондрозина входит остаток D-глюкуроновой кислоты, связанный  $\beta$ -1,3-гликозидной связью с остатком N-ацетил-D-глюкозамина, содержащего сульфатные группы у C-4 или C-6.

### Задачи для самостоятельного решения

1. В состав лекарственного средства *луронита*, получаемого из стекловидного тела глаз крупного рогатого скота, входит гетерополисахарид — гиалуроновая кислота. Напишите строение фрагмента гиалуроновой кислоты, если известно, что его структурной единицей является дисахарид, состоящий из остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, связанных  $\beta$ -1,3-гликозидной связью, а дисахаридные остатки связаны между собой  $\beta$ -1,4-гликозидной связью.

### Вопросы к зачету по лабораторному занятию

1. О каких изменениях во вторичной структуре полисахаридных цепей крахмала свидетельствует отсутствие синего окрашивания с йодом?
2. Объясните, почему положительная проба Троммера свидетельствует о полном гидролизе крахмала.
3. Какие полисахариды называются гомополисахаридами? Из каких моносахаридных звеньев построены макромолекулы амилозы, амилопектина, целлюлозы, гликогена, декстрана? Укажите виды связи между D-глюкопиранозными остатками в них.

## Лабораторное занятие 22

### Тема. Гликопротеины и протеогликаны.

**Цель:** Сформировать представления о химическом строении гликопротеинов и протеогликанов.

*Исходный уровень.*

- 1) Из курса органической химии: N- и O-гликозидные связи
- 2) Представления из курса биохимии: о строении углеводной части гликопротеинов
- 3) Темы 1, 2, 18, 19.

#### План занятия:

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Обучающая задача 2

Приведите строение фрагмента протеогликана хондроитин-6-сульфата, связанного O-гликозидной связью с остатком 5-гидроксизина в полипептидной цепи коллагена.

#### Решение

**Общий подход.** Биополимеры, одновременно содержащие полисахаридные и пептидные цепи, широко представлены в животных организмах, растениях и микроорганизмах. В зависимости от принципа построения углеводной цепи такие смешанные биополимеры подразделяются на протеогликаны и гликопротеины.

**Протеогликаны** содержат наряду с пептидной цепью регулярно построенные неразветвленные полисахаридные цепи (гетерополисахариды). В **гликопротеинах** углеводные цепи относительно короткие (олигосахариды) и почти всегда разветвленные. Схематично два типа смешанных биополимеров можно представить следующим образом:

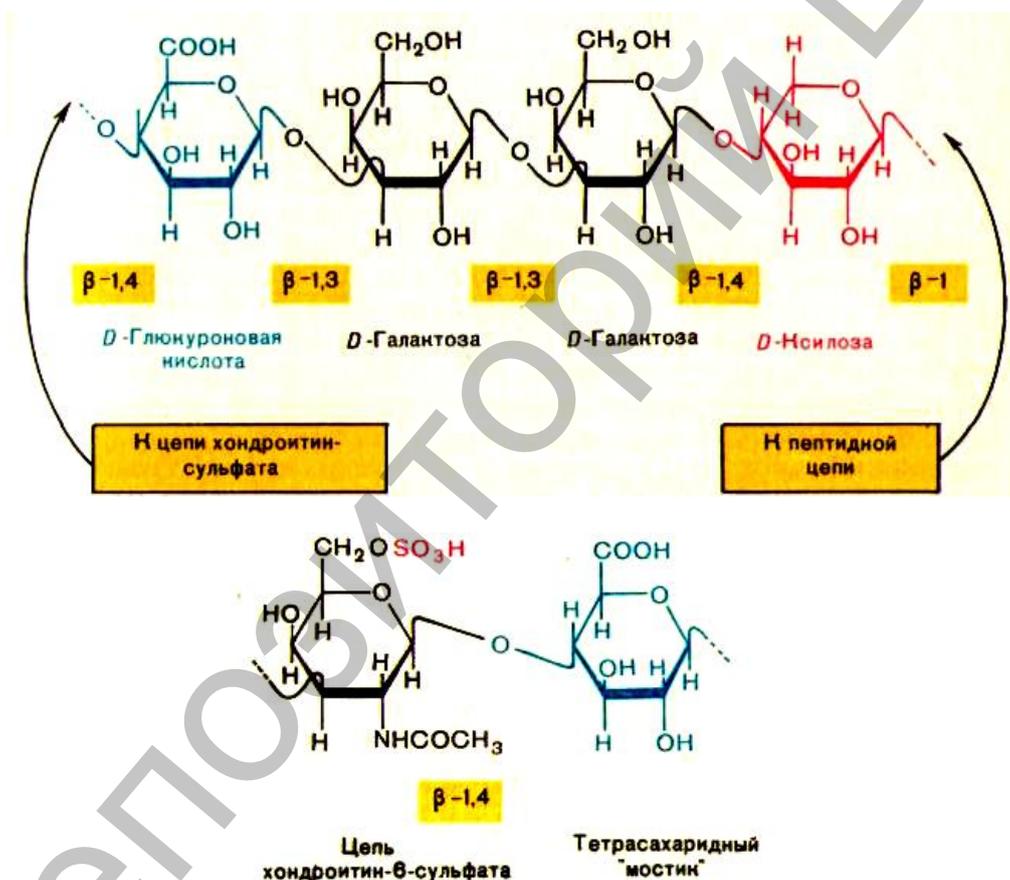


В состав углеводной части протеогликанов входят: D-галактоза, аминсахара (N-ацетил-D-глюкозамин, N-ацетил-D-галактозамин) и уроновые кислоты (D-глюкуроновая кислота и ее эпимер по C-5 — L-идуроновая кислота). Углеводные цепи гликопротеинов содержат остатки D-галактозы, D-маннозы, L-фукозы (6-дезоксид-L-галактоза),

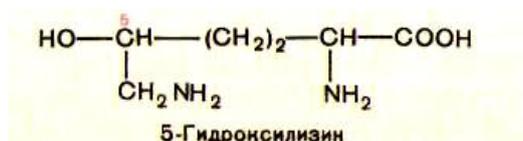
N-ацетил-D-глюкозамина и N-ацетил-D-галактозамина и N-ацетилнейраминовой кислоты.

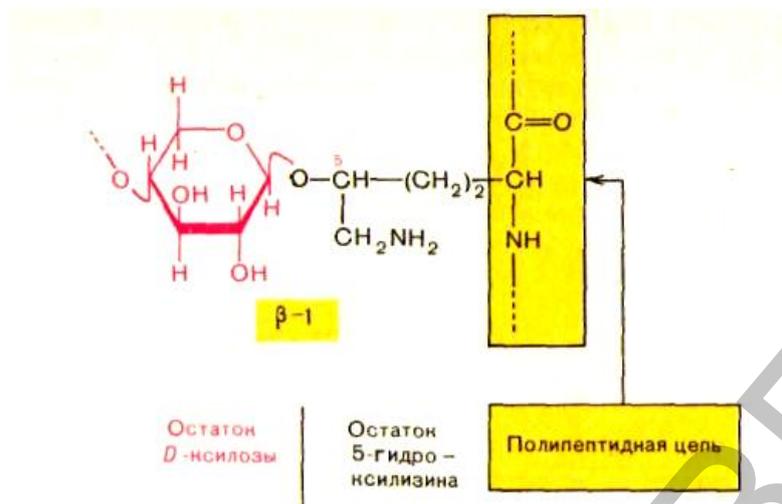
**Этап 1.** Хондроитинсульфаты в организме не содержатся в свободном виде, а всегда связаны с белками, образуя протеогликаны. Хондроитинсульфат в протеогликане связан с пептидной цепью через тетрасахаридный «мостик». Тетрасахаридный фрагмент состоит из остатков D-глюкуроновой кислоты, двух остатков D-галактозы и остатка D-ксилозы.

Тетрасахаридный фрагмент связан с углеводной частью хондроитинсульфата 0-1,4-гликозидной связью за счет остатка D-глюкуроновой кислоты. Связывание осуществляется с остатком D-галактозамина хондроитинсульфата.



**Этап 2.** С пептидной цепью тетрасахаридный фрагмент связан O-гликозидной связью с остатком  $\alpha$ -аминокислоты 5-гидроксилизина, входящего в состав коллагена. В образовании гликозидной связи участвует остаток D-ксилозы тетрасахаридного фрагмента.





**Заключение.** Связь между углеводной и пептидной цепями в протеогликане хондроитин-6-сульфата осуществляется посредством тетрасахаридного фрагмента, состоящего из соединенных последовательно остатка D-глюкуроновой кислоты, двух остатков D-галактозы и остатка D-ксилозы. Остаток D-ксилозы связывается с пептидной цепью, а остаток D-глюкуроновой кислоты — с полисахаридной.

#### Задачи для самостоятельного решения

1. Напишите схему связывания конечного остатка цепи хондроитин-4-сульфата с тетрасахаридным фрагментом.
2. Напишите схему связывания конечного остатка тетрасахаридного фрагмента с остатком серина в полипептидной цепи.
3. Напишите схему связывания конечного остатка тетрасахаридного фрагмента с остатком треонина в полипептидной цепи.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

### Выделение муцина из слюны и обнаружение в нем углеводного компонента

Углеводы в муцине и яичном белке можно обнаружить с помощью реакции Молиша.

*Реактивы и оборудование:* 1. Концентрированная уксусная кислота. 2. Серная кислота концентрированная. 3. Тимол, 1 % спиртовой раствор. 4. α-Нафтол 0,2% спиртовой раствор. 5. Фильтровальная бумага. 6. Стеклянная палочка. 7. Пипетка.

**Ход работы.** В пробирку собирают 1—2 мл слюны и по каплям приливают концентрированную уксусную кислоту (10—20 капель). Выпадает осадок муцина. Осторожно сливают жидкость из пробирки, а сгусток слегка высушивают фильтровальной бумагой. Со сгустком муцина проводят реакцию Молиша и реакцию с α-нафтолом, доказывающие присутствие углевода в белке.

**Качественная реакция на пентозу (Молиша).** К 10 каплям гидролизата дрожжей добавляют 3 капли раствора тимола, перемешивают и по стенке пробирки осторожно приливают 20—30 капель концен-

трированной серной кислоты. При встряхивании на дне пробирки образуется продукт конденсации фурфурола с тимолом красного цвета.

При взаимодействии концентрированной серной кислоты с гексозами или пентозами происходит дегидратация их: из пентоз образуется фурфурол, а из гексоз оксиметилфурфурол, которые дают с тимолом продукт конденсации красного цвета.

**Нафтоловая проба на углеводную группировку муцина (реакция Подобедова—Молиша).** Принцип метода. Если к сгустку муцина добавить спиртовой раствор  $\alpha$ -нафтола и смесь подслоить концентрированной серной кислотой, то на границе двух слоев жидкости появляется фиолетовое кольцо.

Реакция обусловлена присутствием в муцине углеводной простетической группы. При действии концентрированной серной кислотой из глюкозы образуется оксиметилфурфурол. Последний, конденсируясь с  $\alpha$ -нафтолом, превращается в окрашенное соединение.

**Ход работы.** К сгустку муцина добавляют 1—2 капли раствора  $\alpha$ -нафтола, перемешивают и по стенке осторожно спускают 10—20 капель концентрированной серной кислоты. На границе двух слоев жидкости постепенно, появляется фиолетово-красное кольцо, хорошо заметное на, белом фоне. Если вместо  $\alpha$ -нафтола взять раствор тимола, образуется более отчетливое красное кольцо.

### Лабораторное занятие 23

#### Тема. Гликозидазы и гликозилтрансферазы. Пектины.

**Цель:** Сформировать представления:

- 1) о взаимодействии углеводов с ферментами (гликозидазами, гликозилтрансферазами) и лектинами;
- 2) о применении гликозидаз для установления первичной структуры гетероолигосахаридов;
- 3) о строении лектинов.

*Исходный уровень.*

- 1) Гетерополисахариды
- 2) Методы изучения строения полисахаридов
- 3) Протеогликаны

План занятия:

1. Решение ситуационных задач.
2. Тестовый контроль по темам 18-23

Таблица 3 Гликозиды, используемые в структурном анализе сахаров.

Гликозидазы	Источник	Специфичность
Нейраминидаза	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Vibrio cholerae</i>	$\alpha$ -NeuNAc-(2→6)-D-GalNAc $\alpha$ -NeuNAc-[2→3(6)]-D-Gal
$\beta$ -Галактозидаза	<i>Clostridium perfringens</i> Мука бобов канавалии	$\beta$ -D-Gal-[1→4(3)]-D-GlcNAc
$\beta$ -Маннозидаза	Яйцевод кур Улитка	Не определена
$\alpha$ -Маннозидаза	Мука бобов канавалии <i>Aspergillus niger</i>	$\alpha$ -D-Man-[1→2(6,3)]-D-Man
$\alpha$ -Фукозидаза	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Aspergillus perfringens</i>	$\alpha$ -L-Fuc-(1→2)-D-Gal
$\beta$ -N-Ацетилглюкозаминидаза	Эмульсин миндаля <i>Clostridium perfringens</i>	$\alpha$ -L-Fuc-[1→3(4)]-D-Gal Широкая
$\alpha$ -Галактозидаза	Мука бобов канавалии <i>Aspergillus niger</i>	Широкая
$\alpha$ -N-Ацетилгалактозаминидаза	<i>Aspergillus niger</i>	Широкая

## Лабораторное занятие 24

### Тема. Липиды. Физико-химические свойства

**Цель:** Углубить знания о физико-химических свойствах липидов как основы для дальнейшего их изучения.

*Исходный уровень.*

1) Из курса органической химии: физико-химические свойства жирных кислот, триацилглицеридов, жиров.

2) Из курса биохимии: важнейшие липиды тканей, классификация, биологическая роль.

План занятия:

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

### Опыт 1. Растворимость жиров.

*Реактивы:* а) растительное масло; б) твердый жир; в) диэтиловый эфир; г) ацетон; д) этиловый спирт; е) дистиллированная вода.

Ставят два ряда пробирок по 4 в каждом. В пробирки первого ряда вносят по несколько капель растительного масла, в пробирки второго ряда — по кусочку твердого жира. В первую пробирку каждого ряда наливают 2 мл дистиллированной воды, во вторую — столько же диэтилового эфира, в третью — ацетона, четвертую — спирта. Все пробирки взбалтывают и наблюдают растворимость жи-

ров в различных растворителях. Пробирки со спиртом рекомендуется подогреть на водяной бане. Записывают результаты опыта.

### **Опыт 2. Эмульгирование жиров.**

*Реактивы:* а) растительное масло; б) углекислый натрий, 2%-ный раствор; в) мыло, 2%-ный раствор; г) желчь; д) дистиллированная вода.

В четыре пробирки вносят по 5 капель масла. В первую пробирку добавляют 2 мл дистиллированной воды, во вторую — 2 мл 2%-ного раствора углекислого натрия (сода), в третью — столько же 2%-ного раствора мыла, в четвертую — 2 мл воды и несколько капель желчи. Все пробирки взбалтывают и наблюдают образование в первой пробирке неустойчивой эмульсии масла в воде, быстро расслаивающейся при стоянии, а в остальных — устойчивой эмульсии благодаря действию добавленных эмульгаторов, которые адсорбируются в наружном слое жировых капель и понижают их поверхностное натяжение.

## **Лабораторное занятие 25**

### **Тема. Методы исследования липидов.**

**Цель:** Сформировать представления о методах исследования липидов: экстракции из биологического материала и разбавления их методами адсорбционной хроматографии.

*Исходный уровень.*

1) Тема 24.

2) Знание теоретических основ и умение проводить экстракцию, тонкослойную и колоночную хроматографию.

#### План занятия:

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

## **ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА**

### **1. Экстракция липидов из биологического материала.**

**Теоретическое введение.** При экстракции липидов принимают во внимание то, что они способны не только к гидрофобным, взаимодействиям, но и к образованию водородных, электростатических и ковалентных связей (сложноэфирных, амидных, гликозидных). Относительно неполярные растворители (хлороформ, бензол, диэтиловый эфир) разрушают комплексы, образованные гидрофобными взаимодействиями в жировой ткани, комплексы альбумина с жирными кислотами. Полярные растворители (этанол, метанол) разрушают водородные и электростатические связи. Их применяют в смеси со слабополярными растворителями при экстракции липидов из плазматических мембран, митохондрий, эндоплазматического ретикула. Липиды, находящиеся в комплексах, образованных ковалентными связями,

растворителями не экстрагируются. Их можно выделить только после гидролиза комплекса слабыми растворами кислот или щелочей в органическом растворителе.

Наиболее распространенным методом экстракции липидов является *метод Фолча*. Экстракцию проводят смесью хлороформ—метанол (2:1) из расчета 20 частей, экстрагирующей смеси на одну часть ткани. Метод позволяет выделить 90—95% всех клеточных липидов. Смеси растворителей, содержащие спирт, экстрагируют также нелипидные вещества (сахара, аминокислоты, соли и т. д.). Для удаления нелипидных примесей, экстракт липидов промывают водой или слабыми солевыми растворами. Однако это приводит к частичной потере кислых липидов. Очистку экстракта можно провести также гель-фильтрацией на сефадексе.

Липиды легко подвергаются окислению и гидролитической деградации. Чтобы затормозить эти процессы, экстракцию липидов проводят при комнатной температуре, применяя растворители, из которых предварительно удален кислород. Извлеченные липиды не упаривают досуха и не оставляют в упаренном виде на долгое время, а сразу растворяют. Экстракты липидов следует хранить в плотно закрытой посуде при  $-20^{\circ}\text{C}$  и ниже в присутствии инертных газов. Можно применять антиоксиданты, например 2,6-ди-трет-бутил-*n*-крезол, который в концентрации 0,005% эффективно предотвращает окислительное расщепление ненасыщенных липидов.

**Внимание!** Все органические растворители: хлороформ, метанол, гексан, диэтиловый эфир — в той или иной степени ядовиты, поэтому работать с ними нужно под тягой и ни в коем случае не насыпать в пипетку ртом.

Диэтиловый эфир легко воспламеняется, а пары его в воздухе образуют опасные горючие смеси (летуч, кипит при  $36^{\circ}\text{C}$ ), поэтому при работе с ним **необходимо соблюдать осторожность!**

При работе с липидами необходимо пользоваться стеклянной посудой с притертыми пробками. **Смазкой для шлифов пользоваться нельзя!** Можно прикрывать колбы и пробирки алюминиевой фольгой.

## 2. Фракционирование липидов методом адсорбционной хроматографии.

**Теоретическое введение.** Наиболее эффективным и широко применяемым методом фракционирования сложных смесей липидов является хроматография. Главную роль при аналитическом фракционировании играет адсорбционная хроматография в тонком слое сорбента. Этот метод также применяется в препаративных целях, когда разделению подвергается небольшое количество липидов (50—300 мг).

Если масса липидов превышает 300 мг, используют колоночную хроматографию, хотя по разделяющей способности и времени разделения этот метод часто уступает тонкослойной и газовой хроматографии. Однократного хроматографирования обычно бывает недостаточно для выделения индивидуальных веществ, в связи с этим полученные фракции подвергают препаративной тонкослойной хроматографии или колоночной хроматографии другого типа. При колоночной хроматографии липидов используют не только принцип адсорбции, но и принцип распределения между двумя несмешивающимися жидкостями, гель-фильтрации, ионного обмена.

В основе адсорбционной хроматографии лежит разделение липидов в соответствии со степенью их полярности. Адсорбентом при тонкослойной хроматографии чаще всего служит силикагель. При колоночной хроматографии широкое применение получили три адсорбента: силикагель, окись алюминия, *флоризил* (силикат магния). Прочность взаимодействия липида с адсорбентом определяется главным образом водородными и ионными связями, в меньшей степени — силами Ван-дер-Ваальса.

**Хроматография на силикагеле.** Силикагель является продуктом полимеризации ортокремниевой кислоты ( $H_4SiO_4$ ). Он выпускается рядом фирм в виде зерен различной величины. Адсорбционные свойства силикагеля обусловлены присутствием на поверхности зерен гидроксильных групп, которые за счет водородных связей взаимодействуют друг с другом и водой. Гидратированный силикагель мало активен как адсорбент. При нагревании от 50 до 150°C происходит дегидратация, приводящая к значительному увеличению адсорбционной способности силикагеля.

При хроматографии 1—3 г липидов пользуются колонками диаметром 35 мм и длиной 50—70 см. При разделении больших количеств применяют большие колонки, при этом максимальное весовое отношение липид/адсорбент не должно превышать 1:50 (для фосфолипидов 1:100). Отношение высоты колонки к площади ее сечения должно быть равно 5:1, длина колонки не должна быть больше 1 м.

При аналитической хроматографии толщина слоя силикагеля обычно не превышает 0,25 мм. Для препаративных целей используют слои толщиной 0,75—1,0 мм на пластинках размером 20X20 см. В некоторых случаях для лучшего разделения используют удлиненные пластинки (34X20 см). Для аналитического разделения липидов можно применять готовые пластинки. Они представляют собой тонкий слой силикагеля, закрепленный на алюминиевой фольге с помощью крахмала. Для подготовки пластинок к работе их необходимо активировать.

**Хроматография на окиси алюминия.** При проведении препаративных работ хроматография на окиси алюминия имеет ряд преимуществ по сравнению с хроматографией на силикагеле: требуются меньшие объемы растворителей, скорость тока через колонку выше. Для хроматографии фосфолипидов используют окись алюминия IV степени активности. Ее получают путем активации коммерческой окиси алюминия при 110°C в течение 12 ч, после чего на каждые 100 г адсорбента добавляют 10 мл воды и встряхивают смесь в закрытом сосуде в течение 2 ч. При выделении больших количеств фосфолипидов используют стеклянные колонки с отношением диаметра к длине, равным 1:2,5, в которые помещают до 1000 г адсорбента. При работе с меньшим количеством адсорбента, до 100 г, применяют колонки с отношением 1:5. Нагрузка колонки не должна превышать 0,5 мг липидного фосфора на 1 г адсорбента.

Однако необходимо отметить, что хроматография многих липидных веществ на окиси алюминия сопровождается значительными потерями в результате гидролиза.

### 3. Использование ВЭЖХ для анализа липидов.

## Лабораторное занятие 26

### Тема. Нейтральные липиды.

**Цель:** Сформировать системные знания о строении и химических свойствах нейтральных липидов.

*Исходный уровень.*

1) Из курса органической химии: знание строения номенклатуры и свойств триглицеридов, восков, понятие о жирах.

2) Из курса биохимии: понятие о гликолипидах, холестерине (холестероле).

План занятия:

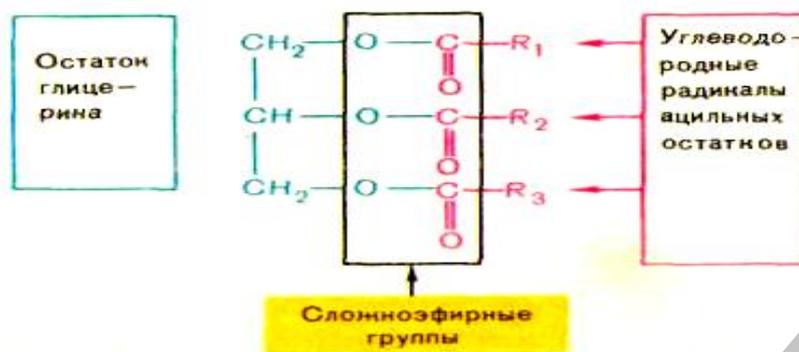
1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Обучающая задача 1

Определите, к жирам или маслам относится дилинолеилстеароилглицерин (дилинолеостеарат глицерина), исходя из того, что у жиров значение йодного числа ниже 70, а у масел выше 70.

### Решение

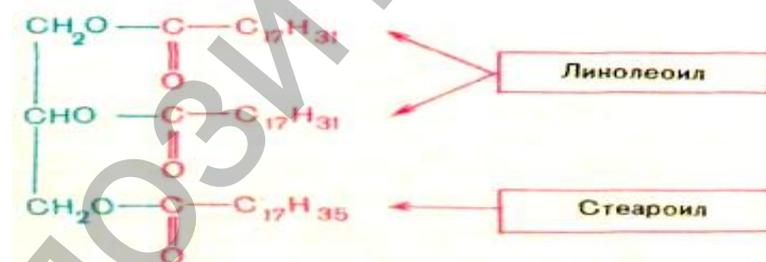
**Общий подход.** К нейтральным омыляемым липидам относятся жиры и масла. Они представляют собой сложные эфиры, образованные трехатомным спиртом глицерином и высшими жирными кислотами. Отсюда их общее название — *ацилглицерины*. Поскольку в природных жирах и маслах почти всегда ацилированы все три гидроксильные группы глицерина, то их еще называют *триацилглицеринами*.



Различие между жирами и маслами заключается в количественном соотношении входящих в них насыщенных и ненасыщенных кислот. В состав животных жиров преимущественно входят остатки насыщенных кислот, и они имеют твердую консистенцию. Жидкая консистенция растительных масел определяется наличием ненасыщенных кислот.

Названия триацилглицеринов строятся путем перечисления ацильных остатков с окончанием *-оил* и добавлением слова «глицерин». Например, ацильный остаток стеариновой кислоты называется - *стеароил*, пальмитиновой — *пальмитоил*, олеиновой — *олеоил*, линолевой — *линолеоил*, линоленовой — *линоленоил*.

*Дилинолеоилстеароилглицерин* можно также назвать *дилинолеостеаратом глицерина* и записать в виде структурной формулы:



**Этап 1.** Для определения *степени ненасыщенности* триацилглицеринов определяют **йодное число**, т. е. количество йода (в граммах), поглощенное 100 г вещества.

Поглощение йода — пример реакции галогенирования двойной связи, протекающей по механизму электрофильного присоединения  $A_E$ . Присоединение йода происходит по всем двойным связям углеводородных радикалов высших карбоновых кислот. Значение йодного числа, отличное от нуля, получается только тогда, когда в состав триацилглицеринов входят остатки ненасыщенных кислот. При этом, чем больше *степень ненасыщенности* (больше двойных связей), тем выше значение йодного числа (табл. 4).

В молекуле дилинолеилстеароилглицерина содержится четыре двойных связи (две в каждом остатке линолевой кислоты), на присоединение к которым расходуется 4 моль йода:

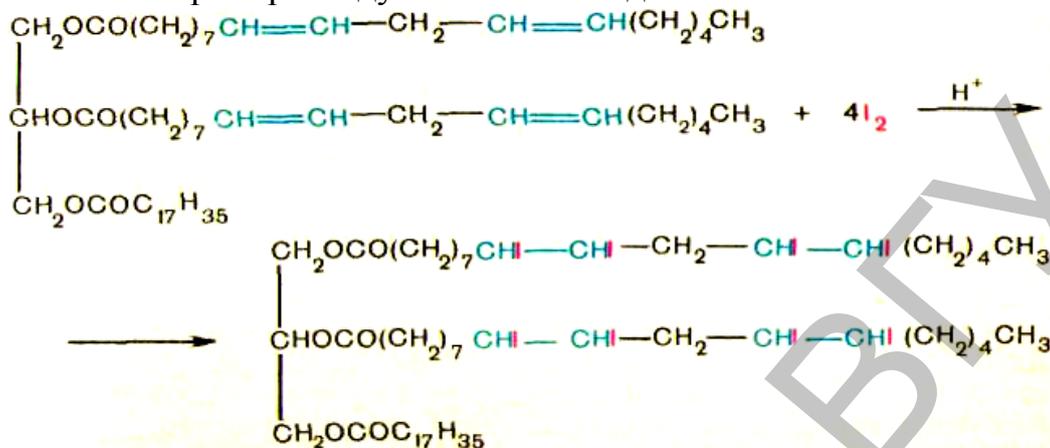


Таблица 4 Характеристика степени ненасыщенности некоторых распространенных жиров и масел

Представители	Йодное число	Представители	Йодное число
<i>Животные жиры</i>			
Сливочное масло	36 59	Кукурузное	123 130
Свиное сало		Соевое	145
<i>Растительные масла</i>		Подсолнечное	
		Льняное	179
Оливковое	81		
Хлопковое	106		

Расчет теоретического йодного числа: относительная молекулярная масса дилинолеилстеароилглицерина  $C_{57}H_{102}O_6=882$

относительная молекулярная масса присоединившихся 4 моль  $I_2 = 1016$

$$886 \quad \text{—} \quad 1016$$

$$100 \text{ г} \quad \text{—} \quad x \qquad x = 114,6 \text{ г } I_2$$

По значению теоретического йодного числа (выше 70) дилинолеилстеароилглицерин можно отнести к маслам.

**Заключение.** Дилинолеилстеароилглицерин (дилинолеостеарат глицерина) представляет собой сложный эфир трехатомного спирта глицерина, этерифицированного линолевой и стеариновой кислотами. Степень ненасыщенности соединения определяется по количеству йода, присоединившегося по двойным связям (реакция электрофильного присоединения). По рассчитанному значению йодного числа (114,6) дилинолеилстеароилглицерин может быть отнесен к маслам.

### Задачи для самостоятельного решения

1. Льняное масло содержит 44—61% линоленовой кислоты. Рассчитайте теоретическое йодное число для трилиноленоилглицерина.
2. Напишите схему реакции этерификации глицерина соответствующими кислотами для получения диолеоиллинолеоилглицерина. По какому механизму протекает реакция?
3. Напишите схему гидролитического расщепления пальмитоилдистеароилглицерина в кислой среде. По какому механизму протекает гидролиз?
4. Напишите схему гидролиза 1-олеоил-2-пальмитоил-3-стеароилглицерина в присутствии гидроксида натрия. Назовите продукты реакции.
5. Напишите реакцию гидрогенизации линоленоилолеоилпальмитоилглицерина. Какова консистенция исходного и конечного продуктов?

## ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

### Качественные реакции на холестерин

*Реактивы, исследуемый материал:* 1) холестерин, 1% хлороформный раствор; 2) серная кислота, концентрированная; 3) уксусный ангидрид; 2) бромная вода; 2) концентрированная серная кислота; 1) холестерин в порошке; 2) ледяная уксусная кислота.

Реакция Либермана—Бурхарда. Раствор холестерина в хлороформе дает с уксусным ангидридом и концентрированной серной кислотой красное окрашивание, переходящее затем в синее и зеленое.

**Ход работы.** В пробирку вносят 1 каплю хлороформного раствора холестерина, добавляют 1 каплю уксусного ангидрида и 1 каплю концентрированной серной кислоты. Развивается синяя, а затем зеленая окраска.

Обнаружение ненасыщенной связи в молекуле холестерина. Ненасыщенную связь в молекуле холестерина можно обнаружить по обесцвечиванию бромной воды.

**Ход работы.** В пробирку вносят 10—15 капель хлороформного раствора холестерина, добавляют 2 капли бромной воды. Происходит обесцвечивание бромной воды при встряхивании содержимого пробирки.

Реакция Сальковского. Под действием концентрированной серной кислоты происходит дегидратация холестерина, конденсация образовавшихся продуктов в виде непредельных углеводов, соединяющихся с образованием окрашенных продуктов.

**Ход работы.** В пробирку вносят 1 каплю хлороформного раствора холестерина и добавляют 1 каплю концентрированной серной кислоты. Появляется красное окрашивание.

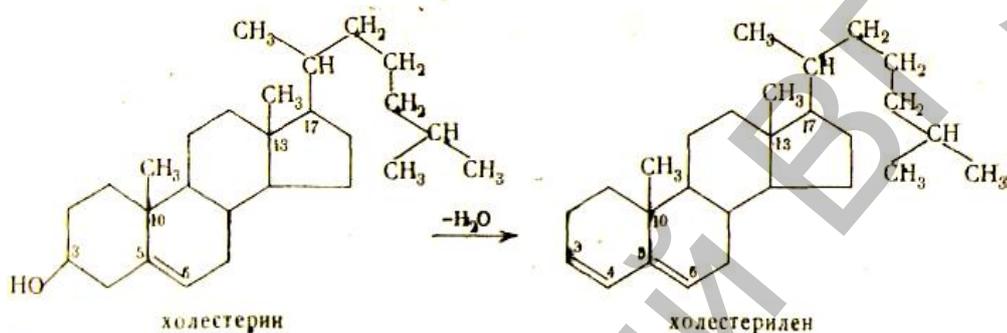
Получение кристаллов холестеридов. Холестерин при взаимодействии с кислотами образует сложные эфиры — стероиды.

**Ход работы.** В пробирку вносят 10 капель уксусной кислоты и на кончике лопатки немного холестерина. Нагревают до кипения. Охладив пробирку на воздухе, наблюдают появление осадка. Несколько

капель полученной взвеси переносят на предметное стекло, покрывают покровным и исследуют под микроскопом кристаллы ацетилхолестерина.

#### Реакция на холестерин (реакция Сальковского)

При добавлении к хлороформному раствору холестерина или растительного масла, концентрированной серной кислоты жидкость окрашивается в красный цвет. Реакция обусловлена образованием *холестерилена*—продукта дегидратации холестерина красного цвета.



**Ход работы.** В сухую пробирку наливают 10 капель 1% хлороформного раствора холестерина и добавляют равный объем концентрированной серной кислоты (осторожно по стенке пробирки). При легком встряхивании на границе двух слоев жидкости образуется оранжевое кольцо, которое при стоянии переходит в красное. Нижний слой серной кислоты приобретает зеленую флюоресценцию.

#### Реакция на холестерин (реакция Либермана—Бурхардта)

При добавлении к хлороформному раствору холестерина или растительного масла уксусного ангидрида и концентрированной серной кислоты жидкость окрашивается в красный, синий и, наконец, в зеленый цвет. Реакция обусловлена образованием сульфокислоты холестерилена зеленого цвета.

**Ход работы.** В сухую пробирку наливают 10 капель 1% хлороформного раствора-холестерина, добавляют 3—5 капель уксусного ангидрида и 1—2 капли концентрированной серной кислоты. Содержимое пробирки осторожно встряхивают и помещают в баню при температуре  $40^\circ$  на 1—2 минуты или оставляют при комнатной температуре на 5—10 минут. В присутствии холестерина вначале появляется красное окрашивание, которое затем переходит в фиолетовое, синее и зеленое. При незначительном содержании холестерина в растворе сразу появляется зеленое окрашивание. Реакция Либермана-Бурхардта нашла применение в методах количественного определения холестерина.

## Лабораторное занятие 27

### Тема. Липопротеины крови.

**Цель:** Углубление знаний о строении и свойствах липопротеинов крови.

*Исходный уровень.*

*Из курса биохимии: знание состава и строения транспортных липопротеиновых комплексов.*

#### План занятия:

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

#### **Лабораторная работа.**

##### **Определение содержания $\beta$ -липопротеинов плазмы крови**

**Теоретическое введение.** Большинство липидов находится в крови не в свободном состоянии, а в составе белково-липидных комплексов: хиломикроны,  $\alpha$ -липопротеиды и  $\beta$ -липопротеиды. Липопротеиды можно разделить различными методами: электрофореза, тонкослойной хроматографии, ультрацентрифугирования в солевых растворах различной плотности. При ультрацентрифугировании выделяются хиломикроны и липопротеиды разной плотности: высокой (ЛВП— $\alpha$ -липопротеиды), низкой (ЛНП— $\beta$ -липопротеиды) и очень низкой (ЛОНП—пре- $\beta$ -липопротеиды) и др.

Фракции липопротеидов отличаются по количеству белка, относительной молекулярной массе липопротеидов и процентному содержанию отдельных липидных компонентов. Так,  $\alpha$ -липопротеиды, содержащие большое количество белка (50—60%), имеют и более высокую относительную плотность (1,063—1,21), тогда как  $\beta$ -липопротеиды и пре- $\beta$ -липопротеиды содержат меньше белка и значительное количество липидов — до 95% от всей относительной молекулярной массы и низкую относительную плотность (1,01 —1,063).

**Принцип метода.** В основу метода положена способность  $\beta$ -липопротеидов (ЛНП) осаждаться в присутствии хлорида кальция и гепарина; при этом изменяется мутность раствора. По степени помутнения раствора и судят о концентрации  $\beta$ -липопротеидов в сыворотке крови. Считают, что гепарин способен образовывать с  $\beta$ -липопротеидами комплекс, который под действием хлорида кальция выпадает в осадок.

**Реактивы, оборудование и исследуемый материал:** 1. Хлорид кальция ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,27% раствор (готовят из безводного реактива). 2. Гепарин, 1% раствор (готовят ex tempore), 1 мл его должен содержать 1000 ЕД (лучше кристаллический). 3. ФЭК. 4. Микропипетка вместимостью 0,2 мл. 5. Сыворотка крови.

**Ход работы.** В пробирку вносят 2 мл 0,27% раствора  $\text{CaCl}_2$  и 0,2 мл сыворотки крови, перемешивают. Определяют оптическую плотность раствора ( $E_1$ ) против 0,27% раствора  $\text{CaCl}_2$  по левому бара-

бану в кюветах на 5 мм, при красном светофильтре (630 нм). Раствор из кюветы переливают в пробирку, добавляют микропипеткой 0,04 мл 1 % раствора гепарина, перемешивают и точно через 4 мин снова определяют оптическую плотность раствора ( $E_2$ ) в тех же условиях:

$$x \text{ (г/л)} = (E_2 - E_1) \times 1000.$$

**Расчет.** Вычисляют разность оптической плотности и умножают ее на 1000 — эмпирический коэффициент, так как построение калибровочной кривой сопряжено с рядом трудностей. Ответ выражают в г/л. В норме содержание  $\beta$ -липопротеидов составляет 3—4,5 г/л (300—450 мг %). Содержание  $\beta$ -липопротеидов колеблется в зависимости от возраста и пола.

*Примечание.* Сыворотку крови, содержащую гепарин, для данного анализа использовать нельзя

## Лабораторное занятие 28

### Тема. Жирные кислоты

**Цель:** Углубление знаний о строении и свойствах жирных кислот.

*Исходный уровень.*

1) *Из курса органической химии:* строение, номенклатура, химические свойства жирных кислот.

2) *Из курса биохимии:* биологическая роль, синтез и биотрансформация жирных кислот.

План занятия:

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.
3. Тестовый контроль (по темам 24-28)

### Обучающая задача 1

Основу лекарственного средства *линетола*, применяемого для лечения и профилактики атеросклероза, составляют этиловые эфиры ненасыщенных высших жирных кислот  $C_{16}$  и  $C_{18}$ , а также насыщенные аналоги этих кислот. Напишите структурные формулы компонентов линетола и изобразите конформации их углеводородных радикалов.

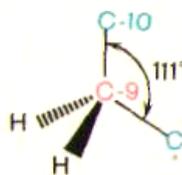
### Решение

**Общий подход.** Название «*жирные*» получили высшие карбоновые кислоты в связи с тем, что впервые они были выделены из продуктов гидролиза жиров.

В природе наиболее распространены монокарбоновые высшие жирные кислоты, т.е. кислоты, которые содержат только одну карбоксильную группу (одноосновные). Для них характерно четное, число атомов углерода, как правило  $C_{16}$  и  $C_{18}$ , в неразветвленной цепи. Примерами таких кислот служат ненасыщенные кислоты — олеиновая  $C_{17}H_{33}COOH$ , линолевая  $C_{17}H_{31}COOH$  и линоленовая  $C_{17}H_{29}COOH$

(18 атомов углерода) и насыщенные — пальмитиновая  $C_{15}H_{31}COOH$  (16 атомов углерода) и стеариновая  $C_{17}H_{35}COOH$  (18 атомов углерода).

**Этап 1. В** пальмитиновой и стеариновой кислотах все атомы углерода в углеводородных радикалах находятся в  $sp^3$ -гибризованном состоянии и имеют тетраэдрическую конфигурацию. С помощью стерео химических формул тетраэдрическая конфигурация атома углерода любого из метиленовых звеньев —  $CH_2$ —, например C-9, изображается таким образом, что две  $\sigma$ -связи с соседними атомами углерода (C-8 и C-10) находятся в плоскости бумаги, а две  $\sigma$ -связи C — H - вне плоскости (*перед ней и позади нее*). Валентный угол между атомами углерода близок к нормальному (109,5) и равен 111°.



За счет вращения вокруг связей  $C_{sp^3} - C_{sp^3}$  углеродная цепь может принимать различные конформации, но для длинной углеродной цепи, как правило, осуществляется **зигзагообразная** конформация.



Это объясняется тем, что в зигзагообразной конформации относительно каждого двух углеродных атомов выполняется наиболее выгодная **анти-бутановая** конформация.

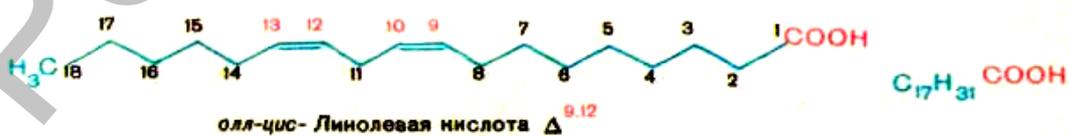


В высших жирных кислотах (насыщенных и ненасыщенных) различают неполярную часть молекулы — углеводородный радикал и полярную — карбоксильную группу. Сочетание в одной молекуле полярной части с неполярной обуславливает поверхностно-активные свойства вещества.

**Этап 2.** В углеводородных радикалах ненасыщенных кислот наряду с  $sp^3$ -гибридизованными атомами углерода содержатся также  $sp^2$ -гибридизованные атомы углерода. Заместители у этих атомов углерода располагаются в одной плоскости под углами, близкими к  $120^\circ$ . Таким образом, в ненасыщенных кислотах зигзагообразная конформация длинных углеводородных цепей будет «прерываться» участками с плоскостным расположением заместителей. При этом участки цепи (углеводородные «заместители») относительно двойной связи могут иметь цис- или транс-расположение (*π-диастереомеры*).



Обычно большей термодинамической устойчивостью обладает транс-изомер, так как в нем объемистые заместители пространственно наиболее удалены друг от друга. В природных высших ненасыщенных кислотах осуществляется *термодинамически менее выгодная цис-форма*, однако это приводит к выигрышу в более компактной вторичной упаковке углеводородных радикалов в липидах и соответственно в клеточных мембранах. В этом случае цис-расположение одинаковых заместителей (атомы водорода) осуществляется относительно двойных связей, имеющих в углеводородном радикале. Отсюда к обозначению типа диастереомера добавляется слово *олл* (от англ. *all* — *все*); наличие двойной связи обозначают греческой буквой Δ (дельта), а цифрой справа наверху — ее начало.



Двойные связи в кислотах не сопряжены, так как они разделены метиленовыми звеньями (в формулах обведены кружками). Количество двойных связей влияет на физические свойства кислот. Так, температура плавления понижается с увеличением числа двойных связей. В свою очередь это сказывается на консистенции. Жидкая консистенция обуславливается присутствием ненасыщенных кислот. Линетол приблизительно на 70% состоит из этиловых эфиров линолевой и других ненасыщенных кислот и по консистенции представляет собой маслообразную жидкость.

**Заключение.** Основу лекарственного средства линетола составляют этиловые эфиры олеиновой  $C_{17}H_{33}COOC_2H_5$ , линолевой  $C_{17}H_{31}COOC_2H_5$  и линоленовой  $C_{17}H_{29}COOC_2H_5$  кислот, имеющие цис-конфигурацию. Насыщенные кислоты — пальмитиновая  $C_{15}H_{31}COOH$  и стеариновая  $C_{15}H_{31}COOH$  — составляют меньшую часть препарата. Углеводородная цепь этих кислот находится в зигзагообразной конформации.

### Задачи для самостоятельного решения

1. Изобразите конформацию углеводородного радикала встречающейся в животных липидах миристиновой кислоты  $C_{13}H_{27}COOH$ .
2. Подлинность оливкового масла, содержащего 80% триолеилглицерина, определяется «элаидиновой пробой», которая заключается в действии азотистой кислотой на испытуемое масло. При этом жидкая цис-олеиновая кислота (т. нл.  $14^\circ C$ ) превращается в твердую элаидиновую (т. пл.  $52^\circ C$ ), имеющую транс-конфигурацию. Напишите структурные формулы этих  $\pi$ -диастереомеров.
3. Одним из компонентов природных липидов является эруковая кислота  $C_{12}H_{23}COOH \Delta^{12}$ . В виде какого  $\pi$ -диастереомера эруковая кислота входит в состав мембранных липидов?
4. Арахидоновая кислота  $C_{19}H_{31}COOH \Delta^{5,8,11,14}$  является предшественником гормонов — простагландинов. Напишите структурную формулу *олл-цис*-арахидоновой кислоты. Относится ли она к сопряженным системам?
5. Арахидоновая кислота — насыщенный аналог арахидоновой кислоты ( $C_{20}$ ). Объясните различие в температурах плавления этих кислот (арахиновая  $+70^\circ C$ , арахидоновая  $-49,5^\circ C$ ). Изобразите конформацию углеводородного радикала арахидоновой кислоты.

### Лабораторная работа.

#### Обнаружение ненасыщенных жирных кислот в растительном масле

**Принцип метода.** При добавлении бромной воды к подсолнечному маслу желтая окраска брома исчезает. Реакция обусловлена наличием в растительном масле ненасыщенных жирных кислот, которые присоединяют бром по месту двойных связей.

**Ход работы.** К 3 каплям подсолнечного масла добавляют 2 капли бромной воды. После встряхивания окраска брома исчезает.

## Лабораторное занятие 29

### Тема. Фосфолипиды

**Цель:** Сформировать знание строения и углубить знание свойств фосфолипидов.

*Исходный уровень.*

*Из курса биохимии:* характеристика фосфолипидов как структурных компонентов биологических мембран – их локализация, содержание, физико-химические свойства.

План занятия:

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.
3. Тестовый контроль.

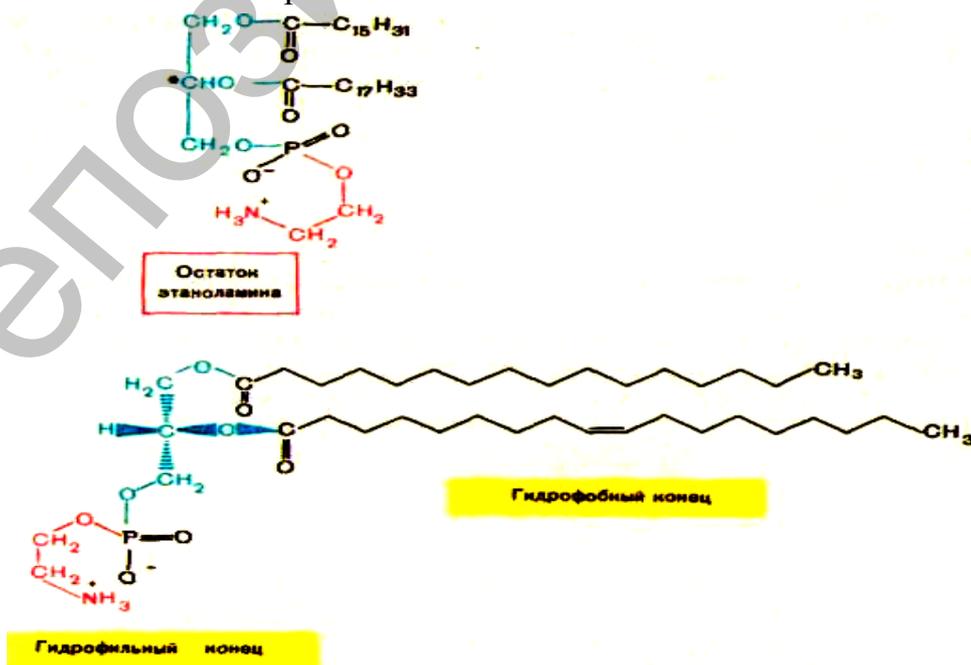
### Обучающая задача 1

При патогенном воздействии ионизирующего излучения наблюдается повреждение клеточных мембран. Объясните химическую основу повреждения на примере входящего в состав клеточной мембраны фосфатидилэтаноламина, содержащего остатки пальмитиновой и олеиновой кислот.

#### Решение

**Общий подход.** Биологические мембраны в качестве одного из основных компонентов содержат фосфолипиды. Особенностью фосфолипидов является наличие в их молекулах полярной (несущей заряд) и неполярной (незаряженной) частей.

Полярный (гидрофильный) конец молекулы («голова») обычно состоит из остатков глицерина, фосфорной кислоты и аминок спирта. Неполярный (гидрофобный) конец («хвост») образован углеводородными цепями высших жирных кислот.



Наличие в молекулах фосфолипидов гидрофобного и гидрофильного концов определяет их ориентацию в растворах. Молекулы фосфолипидов образуют мицеллы' и в полярном растворителе выстраиваются в них гидрофобными концами внутрь, а гидрофильными — наружу, в неполярном — гидрофобные концы оказываются снаружи, гидрофильные — внутри мицеллы (рис.). Подобная ориентация порождает двухслойность биомембраны.

Повреждение мембраны с химической точки зрения может заключаться в расщеплении углеводородного радикала ненасыщенной кислоты, что приводит к нарушению ее двухслойности. Одной из важнейших причин, способствующих повреждению, является возникновение свободных радикалов под действием различных видов излучения, канцерогенных веществ и т. п.

**Этап 1.** Основным источником радикалов в организме служит кислород, который хорошо растворяется в неполярной среде мембраны. Способный возникать под действием ионизирующего излучения радикал  $\text{HO}\cdot$  представляет собой очень сильный окислитель, который может взаимодействовать с органическими соединениями. Этот процесс, называемый пероксидным окислением, осуществляется по радикальному механизму.

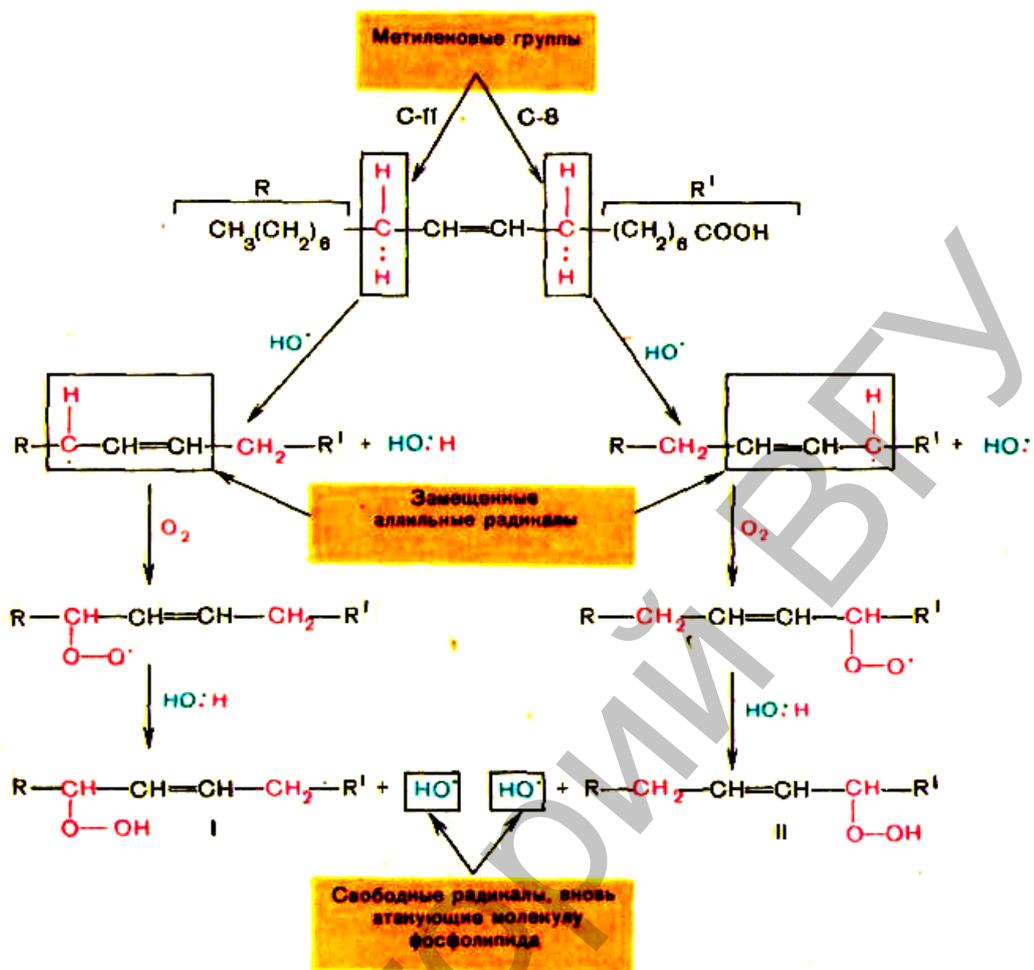
**Рис. 5. Ориентация молекул фосфолипидов.**

а—в среде полярного растворителя;  
б — в среде неполярного растворителя.

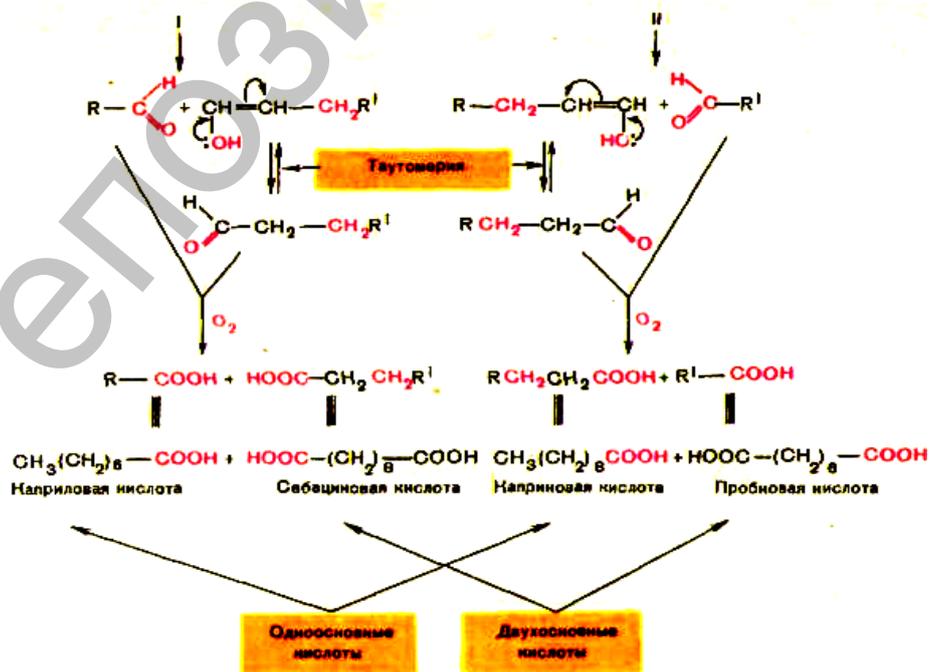


В фосфолипидах наиболее чувствительными звеньями по отношению к пероксидному окислению являются остатки ненасыщенных кислот. Местом радикальной атаки будут атомы водорода метиленовых групп, связанных с  $sp^2$ -гибридизованными атомами углерода.

Это объясняется тем, что в результате атаки метиленовых групп, соседними с двойной связью, образуются новые радикалы *аллильного* типа, стабильность которых обусловлена сопряжением неспаренного электрона с  $\pi$ -электронами двойной связи. Таким образом, свободнорадикальная реакция с олеиновой кислотой протекает по двум метиленовым звеньям (С-8 и С-11). Возникающие свободные радикалы аллильного типа с участием кислорода образуют нестойкие гидропероксиды I и II.



Неустойчивые гидропероксиды I и II распадаются сначала с образованием альдегидов, которые затем легко окисляются до моно- и дикарбоновых кислот:



**Заключение.** При патогенном воздействии ионизирующего излучения на организм образуются свободные радикалы  $\text{HO}\cdot$ , под действием которых ненасыщенные карбоновые кислоты, входящие в состав фосфолипидов, подвергаются пероксидному окислению. Реакция пероксидного (радикального) окисления осуществляется по двум  $\text{sp}^3$ -гибридизованным атомам углерода, соседним с двойной связью. Сначала образуются свободные радикалы *аллильного* типа, затем под действием кислорода они превращаются в нестойкие гидропероксиды, которые легко разлагаются и окисляются до соответствующих одно- и двухосновных кислот.

### **Задачи для самостоятельного решения**

1. Напишите строение лецитина, включающего пальмитиновую и линолеовую кислоты. Какой из ацильных остатков данного фосфолипида может подвергаться пероксидному окислению? Напишите схему реакции.

2. Напишите строение фосфатидилэтаноламина, включающего пальмитиновую и линоленовую кислоты. Обозначьте полярную и неполярную части молекул. Способно ли данное соединение подвергаться пероксидному окислению?

### **Лабораторная работа**

#### **Опыт 1. Выделение лецитинов из яичного желтка**

Яичный желток в количестве 0,5—1 г (1/6 часть яичного желтка) помещают в пробирку, добавляют 3—5 мл кипящего спирта и тщательно перемешивают содержимое пробирки стеклянной палочкой в течение 5—10 минут. По окончании извлечения жидкость фильтруют в сухую пробирку и с фильтратом проводят реакции на лецитин.

#### **Опыт 2. Получение эмульсии лецитинов.**

К 5 каплям спиртового раствора лецитина добавляют 20-30 капель воды. Образуется эмульсия лецитина в воде.

#### **Опыт 3. Гидролиз лецитинов и исследование**

В широкую пробирку наливают несколько капель спиртового раствора лецитина (5—10) и добавляют равный или двойной объем 10% раствора едкого натра и кипятят 3—5 минут. В результате гидролиза лецитин распадается на составные части: глицерин, жирные кислоты, холин и фосфорную кислоту. Холин при гидролизе лецитина превращается в триметиламин и обнаруживается до запаха селедочного рассола.



С гидролизатом производят реакции на жирные кислоты, холин, глицерин и фосфат-ион.

Проба на жирные кислоты. К части гидролизата добавляют по каплям 10%-ный раствор серной кислоты — выделяются свободные жирные кислоты. Содержимое пробирки фильтруют через бумажный фильтр, на котором задерживаются жирные кислоты.

К фильтрату прибавляют раствор едкого кали или едкого натра до нейтральной реакции на лакмус, после чего выпаривают досуха на водяной бане. Сухой остаток делят на три части.

Проба на глицерин. Часть сухого остатка сплавляют с порошком кислого сернокислого калия или натрия, или борной кислоты. Образуется акролеин, который обнаруживается по резкому специфическому запаху.

## Лабораторное занятие 30

### Тема. Антибиотики. Пенициллины, цефалоспорины и родственные антибиотики

**Цель:** Сформировать представления о строении и свойствах β-лактомных антибиотиков.

*Исходный уровень.*

Из курса органической химии:

- 1) строение и свойства β-лактамного цикла ;
- 2) тиазолидин .

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Лабораторная работа Реакции пенициллина

#### Опыт 1. Обнаружение пенициллина реакцией с гидроксиламином

Принцип метода. При нагревании пенициллина и гидроксиламина раскрывается лактамное кольцо пенициллина с образованием α-гидроксамовой кислоты, дающей с хлорным железом продукт конденсации красного цвета.

*Реактивы, исследуемый материал:* 1) пенициллин, 0,5% водный раствор; 2) гидроксилламин, 5% раствор; 3) хлорное железо, 5% раствор.

**Ход работы.** К 5 каплям водного раствора пенициллина добавляют 2 капли 5% раствора гидроксилamina. Смесь нагревают до кипения. После охлаждения прибавляют 1 каплю 5% раствора хлорного железа. Появляется розовое или красное окрашивание.

### **Опыт 2. Нитропруссидная реакция на пенициллин**

Принцип метода. При щелочном гидролизе пенициллина происходит освобождение сульфгидрильных групп, взаимодействующих с нитропруссидом натрия с образованием нестойкого соединения красного цвета.

*Реактивы, исследуемый материал:* 1) пенициллин, 0,5% раствор; 2) едкий натр, концентрированный раствор; 3) нитропруссид натрия, 5% раствор.

**Ход работы.** К 2 каплям раствора пенициллина добавляют 2 капли концентрированного раствора едкого натра и кипятят 1—2 мин. После охлаждения добавляют по каплям раствор нитропруссидата натрия. Наблюдают появление красного окрашивания, переходящего в оранжевое и желтое.

## **Лабораторное занятие 31**

### **Тема. Антибиотики. Стрептомицин и другие аминогликозидные антибиотики.**

**Цель:** Сформировать представления о свойствах аминогликозидных антибиотиков.

*Исходный уровень. Из курса органической химии:* конформация кресло; формулы Хеурса моносахаридов; конформация «кресло» моносахаридов

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### **Лабораторная работа Реакции стрептомицина**

#### **Опыт 1. Мальтозная реакция на стрептомицин**

Принцип метода. Реакция основана на способности стрептомицина гидролизываться со щелочью с образованием мальтола ( $\alpha$ -метил- $\beta$ -оксипирана), дающего характерное окрашивание с ионами трехвалентного железа.

*Реактивы, исследуемый материал:* 1) стрептомицин, 1% раствор; 2) едкий натр, 10% раствор; 3) соляная кислота, 10% раствор; 4) хлорное железо, 1% раствор.

**Ход работы.** К 3 каплям раствора стрептомицина добавляют 1 каплю раствора едкого натра. Смесь кипятят на спиртовке в течение 5—10 с. Пожелтевшую и слегка мутную жидкость нейтрализуют 2 каплями раствора соляной кислоты. Нейтральная жидкость становится прозрачной и бесцветной. К ней добавляют 1—2 капли раствора хлорного железа. Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

## Лабораторное занятие 32

### Тема. Антибиотики-каналообразователи. Грамицидины.

**Цель:** Сформировать представления о строении антибиотиков грамицидиновой группы и их функционировании в мембранах в виде каналообразователей.

*Исходный уровень.*

1) *Тема 2. Пептиды*

2) *Из курса биохимии: знание строения клеточных мембран*

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.
3. Тестовый контроль по темам 30-32

### Лабораторная работа

#### Реакции грамицидина

##### Опыт 1. Получение пикрата грамицидина

К 2 каплям раствора грамицидина прибавляют 2 капли 10% раствора пикриновой кислоты. Выпадает желтый кристаллический осадок пикрата грамицидина.

##### Опыт 2. Биуретовая реакция на грамицидин

К 2 каплям раствора грамицидина прибавляют 2 капли 10% раствора едкого натра и 1 каплю 0,1% раствора медного купороса и смесь слегка подогревают в водяной бане или на голлом огне. Жидкость становится мутной, но приобретает фиолетовое окрашивание.

## Лабораторное занятие 33

### Тема. Витамин А. Каротиноиды

**Цель:** Углубление знаний и строения и химических свойствах витамина А и каротиноидов.

*Исходный уровень.*

*Из курса биохимии: витамин А (антиксерофтальмический ретинол). Ретинол, ретиналь, ретиноевая кислота, провитамины и возможность образования витамина из них. Роль β-каротина. источники, потребность, биологическая роль (акт зрения, пролиферация клеток, синтез компонентов межклеточного вещества)*

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Лабораторная работа

#### Качественные реакции на витамин А и каротиноиды

##### Опыт 1. Реакция с сульфатом железа(II).

В пробирку к 2-3 каплям масляного раствора витамина А (или свежего рыбьего жира) приливают 5-10 капель ледяной уксусной ки-

слоты, насыщенной с сульфатом железа (II), 1-2 капли концентрированной серной кислоты. Появляется голубое окрашивание, постепенно переходящее в красно-розовое. Каротины дают при этой реакции зеленое окрашивание.

### Опыт 2. Реакция с хлоридом сурьмы(III)

В сухую пробирку вносят две капли масляного раствора витамина А (или свежего рыбьего жира) и добавляют 2-3 капли 33%-го хлороформного раствора треххлористой сурьмы; при смешивании содержимое пробирки окрашивается в синий цвет.

## Лабораторное занятие 34 Тема. Витамины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>

**Цель:** Сформировать знания строения и химических свойств витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>.  
*Исходный уровень.*

Из курса биохимии: витамины группы В

### План занятия

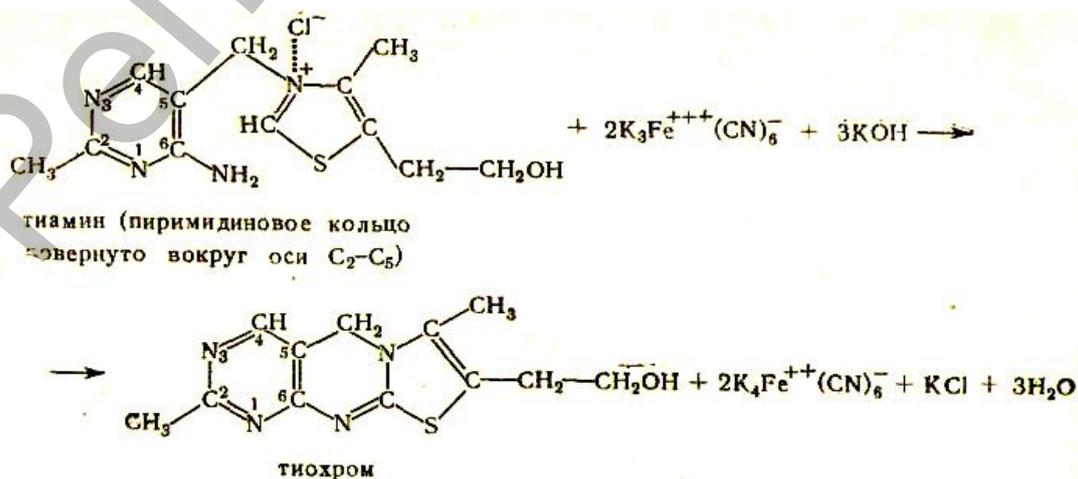
1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Лабораторная работа

#### Опыт 1. Реакция окисления тиамин

**Принцип метода.** При действии железосинеродистого калия тиамин окисляется с образованием желтого пигмента *тиохрома*, обладающего голубой флюоресценцией.

**Ход работы.** К 1 капле 5% раствора тиамин (или к 1—2 мг порошка) добавляют 5—10 капель 10% раствора едкого натра и 1—2 капли 5% раствора железосинеродистого калия и перемешивают. При нагревании жидкость окрашивается в желтый цвет вследствие превращения тиамин в *тиохром*. При освещении растворов тиохрома ультрафиолетовыми лучами видна голубая флюоресценция.

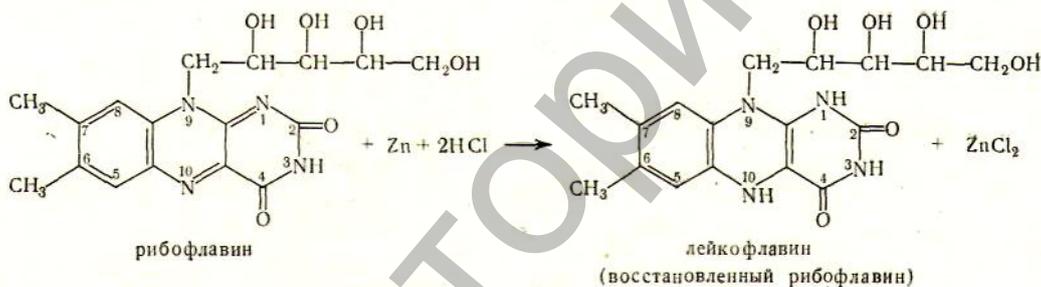


## Опыт 2. Реакция восстановления рибофлавина

**Теоретическое введение.** Если к раствору рибофлавина добавить концентрированную соляную кислоту и металлический цинк, то происходит бурное выделение водорода и желтая окраска жидкости сначала переходит в красную, а затем обесцвечивается.

Реакция обусловлена восстановлением рибофлавина сначала в *родофлавин* (промежуточное соединение) красного цвета, а затем в бесцветный *лейкофлавин*.

**Ход работы.** В пробирку наливают 10 капель взвеси рибофлавина в воде (0,025%), добавляют 5 капель концентрированной соляной кислоты и опускают небольшой кусочек металлического цинка. Начинается бурное выделение пузырьков водорода, и жидкость постепенно окрашивается в розовый или красный цвет, затем окраска жидкости начинает бледнеть, и жидкость обесцвечивается. При стоянии в верхнем слое жидкости появляется желтое окрашивание вследствие окисления лейкофлавина кислородом воздуха в рибофлавин.



## Лабораторное занятие 35

### Тема. Витамины В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>

**Цель:** Сформировать знания строения и химических свойств витаминов В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>6</sub>

**Исходный уровень.** Из курса биохимии: витамины группы В

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Лабораторная работа

#### Опыт 1. Феррихлоридная проба на пиридоксин

При добавлении к раствору пиридоксина раствора хлорного железа жидкость окрашивается в красный цвет вследствие образования комплексного соединения типа фенолята железа<sup>1</sup>.

**Ход работы.** К 5 каплям водного раствора пиридоксина прибавляют 1 каплю 5% раствора хлорного железа и встряхивают; жидкость приобретает красную окраску.

<sup>1</sup> Аналогичная реакция, с такой же окраской, получается при взаимодействии хлорного железа с раствором пирогаллола.

## Лабораторное занятие 36

### Тема. Витамины В<sub>9</sub> (фолиевая кислота). Сульфаниламидные лекарственные средства

**Цель:** Сформировать знания о строении и свойствах витамина В<sub>9</sub> и представления о строении и свойствах сульфаниламидных лекарственных средствах как антиметаболитов фолиевой кислоты.

*Исходный уровень.*

1) Из курса органической химии: свойства амидов

2) Из курса биохимии: витамин В<sub>9</sub>

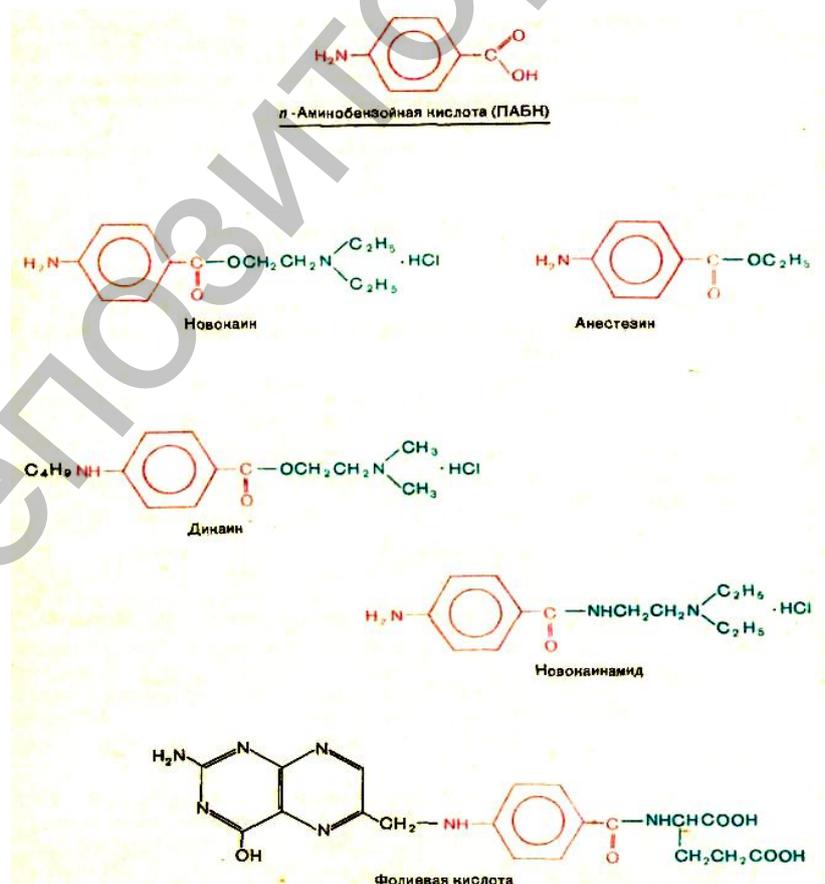
#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

#### Обучающая задача

В медицинской практике стараются избегать одновременного приема сульфаниламидных средств и анестетиков (новокаин, анестезин), так как последние ослабляют противомикробное действие сульфаниламидов. Объясните химическую причину фармакологической несовместимости лекарственных средств — производных сульфаниловой и *p*-аминобензойной кислот.

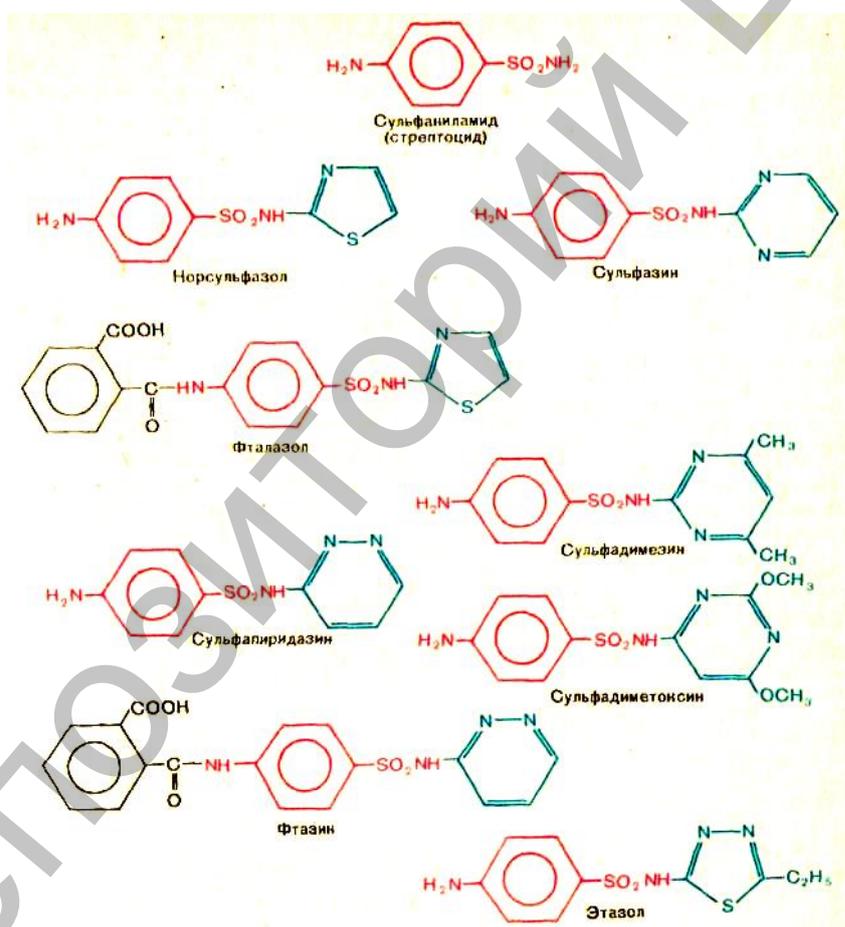
Схема 1. Некоторые производные *p*-аминобензойной кислоты, применяемые в медицине



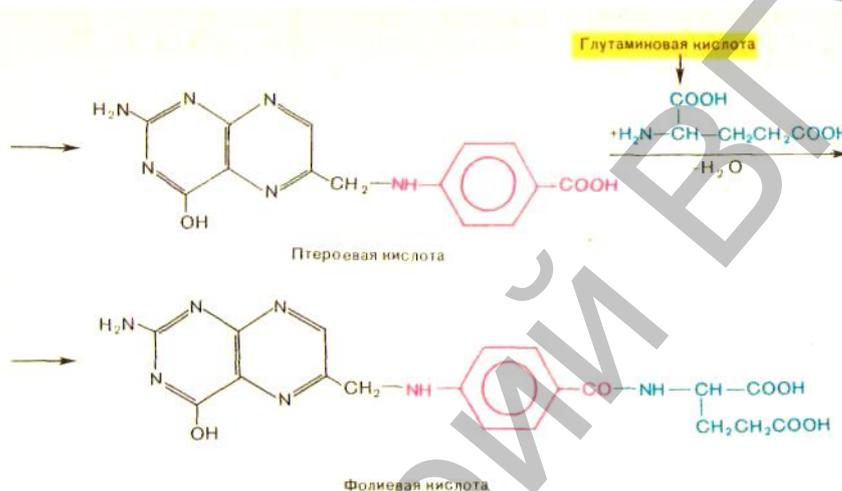
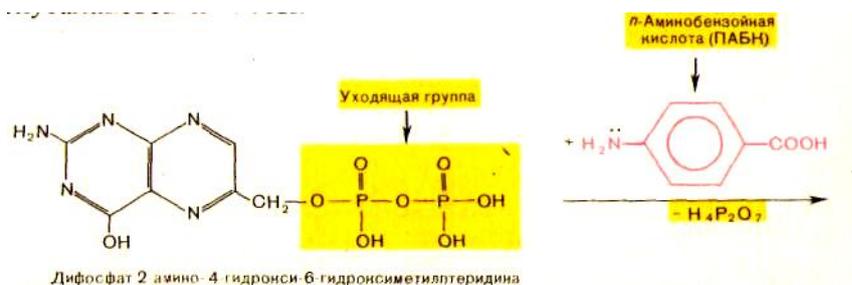
## Решение

**Общий подход.** Местноанестезирующие лекарственные средства—анестезин и новокаин — являются сложными эфирами *p*-аминобензойной кислоты (ПАБК). Они содержат аминогруппу, ароматический фрагмент и алифатический участок, характерные для соединений, проявляющих анестезирующее действие (схема 1). Сульфаниламидные средства угнетают жизнедеятельность микробов (схема 2). Антибактериальное действие сульфаниламидов связано с подавлением сульфаниламидами биосинтеза фолиевой кислоты, имеющей важное значение для жизни бактерий.

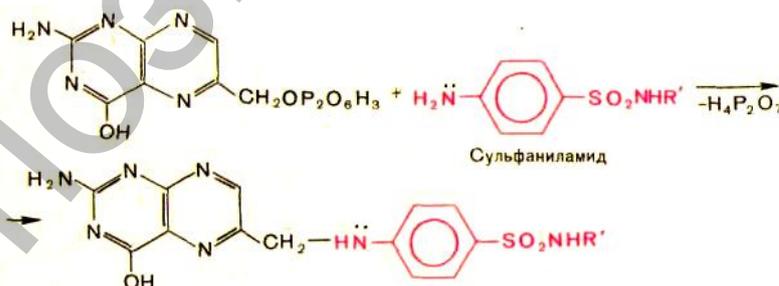
Схема 2. Некоторые производные сульфаниловой кислоты, применяемые в медицине



Молекула фолиевой кислоты состоит из гетероцикла *птеридина*, остатков *p*-аминобензойной и глутаминовой кислот. В биосинтезе фолиевой кислоты сначала образуется *птероевая кислота*, а затем птероевая кислота ацилирует аминогруппу глутаминовой кислоты:



**Этап 1.** Сульфаниламиды со свободной аминогруппой в бензольном кольце конкурируют с ПАБК на стадии образования птероевой кислоты. Этому способствует сходство геометрических параметров ПАБК и сульфаниловой кислоты. Аминогруппа сульфаниловой кислоты и ее производных по сульфамидной группе реагирует с *птеридинфосфатом* аналогично аминогруппе ПАБК.



На этом обрывается синтез фолиевой кислоты, так как сульфамидная группа в отличие от карбоксильной группы ПАБК далее не способна взаимодействовать с аминогруппой глутаминовой кислоты. Таким образом, амиды сульфаниловой кислоты являются антиметаболитами ПАБК, конкурируя с ней в биосинтезе фолиевой кислоты у бактерий.

**Этап 2.** В организме человека новокаин и анестезин гидролизуются с участием ферментов эстераз. Освободившаяся

*p*-аминобензойная кислота может включаться в биосинтез фолиевой кислоты у бактерий.



**Заключение.** В результате приема больными сульфаниламидных средств возрастает концентрация сульфаниламидов по сравнению с концентрацией *p*-аминобензойной кислоты, которая присутствует в организме в очень небольшом количестве. Конкурирующее действие сульфаниламидов на стадии образования птероевой кислоты практически прекращает биосинтез фолиевой кислоты, что приводит к гибели бактерий. Одновременное употребление сульфаниламидов и анестетиков (анестезин или новокаин) приводит к увеличению концентрации ПАБК, и, следовательно, к снижению антибактериального эффекта сульфаниламидных средств.

#### **Задачи для самостоятельного решения**

1. Сульфаниламидные лекарственные вещества в организме ацетируются, как правило, по аминогруппе. Эта химическая реакция лежит в основе так называемой конъюгации (связывание), а продукт реакции называется конъюгатом. Напишите реакцию получения конъюгата сульфадимезина (см. схему 2).
2. Поступивший в организм фталазол (см. схему 2) является источником образования норсульфазола. Какая химическая реакция происходит с фталазолом? Напишите уравнение реакции.
3. Какой сульфаниламид образуется при расщеплении фтазина (см. схему 2) в организме? Какая реакция лежит в основе расщепления фтазина?

#### **Лабораторная работа**

##### **Опыт 1. Выделение фолиевой кислоты из дрожжей и ее обнаружение**

**Принцип метода.** Фолиевая кислота хорошо растворима в 0,1 М растворе NaOH. При экстрагировании фолиевой кислоты из дрожжей и ультрафиолетовом облучении наблюдается интенсивно-голубая флюоресценция.

**Реактивы, исследуемый материал:** 1) едкий натр, 0,1 М и 0,005 М растворы; 2) ледяная уксусная кислота; 3) перманганат калия, 0,4% раствор; 4) перекись водорода, 3% раствор; 5) индикаторная бумага; 6) дрожжи.

**Ход работы.** В ступку помещают 10 г дрожжей, добавляют 10 мл 0,1 М. раствора NaOH, 2 г кварцевого песка и растирают 5 мин. Затем центрифугируют 15 мин при 3000 об/мин.

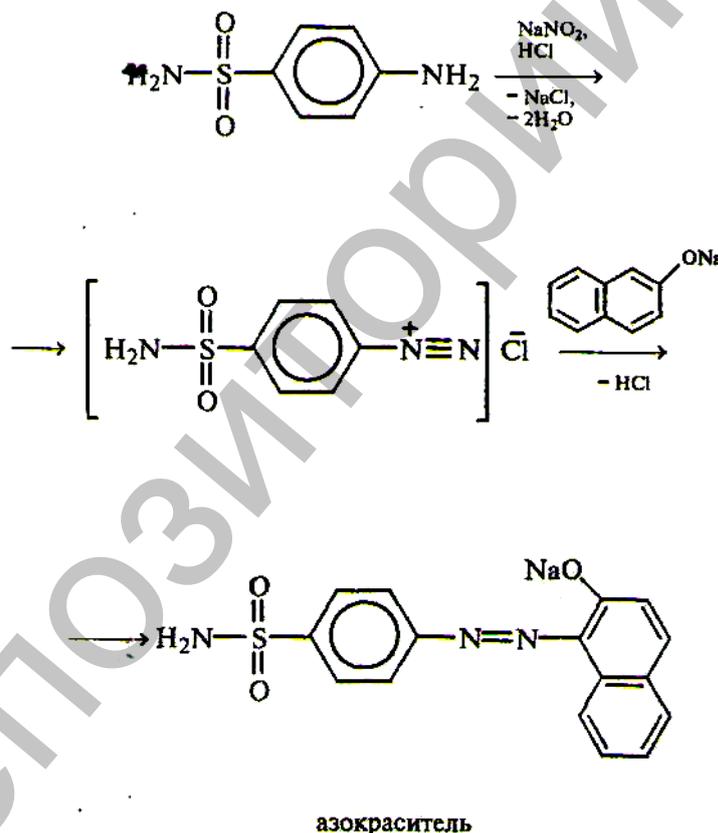
К 10 каплям надосадочной жидкости приливают 20 капель ледяной уксусной кислоты (рН 3,0) и 10 капель 0,4% раствора перманганата калия так, чтобы розовое окрашивание не исчезало в течение 10 мин. Через 10 мин удаляют избыток перманганата калия добавлением 4-5 капель 3% раствора H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и приливают 0,005 М. раствор едкого натра (приблизительно 5 мл) до рН 4,0—4,5 в присутствии индикаторной бумаги. При

ультрафиолетовом облучении фолиевой кислоты в щелочном растворе в флюороскопе наблюдается голубая флюоресценция.

### Опыт 2. Определение сульфаниламидов

**Ход работы.** Небольшую крупинку белого стрептоцида помещают в пробирку, добавляют 3—4 капли 2М соляной кислоты и перемешивают до полного растворения. Затем вносят 1—2 капли 0,5М раствора нитрита натрия до посинения иодкрахмальной бумажки. В другую пробирку помещают несколько кристаллов β-нафтола и растворяют в 2—3 каплях 2М раствора гидроксида натрия. К полученному раствору добавляют 1—2 капли диазотированного стрептоцида. Происходит реакция азосочетания с β-нафтолом, и образуется азокраситель интенсивного оранжево-красного цвета:

При помощи этой реакции можно определить и другие сульфаниламидные препараты.



### Лабораторное занятие 37 Тема. Витамины В<sub>12</sub>

**Цель:** Углубить знания о строении и свойствах витамина В<sub>12</sub> и его кофермента.

*Исходный уровень.*

- 1) Из курса биохимии: витамин В<sub>9</sub> – фолатная ловушка анемии
- 2) Курс основ биорганической химии: биоккомплексы кобальта; кобаламины, строение; отличие коррина от порфирина; кобамид, метилкобаламин.

### План занятия

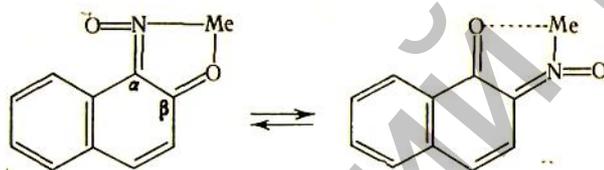
1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

## Лабораторная работа

### Открытие кобальта в кобаламине

**Принцип метода.** При сплавлении кобаламина с гидросульфатом калия ( $\text{KHSO}_4$ ) кобаламин разрушается и кобальт может быть обнаружен реакцией с  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтолом или с  $\alpha$ -нитрозодисульфо- $\beta$ -нафтолом в виде комплексной соли красного цвета. При выполнении химической реакции добавляют уксуснокислый натрий, так как сильно кислая среда мешает образованию комплекса.

Структура комплекса схематично может быть представлена в следующем виде:



комплексная соль  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтола (Me-металл)

**Ход работы.** Раствор 0,1% кобаламина 1мл (1мл содержит 1000  $\gamma$ ) помещают в тигелек или пробирку, добавляют 10 капель концентрированной азотной кислоты и 30 капель концентрированной соляной кислоты (х.ч.) и содержимое пробирки кипятят под тягой до полного испарения жидкости (*сжигание*). После охлаждения остаток растворяют в 1—2 каплях дистиллированной воды, прибавляют 1—2 капли 0,1% раствора  $\alpha$ -нитрозо- $\beta$ -нафтола в ацетоне и по каплям 10%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  до щелочной реакции среды. В присутствии  $\text{Co}^{3+}$  возникает бурое окрашивание, в отсутствие — желто-зеленая окраска.

## Лабораторное занятие 38

### Тема. Витамины С, Н.

**Цель:** Сформировать знания о строении и свойствах витаминов С и Н.

*Исходный уровень.*

*Из курса органической химии:* знания о строении и свойствах лактонов, о стереоизомерии обусловленной асимметрическими атомами углерода; представления о строении и свойствах гетероциклов имидазола и тиафена.

*Из курса биохимии:* знания биохимических функций витаминов С и Н (биотинзависимые ферменты); представления о строении и свойствах аскорбиновой кислоты (витамин С).

### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

## Лабораторная работа

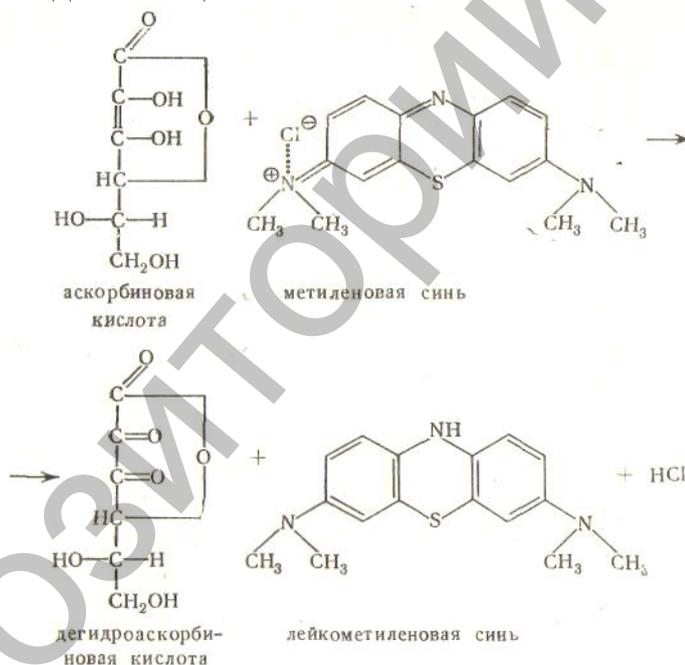
### Восстановительные свойства витамина С

**Принцип метода.** Обнаружение аскорбиновой кислоты основано, на ее способности вступать в окислительно-восстановительные реакции. Окисляясь, аскорбиновая кислота восстанавливает такие вещества, как, метиленовый синий, молекулярный иод.

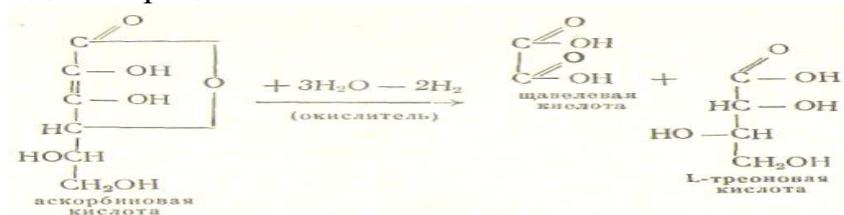
**Реактивы, исследуемый материал:** 1) едкий натр, 10% раствор; 2) соляная кислота, 10% раствор; 3) витамин С, 1% раствор; 4) хлорное железо, 1% раствор; 5) метиленовый синий, 0,01% раствор; 6) натрий углекислый, 10% раствор; 7) 0,1% раствор иода в растворе йодистого калия (*раствор Люголя*).

#### Ход работы.

**Реакция с метиленовым синим.** В две пробирки вносят по 1 капле 0,01 % раствора метиленового синего, по 1 капле 10% раствора соды. В одну из них добавляют несколько капель раствора аскорбиновой кислоты, в другую — 1 мл воды. В пробирке с аскорбиновой кислотой при нагревании происходит обесцвечивание метиленового синего:



**Реакция с раствором Люголя.** В две пробирки вносят по 10 капель дистиллированной воды и по 2 капли раствора Люголя. В одну пробирку прибавляют 10 капель дистиллированной воды, в другую — 10 капель раствора аскорбиновой кислоты. В пробирке с аскорбиновой кислотой раствор Люголя обесцвечивается в результате восстановления иода до йодоводородной кислоты.



## Лабораторное занятие 39

### Тема. Витамины E, K, кофермент Q.

**Цель:** Сформировать знания о строении и свойствах витаминов E, K и витаминного вещества кофермента Q.

*Исходный уровень.*

1) *Из курса органической химии:* знания строения и химических свойств хинонов (бензохиноны, нафтохиноны).

2) *Из курса химии природных соединений:* знания о строении изопренаидов.

3) *Из курса биохимии:* представления о строении витаминов E (токоферолы) и K (филлохиноны) о роли в организме кофермента Q; знания о биологической роли витаминов E и K и кофермента Q (в регуляции транспорта электронов и окислительного фосфорилирования).

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.
3. Тестовый контроль по темам 33-39

#### Обучающая задача 1

Рассмотрите обратимые окислительно-восстановительные реакции пар соединений: гидрохинон-хинон. Укажите, какую роль играют эти реакции в организме. В каких условиях они проводятся *in vitro*?

#### Решение

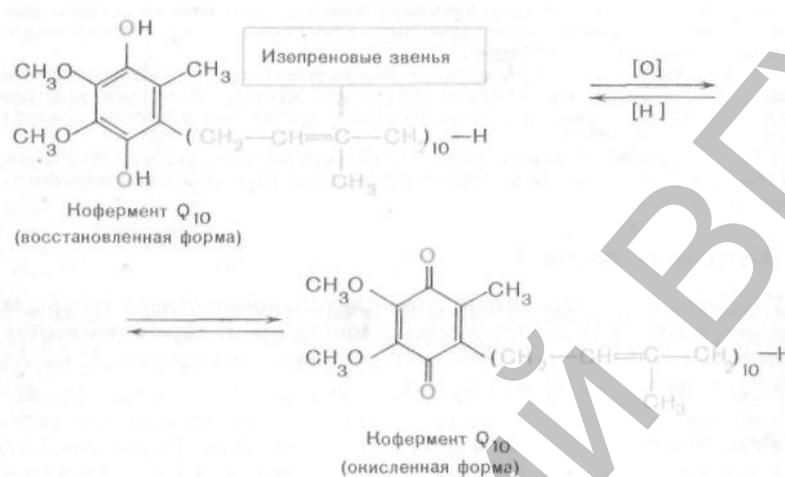
**Общий подход.** С биохимической точки зрения важны системы, в которых происходят обратимые окислительно-восстановительные реакции. Как правило, в таких системах функционируют соединения, способные к легкому взаимопревращению в результате окисления-восстановления. Легкость перехода из окисленной в восстановленную форму и обратимость таких реакций служат основой для их участия в жизненно важных биохимических процессах.

Гидрохинон (1,4-дигидроксibenзол) — двухатомный фенол, в котором гидроксильные группы расположены в *para*-положении. В результате окисления гидрохинона образуется циклический ненасыщенный кетон — *p*-бензохинон (называемый просто хиноном), при этом гидрохинон отдает два электрона и два протона; при восстановлении хинона происходит приобретение двух электронов и двух протонов.



Окислительно-восстановительная система гидрохинон-хинон лежит в основе действия коферментов Q (**убихиноны**), участвующих в переносе электронов в митохондриях в дыхательной цепи.

Коферменты различаются числом (от 6 до 10) изопреновых звеньев. Для млекопитающих наиболее важным является кофермент Q<sub>10</sub>.



### Лабораторная работа

#### Опыт 1. Реакция токоферола с хлоридом железа (III)

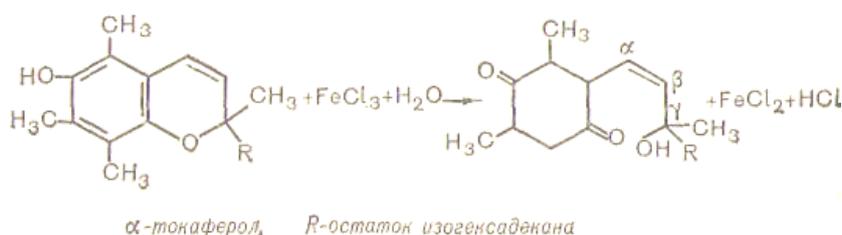
**Теоретическое введение.** Витамин Е существует в виде нескольких изомеров: α-, β- и γ-токоферолов. Изомеры отличаются друг от друга в основном порядком расположения метильных групп в бензольном кольце.

Токоферолы — маслянистые жидкости, растворимые в растительных маслах и жировых растворителях. Некоторые производные витамина Е участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, связанных с окислительным фосфорилированием. Витамин Е обладает антиоксидантными свойствами.

*Реактивы, оборудование, исследуемый материал:* 1. Витамин Е, 0,1% спиртовой раствор. 2. Хлорид железа 1 % раствор.

#### Реакция с хлоридом железа.

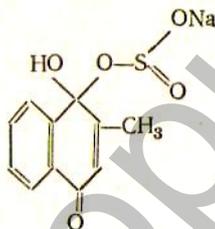
**Принцип метода.** Спиртовой раствор α-токоферола окисляется хлоридом железа (Fe<sup>3+</sup>) в *токоферилхинон* и раствор окрашивается в красный цвет:



**Ход работы.** В сухую пробирку берут 4—5 капель 0,1% спиртового раствора  $\alpha$ -токоферола, прибавляют 0,5 мл 1% раствора хлорида железа (III), тщательно перемешивают. Содержимое пробирки приобретает красное окрашивание.

Опыт 2. Реакция на витамин К

Известны два природных витамина —  $K_1$  и  $K_2$ , являющиеся производными нафтохинона. Витамин  $K_1$  *филлохинон*, желтоватая маслянистая жидкость,  $K_2$  представляет собой желтые кристаллы. Витамин К входит в состав простетической группы фермента, участвующего в биосинтезе протромбина. Протромбин — необходимый компонент в процессе свертывания крови. Витамин К содержится в митохондриях и регулирует процессы фосфорилирования. У здорового человека витамин К постоянно синтезируется кишечной микрофлорой. Витамин К — антигеморрагический витамин. Викасол — искусственно синтезированный аналог витамина  $K_1$  обладает биологической активностью витамина.



*Реактивы, оборудование, исследуемый материал:* 1. Викасол, 0,05% раствор. 2. Цистеин, 0,025% раствор (хранят в холодильнике). 3. Едкий натр, 10% раствор. 4. Часовые стекла.

#### **Реакция с щелочным раствором цистеина.**

Принцип метода. Викасол в присутствии цистеина в щелочной среде окрашивается в лимонно-желтый цвет.

**Ход работы.** На сухое часовое стекло наносят 5 капель раствора викасола, добавляют 5 капель раствора цистеина и 1 каплю 10% раствора едкого натра. Появляется лимонно-желтое окрашивание.

### **Лабораторное занятие 40**

#### **Тема. Витамины D. Растительные стеринны.**

**Цель:** Сформировать знания строения и свойств витаминов D, их провитаминов, растительных стериннов как производных циклопентанпергидрофенантрена.

*Исходный уровень.*

Из курса биохимии: 1) представления о химическом строении витамина D (кальциферолы), кальцитриола. 2) знания биологических функций витамина D, кальцитриола (биологически активная форма, механизм действия и регуляция фосфатно-кальциевого обмена).

### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Обучающая задача 1

Приведите структуру 24-метилхолестатриен-5,7,22-ола-3 $\beta$  (эргостерин) и напишите схему его фотохимической изомеризации. Какое физиологически активное соединение при этом образуется?

#### Решение

**Общий подход.** В поставленной задаче предлагается написать структуру стероида по его систематическому названию.

**Этап 1.** В основе предложенного соединения лежит углеводород холестерин (см. табл. 5), имеющий восьмиуглеродную цепь у С-17 и метальные группы у С-10 и С-13:

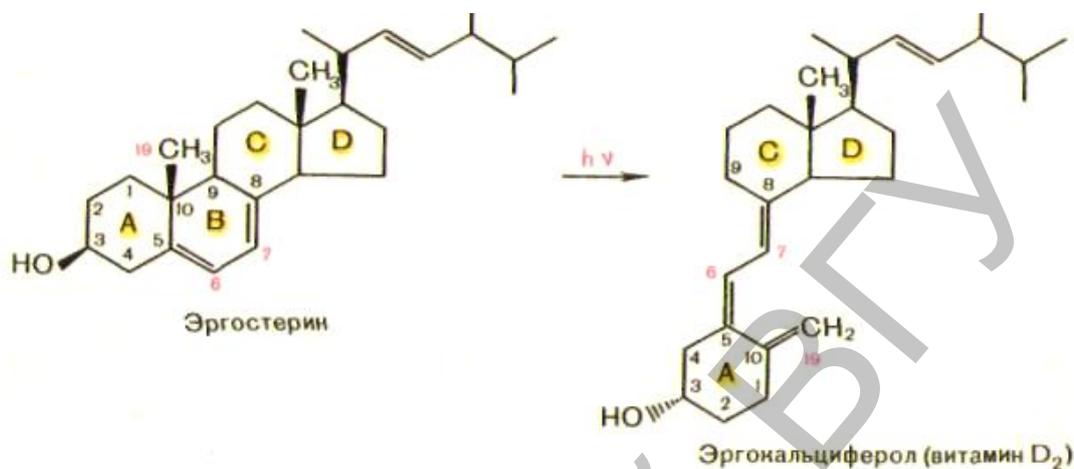


**Этап 2.** Из систематического названия эргостерина видно, что в структуре холестерина содержатся три двойные связи в положениях 5, 7, 22, метальная группа в положении 24 и гидроксильная группа в положении 3 ( $\beta$ -конфигурация). Метальные группы у С-10 и С-13, а также боковая цепь у С-17 в природных стероидах имеют  $\beta$ -конфигурацию:

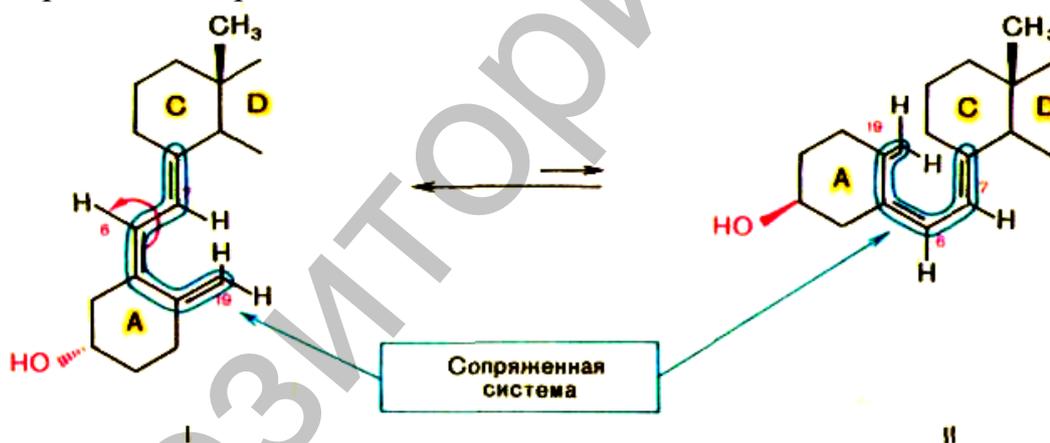


**Этап 3.** Эргостерин содержится в различных растительных и животных объектах, особенно много его в жире печени тресковых рыб. При облучении эргостерина УФ-светом происходит его изомери-

зация в *эргокальциферол* (витамин D<sub>2</sub>), сопровождающаяся разрывом кольца В:



В молекуле эргокальциферола возможно свободное вращение вокруг  $\sigma$ -связи С-6—С-7. При этом образуются два конформера I и II, содержащие сопряженные двойные связи:



У конформера II должны возникать значительные пространственные затруднения, вызванные отталкиванием метиленовой группы -CH<sub>2</sub>- и кольца С.

Действительно, методом рентгеноструктурного анализа установлено, что витамин D<sub>2</sub> преимущественно существует в виде конформера I.

**Заключение.** Эргостерин (24-метилхолестатриен-5,7,22-ол-3 $\beta$ ) при фотохимической изомеризации превращается в эргокальциферол (витамин D<sub>2</sub>).

Таблица 5. Родоначальные структуры стероидов

Группа стероидов	Родоначальная структура	Заместители		
		C-10	C-13	C-17
Эстрогенные гормоны	Эстран	—	CH <sub>3</sub>	—
Андрогенные гормоны	Андростан	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	—
Кортикостероиды	Прегнан	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Желчные кислоты	Холан	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CCNCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Стерины	Холестан	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H <sub>3</sub> CCNCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

### Лабораторная работа

#### Опыт 1. Качественная реакция на витамин D.

Принцип метода. Витамин D при взаимодействии с анилиновым реактивом при нагревании окрашивается в красный цвет, при взаимодействии с раствором брома в хлороформе — в зеленовато-голубой.

Реактивы, исследуемый материал: 1) анилиновый реактив (15 частей анилина и 1 часть концентрированной соляной кислоты); 2) хлороформ; 3) раствор брома в обезвоженном хлороформе в соотношении 1:60; 4) масляный раствор эргокальциферола — 1,25 г/л.

#### Ход работы

Реакция на витамин D с анилином. В сухую пробирку вносят 2 капли масляного раствора эргокальциферола, 10 капель хлороформа и 1—2 капли анилинового реактива, осторожно нагревают при постоянном помешивании. Отмечают результат реакции.

Реакция на витамин D с бромхлороформом. В сухую пробирку вносят 2—3 капли раствора эргокальциферола и 2—4 капли раствора брома в хлороформе. Отмечают полученный результат.

#### Опыт 2. Обнаружение стерина в растительном масле

Принцип метода. Реакции *Сальковского* и *Либермана-Бурхардта* не являются строго специфичными для стерина: их дают и другие вещества стерина природы (например, желчные кислоты, смоляные кислоты и др.). Более специфичной реакцией для стерина некоторые авторы считают *реакцию Витби*, в которой используется формальдегид. Химизм реакции тот же, что и в двух предыдущих реакциях.

Ход работы. В сухую пробирку вносят 2 капли подсолнечного масла и 20 капель хлороформа. К раствору масла добавляют 20 капель смеси концентрированной серной кислоты с формалином (50:1) и

взбалтывают. Раствор разделяется на два слоя: хлороформный вишневого цвета и слой серной кислоты красно-коричневого цвета с зеленой флюоресценцией. Из верхнего хлороформного слоя отбирают 5—6 капель в сухую пробирку и добавляют 1—2 капли уксусного ангидрида. Жидкость окрашивается в синий цвет, постепенно переходящий в зеленый.

## Лабораторное занятие 41 Тема. Желчные кислоты.

**Цель:** Сформировать знания строения и свойств желчных кислот как стероидов.  
*Исходный уровень.*

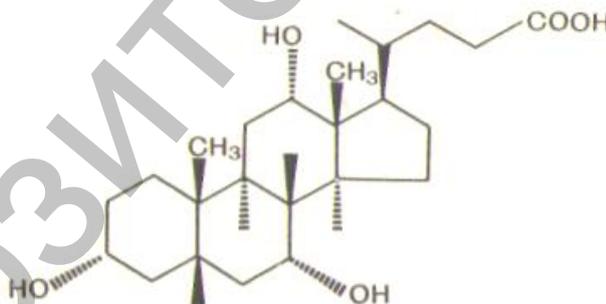
*Из курса биохимии: представления о строении желчных кислот; знания о роли желчных кислот в переваривании липидов и всасывании продуктов переваривания.*

### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

### Обучающая задача 1

К какому классу принадлежит соединение, формула которого приведена ниже? Назовите это соединение.



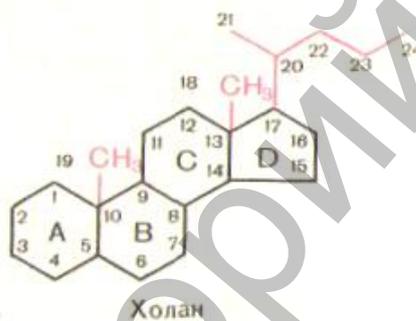
### Решение

**Общий подход.** Наличие в соединении четырех алициклов, составляющих так называемую **стерановую** группировку, позволяет отнести его к классу стероидов.



Для составления систематического названия стероида нужно выбрать и пронумеровать *родоначальную структуру*, т. е. углеводородную основу. Затем с помощью префиксов и суффиксов отразить наличие заместителей, характеристических групп и кратных связей, указав их количество и местоположение в углеродном скелете. Насыщенные алициклические углеводороды, составляющие структурную основу каждой группы стероидов, характеризуются наличием определенных алкильных заместителей в положениях 10, 13 и 17 *стеранового ядра*

**Этап 1.** Наличие в положении 17 углеродной цепочки из пяти атомов, а в положениях 10 и 13 — метальных групп позволяет отнести предложенное соединение к производным углеводорода *холана* (см. табл. 5).



**Этап 2.** Перечислив названия заместителей и указав их местоположение в углеродном скелете и пространственное расположение ( $\alpha$  или  $\beta$ ), а также конфигурацию C-5 (тип сочленения колец А и В), получаем систематическое название соединения —  $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- $5\beta$ -холановая кислота (*холевая кислота*).

В химии стероидов используется специфическая относительная стереохимическая номенклатура, так называемая  *$\alpha, \beta$ -система* обозначения конфигурации хиральных атомов углерода. Число таких атомов в молекулах стероидов, как правило, довольно велико (например, в молекуле холевой кислоты—11).

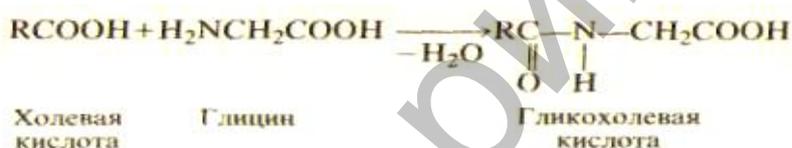


В качестве эталона, с которым сравнивается конфигурация каждого хирального центра, выбран С-13 (обведен кружком) — атом углерода, конфигурация которого у большинства природных стероидов одинакова.

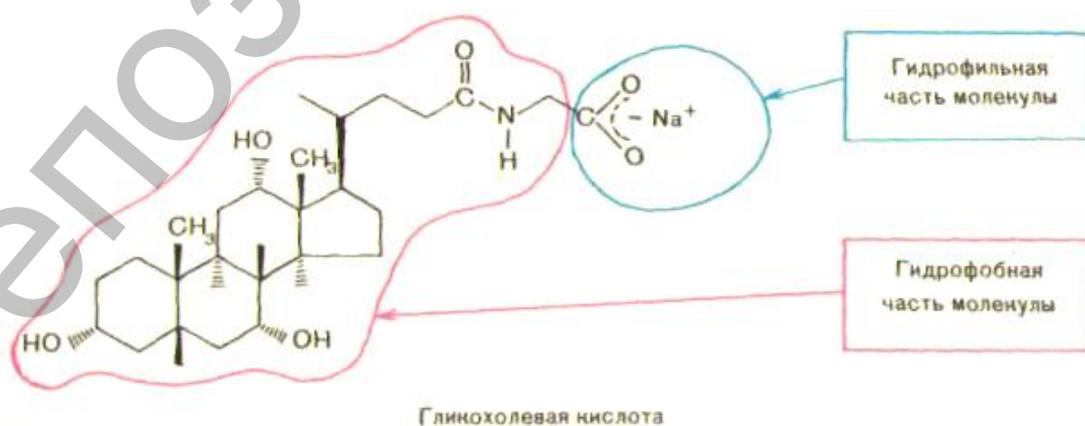
$\beta$ -Заместители имеют конфигурацию, одинаковую с конфигурацией С-13,  $\alpha$ -заместители — противоположную;  $\beta$ -заместители располагаются выше плоскости стеранового скелета,  $\alpha$ -заместители — ниже. Связи с  $\beta$ -заместителями изображаются сплошной линией, с  $\alpha$ -заместителями — штриховой.

D,L-Стереохимическая номенклатура в случае стероидов не применяется, поскольку трудно соотнести конфигурацию атомов углерода в алициклической системе с конфигурацией ациклического глицеринового альдегида.

Холевая кислота относится к группе желчных кислот. В организме холевая и другие желчные кислоты ацилируют глицин и некоторые другие аминокислоты.



Натриевая и калиевая соли гликохолевой кислоты и подобных ей соединений обладают поверхностно-активными свойствами и эмульгируют жиры. Кроме того, они активируют липазу — фермент, катализирующий гидролиз жиров.



**Заключение.** Предложенное соединение относится к группе желчных кислот класса стероидов, по систематической номенклатуре называется  $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- $5\beta$ -холановая кислота; тривиальное название — холевая кислота.

## Лабораторное занятие 42

### Тема. Половые гормоны.

**Цель:** Сформировать знания о строении и свойствах половых гормонов как стероидных гормонов, о синтетических андрогенных препаратах анаболиках.

*Исходный уровень.*

*Из курса биохимии: представления строения половых гормонов; знания о их биосинтезе, регуляции, недостаточности и избытке гормонов.*

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.

#### **Обучающая задача 1**

Приведите пространственное строение мужского полового гормона андростерона (3 $\alpha$ -гидрокси-5 $\alpha$ -андростанон-17).

#### **Решение**

**Общий подход.** В основе андростерона лежит система стерана, построенная из четырех насыщенных карбоциклов — трех циклогексановых (А, В, С) и одного циклопентанового (D).



Стеран имеет 6 хиральных атомов углерода, поэтому теоретически он может существовать в виде 64 стереоизомеров ( $2^6=64$ ). Различная конфигурация хиральных атомов углерода возникает в результате различного сочленения колец А, В, С и D.

**Этап 1.** Сочленение циклогексановых колец может осуществляться двумя путями. В одном случае в образовании конденсированной системы участвуют две экваториальные связи цикла А (кольца находятся в выгодной конформации *кресла*).



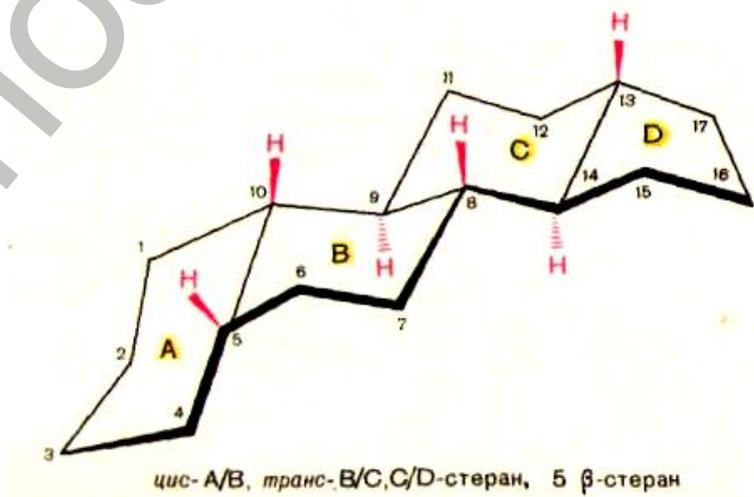
При этом атомы водорода у С-5 и С-10 находятся относительно друг друга в *транс*-положении. Этот способ сочленения колец называется *транс-сочленением*.

В другом случае в образовании новой циклической системы участвует одна аксиальная и одна экваториальная связь кольца А.



Такой тип сочленения называется **цис-сочленением** — водородные атомы у С-5 и С-10 при этом располагаются по одну сторону от плоскости декалиновой системы.

**Этап 2.** Теоретически возможны 8 различных комбинаций *цис*- и *транс*-сочленения трех пар колец А/В, В/С и С/Д. Однако в природных стероидах далеко не все из них реализуются. В основном встречаются две комбинации—*транс*-сочленение каждой пары колец (5 $\alpha$ -стеран) и *цис*-А/В, *транс*-В/С и С/Д (5 $\beta$ -стеран).

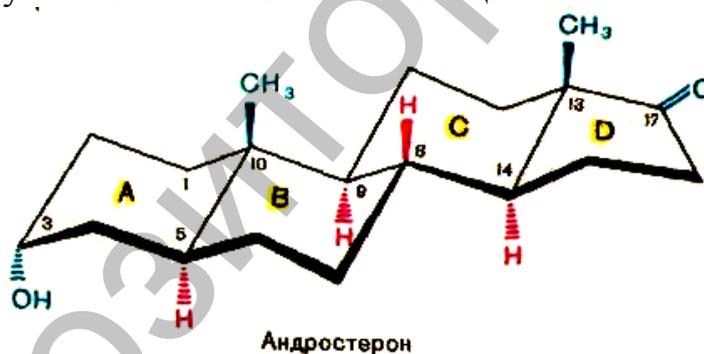


В большинстве случаев сочленение колец осуществляется по *транс*-типу, которое термодинамически более выгодно, чем *цис*-сочленение. Так, *транс*-декалин на 11,5 кДж/моль более выгоден, чем *цис*-декалин, что объясняется наличием в последнем трех дополнительных *гош*-бутановых взаимодействий.

В природных стероидах сочленение колец А и В является характерным признаком той или иной группы, например, *цис*-А/В-сочленение характерно для желчных кислот и агликонов сердечных гликозидов, *транс*-А/В- — для мужских половых гормонов.

По типу сочленения колец А и В стероиды делятся на два стереохимических ряда —  $5\alpha$ -стероиды, имеющие *транс*-А/В-сочленение, и  $5\beta$ -стероиды, имеющие *цис*-А/В-сочленение. Поскольку С-5 в андростероне имеет  $\alpha$ -конфигурацию, делаем вывод о том, что кольца А и В в нем сочленены по *транс*-типу.

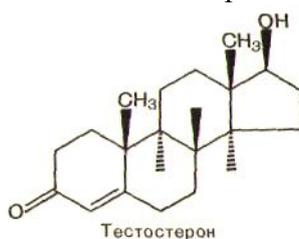
**Этап 3.** Для получения конформационной формулы андростерона необходимо в  $5\alpha$ -стерановый скелет ввести замещающие группы, отразив при этом конфигурацию хиральных центров. Металльные группы у С-10 и С-13 следует расположить выше плоскости стеранового скелета ( $\beta$ -конфигурация), ОН-группу — ниже плоскости ( $\alpha$ -конфигурация). С-17 находится в  $sp^2$ -гибридизации, поэтому карбонильная группа лежит в плоскости кольца.



**Заключение.** В основе андростерона (3 $\alpha$ -гидрокси-5 $\alpha$ -андростанон-17) лежит  $5\alpha$ -стеран, имеющий *транс*-А/В, В/С, С/Д-сочленение колец.

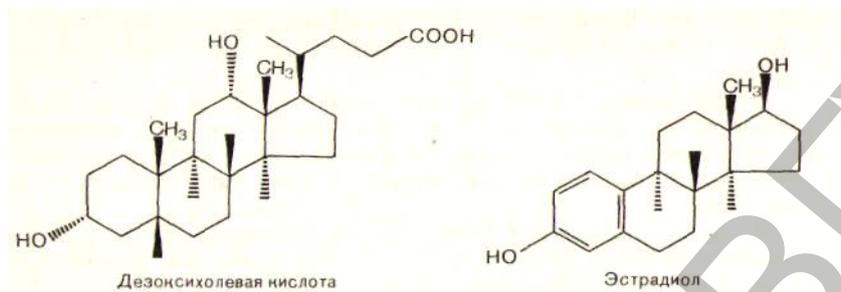
### Задачи для самостоятельного решения

1. Изобразите конформационную формулу мужского полового гормона тестостерона.



2. Приведите строение предельных углеводов, лежащих в основе женских и мужских половых гормонов.

3. Систематическое название эстрогенного гормона эстрадиола—3,17β-дигидроксиэстратриен-1,3,5(10). Приведите его структуру.
4. Изобразите конформационную формулу женского полового гормона эстрадиола



### Лабораторная работа Качественные реакции на эстрон (фолликулин).

Качественная реакция на фолликулин (эстрон) проводится с концентрированной серной кислотой и обусловлена образованием эфирного соединения соломенно-желтого цвета с зеленой флюоресценцией.

Реактивы, оборудование и исследуемый материал:  
1. Серная кислота концентрированная. 2. Едкий натр, 30% раствор. 3. Реактив Фолина. 4. Капельницы. 5. Флюороскоп (модель 833) М-РТУ-42. 6. Фолликулин, спиртовой или масляный раствор.

Порядок выполнения работы. 1. Реакция с концентрированной серной кислотой. В пробирку наливают 20—30 капель спиртового раствора фолликулина и помещают ее в кипящую водяную баню на 5—10 мин для удаления спирта. К оставшемуся в пробирке фолликулину добавляют 20 капель концентрированной серной кислоты и ставят пробирку вновь в кипящую водяную баню на 5—10 мин. Жидкость в пробирке постепенно приобретает соломенно-желтое окрашивание, переходящее при нагревании в оранжевое; поднося пробирку к флюороскопу, наблюдают в ней зеленую флюоресценцию. С масляным раствором фолликулина реакцию проводят при комнатной температуре. К 2 каплям масляного раствора фолликулина приливают 30 капель концентрированной серной кислоты,— постепенно развивается соломенно-желтое окрашивание.

2. Реакция на фенольную группу с реактивом Фолина. К 2 каплям фолликулина приливают 1 каплю 30% раствора щелочи и 1 каплю реактива Фолина. Появляется синее окрашивание, обусловленное наличием фенольной группировки.

## Лабораторное занятие 43

### Тема. Гормоны коры надпочечников.

**Цель:** Сформировать знания о строении и свойств гормонов коры надпочечников как стероидных гормонов, химического синтеза их аналогов и ингибиторов.

*Исходный уровень.*

*Из курса биохимии: представления о строении глюкокортикоидов и минералокортикоидов; знания о биосинтезе, регуляции, недостаточности и избытке гормонов.*

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач.
2. Лабораторная работа.
3. Тестовый контроль (по темам 40-43).

#### **Задачи для самостоятельного решения**

1. Приведите строение и название предельного углеводорода, лежащего в основе кортикостероидов, пронумеруйте его углеродный скелет.
2. Приведите структуру и тривиальное название 17 $\alpha$ ,21-дигидроксипрегнен-4-триона-3,11,20.

#### **Лабораторная работа**

##### **Опыт 1. Обнаружение 17-кетостероидов в моче**

Принцип метода. Основан на реакции 17-кетостероидов с метадинитробензолом в щелочной среде с образованием продуктов конденсации фиолетово-розового цвета.

*Реактивы, исследуемый материал:* 1) едкий натр, 30% раствор; 2) метадинитробензол, 2% спиртовой раствор; 3) моча.

**Ход работы.** Качественное определение 17-кетостероидов в моче проводят только в сухих пробирках и сухими пипетками. К 20 каплям мочи приливают 30 капель раствора метадинитробензола, взбалтывают и добавляют 6 капель раствора едкого натра до появления вишнево-фиолетового окрашивания (2 мин).

##### **Опыт 2. Обнаружение кортикостероидов в сыворотке крови.**

Принцип метода. Гормоны коры надпочечников можно обнаружить в сыворотке крови благодаря их способности флюоресцировать в серной кислоте.

Все другие вещества, флюоресцирующие в этих условиях, должны быть предварительно удалены.

*Реактивы, исследуемый материал:*

1) петролейный эфир; 2) хлороформ; 3) раствор едкого натра — 4 г/л; 4) концентрированная серная кислота; 5) сыворотка крови.

**Ход работы.**

Удаление из исследуемого материала веществ, мешающих определению. В пробирку вносят 10—15 капель сыворотки крови, добавляют равный объем петролейного эфира. Пробирку закрывают пробкой и

встряхивают в течение 2 мин. Дают разделиться слоям сыворотки и петролейного эфира, верхний слой которого отсасывают пипеткой с резиновой грушей и отбрасывают.

Экстракция стероидов хлороформом. В пробирку с оставшейся сывороткой добавляют хлороформ до половины пробирки, закрывают пробирку пробкой и встряхивают содержимое в течение 30 с. Затем дают слоям сыворотки и хлороформа разделиться. Верхний слой — сыворотку — отсасывают пипеткой с резиновой грушей и отбрасывают. Стероиды, экстрагированные хлороформом, обрабатывают далее.

Удаление из хлороформного экстракта женских половых гормонов. Хлороформный экстракт содержит кортикостероиды и женские половые гормоны, также флюоресцирующие в серной кислоте, поэтому их необходимо удалить. Для удаления эстрогенов к хлороформному экстракту добавляют 5—6 капель раствора едкого натра, закрывают пробирку пробкой, перемешивают содержимое пробирки встряхиванием в течение 15 с. После этого верхний слой — щелочи — быстро отсасывают пипеткой с резиновой грушей и отбрасывают. Удаление щелочи производят быстро, так как кортикостероиды неустойчивы в щелочной среде.

Обработка экстракта серной кислотой и флюороскопия. К хлороформному экстракту добавляют 10—15 капель серной кислоты, пробирку закрывают пробкой, встряхивают в течение 1 мин. Затем оставляют на 15—30 мин. Перед флюороскопом наблюдают флюоресценцию нижнего слоя жидкости, вызванную присутствием кортикостерона и гидрокортизона.

#### Лабораторное занятие 44

#### Тема. Применение спектроскопии кругового дихроизма в биоганической химии

**Цель:** Сформировать умение использовать данные спектрофотометрии и спектроскопии для исследования структуры пептидов и белков и других природных соединений.

*Исходный уровень. Из курса физико-химические методы анализа(ФХМА):*

- 1) знания теоретических основ спектрофотометрии, принципа работы приборов, возможности использования в биохимии; понятие о методе КД.
- 2) навыки работы с спектрофотометром, фотоколориметром.

#### План занятия

Решение ситуационных задач по анализу спектров.

## Лабораторное занятие 45

### Тема. Применение ИК-спектроскопии и спектроскопии КР в биологической химии.

**Цель:** Сформировать умение использовать данные ИК и КР спектров для анализа структуры пептидов и белков.

*Исходный уровень. Из курса ФХМА:*

*знание теоретических основ ИК-спектроскопии и спектроскопии КР, принципы работы приборов, возможности использования в биохимии.*

#### План занятия

1. Решение ситуационных задач по расшифровке спектров.
2. Тестовый контроль (по темам 44, 45).

## Лабораторное занятие 46

### Тема. Рентгеноструктурный анализ (РСА) и электронная микроскопия в биологической химии.

**Цель:** Сформировать представления о использовании РСА и электронной микроскопии для изучения белков и нуклеиновых кислот.

*Исходный уровень: представления о методе электронной микроскопии из курсов ботаники и физиологии растений.*

#### План занятия

- Решение ситуационных задач по интерпретации данных РСА и электронной микроскопии.

## Лабораторное занятие 47

### Тема. Спектроскопия ЭПР и ЯМР в биологической химии.

**Цель:** Сформировать представления о связи параметров спектров ЯМР и ЭПР с химической и пространственной структурой биомолекул.

*Исходный уровень. Из курса ФХМА:*

*знания теоретических основ ЯМР-спектроскопии, понятие об ЭПР-спектроскопии.*

#### План занятия

- Решение ситуационных задач по расшифровке спектров ЯМР и ЭПР биомолекул.

## Лабораторное занятие 48

### Тема. Компьютерное моделирование биомолекул.

**Цель:** Сформировать представления о методах компьютерного моделирования биомолекул.

*Исходный уровень: знания о природе сил стабилизирующих пространственную структуру биополимеров*

#### План занятия

- Работа с компьютерной программой.