

## **РУКОВОДСТВО К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ ПО ДИСЦИПЛИНЕ «ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ЖИЗНИ»**

Дисциплина “Химические основы жизни” включена в цикл общепрофессиональных дисциплин для студентов–химиков по рекомендации Госкомитета РФ по высшему образованию для государственных университетов. В отличие от традиционно изучаемой биологами дисциплины “Общая биохимия” курс “Химические основы жизни” ставит своей задачей ознакомить студентов-химиков с современными аспектами химии живой материи. Химическая направленность преобладает не только в Программе дисциплины, но и должна найти свое отражение в Лабораторном практикуме.

Целью настоящего руководства является ознакомление студентов-химиков с биологически-активными молекулами природного происхождения – белками и углеводами.

Характерной особенностью всех опытов является проведение их с малыми количествами веществ, что позволяет существенно экономить материалы, а во многих случаях и упростить применяемую аппаратуру. Показательность и методическая ценность результатов опыта при этом отнюдь не снижаются. В то же время операции с небольшим количеством вещества требуют аккуратности, тщательности и чистоты в работе, т. е. вырабатывают у студента практические навыки, полезные для его последующей работы по любой специальной дисциплине.

Каждая работа снабжена описанием материалов, реактивов и методикой выполнения, а также примечанием.

Приступать к выполнению работ можно лишь после тщательного ознакомления с его описанием, и после подготовки всего требуемого оборудования и материалов. На рабочем столе, кроме них, может находиться только тетрадь-дневник для записи работы. Учебные пособия лучше помещать в ящик стола.

Нагревание пробирок и других стеклянных сосудов следует производить очень осторожно и постепенно; перед нагреванием на голом

огне или на сетке сосуд должен быть вытерт снаружи насухо. При кипячении какой-либо жидкости отверстие сосуда следует направлять в сторону как от самого работающего, так и от соседей. При нагревании концентрированных кислот желательно работать в очках.

Работу с эфиром, бензолом, спиртом и другими легко воспламеняющимися жидкостями следует проводить вдали от огня. При воспламенении подобных веществ в стакане, чашке или другом сосуде его плотно прикрывают стеклянным, фарфоровым или металлическим предметом, либо просто деревянной дощечкой, после чего пламя обычно быстро тухнет. Если горящая жидкость разлилась по столу или по полу, ее тушат сухим песком, запас которого в ящиках с совками должен постоянно находиться в каждой лаборатории. Никогда не следует задуть пламя.

При легких горячих ожогах обожженное место смазывают глицерином или прикладывают к нему вату, смоченную спиртом. На более сильные ожоги сразу же накладывают вату или марлю, обильно смоченную насыщенным водным раствором пикриновой кислоты, либо таким же раствором марганцовокислого калия, либо 50%-ным раствором таннина; этим путем обычно удастся быстро успокоить боль и предотвратить образование пузыря. При попадании на кожу или одежду кислот и щелочей необходимо немедленно обмыть пораженное место большим количеством воды, затем 3%-ным раствором бикарбоната натрия (при попадании кислоты) или 1—2%-ной уксусной кислотой (при попадании щелочи). При сильных ожогах кислотами или щелочами после такого обмывания на обожженное место накладывают повязку, смоченную одним из указанных выше растворов, применяемых при горячих ожогах.

При попадании брызг в глаз его промывают водой, а затем 3%-ным раствором бикарбоната (если попала кислота) или насыщенным раствором борной кислоты (если попала щелочь).

При порезах стеклом удаляют из ранки осколки, смазывают ее спиртовым раствором иода и перевязывают.

Все перечисленные растворы, а также перевязочные материалы, должны обязательно находиться в помещении лаборатории и храниться в специальном шкафчике.

При любом несчастном случае работающие в лаборатории студенты, самостоятельно принимая сразу же необходимые меры, должны немедленно обратиться к преподавателю или лаборанту.

## **ТЕМА 1. БЕЛКОВЫЕ ВЕЩЕСТВА**

### **Работа 1. Получение исходных материалов**

Для изучения свойств и характерных реакций белков удобно применять в опытах свежеизготовленные растворы различных белков из легко доступных природных продуктов.

*А. Яичный белок.* Белок одного куриного яйца (около 25 мл) смешивают в колбочке при встряхивании с 100—130 мл дистиллированной воды; смесь фильтруют через смоченный водой кусок полотна, свободно уложенный в воронку в виде мешочка. Края куса материи должны лежать складками на краях воронки, а не свешиваться наружу. Полотно применяют лишь предварительно подвергавшееся стирке, т. е. отмытое от аппретуры.

Довольно быстро отфильтровывается слегка опалесцирующий раствор яичного альбумина с небольшой примесью глобулина; на полотне остается главная часть яичного глобулина, а также сгустки и пленки.

Раствор альбумина используют для опытов.

*Б. Белки мяса.*

1. К 25 г свежего мяса, пропущенного через мясорубку и помещенного в стакан, добавляют 50 мл воды; смесь оставляют стоять 20—30 мин., часто перемешивая ее палочкой, после чего переносят в воронку на складчатый бумажный фильтр. Быстро отфильтровывается раствор альбумина с примесью глобулина, окрашенный пигментами крови в красный цвет, что не мешает использованию его для опытов.

2. Оставшееся на фильтре мясо промывают 2—3 раза водой и хорошо отжимают; промывные воды отбрасывают. Побелевшие мышечные волокна переносят в стакан и заливают 15%-ным водным раствором хлористого аммония (60—70 мл). Смесь оставляют на 30—40 мин., часто перемешивая ее палочкой, и затем переносят в воронку на сухой складчатый фильтр. Фильтрация происходит медленно; полученный раствор глобулина мяса — миозина — применяют для опытов; при разбавлении водой он мутится и выделяет осадок миозина.

### *В. Белки молока.*

1. К 60 мл молока добавляют равный объем воды и затем по каплям, при помешивании, 0,2—0,3 мл концентрированной уксусной кислоты до образования хлопьев. Через 5-10 мин. смесь фильтруют через полотно {см А). Фильтрация идет быстро; для большей прозрачности первые, мутные, порции фильтрата пропускают через полотно повторно. Полученный чуть желтоватый прозрачный раствор содержит альбумин и часть глобулина молока, а также молочный сахар.

2. Остаток на фильтре, имеющий консистенцию жидкой сметаны, состоит главным образом из казеина, смешанного с жиром. Для получения раствора казеина к этому остатку (или к 5—6 г продажного творога, растертого в ступке с 10—15 мл воды) добавляют 1 мл 30%-ного раствора щелочи. Щелочную смесь слегка растирают в ступке, приливая воду до общего объема 25—30 мл, и фильтруют через складчатый бумажный фильтр, предварительно хорошо смоченный водой. Первые, мутные, порции фильтрата пропускают через тот же фильтр повторно. В этих условиях капли жира остаются на фильтре.

3. Раствор молочного альбумина (содержащий и молочный сахар) можно также получить, добавляя к свежему молоку равный объем насыщенного раствора серноокислого аммония. При этом образуются хлопья казеина и глобулина, захватывающие с собой и жир. Фильтрация через

складчатый бумажный фильтр идет быстро и дает вполне прозрачный фильтрат, показывающий все реакции альбуминов.

Г. *Растительный альбумин.* 25 г пшеничной муки смешивают с 100 мл воды и оставляют смесь на 30—40 мин. при частом встряхивании, после чего переносят ее в воронку на большой складчатый фильтр. Первые, мутные, порции сливают на фильтр повторно. Довольно быстро получают 60—70 мл прозрачного раствора, содержащего главным образом альбумин пшеничных зерен — лейкозин.

Д. *Желатина.* Растворяют 1 г желатины в 100 мл воды при нагревании и добавляют 0,5 мл 5%-ного раствора едкого натра.

Каждый из описываемых далее опытов целесообразно проводить одновременно с несколькими растворами различных белков. Эти растворы, после их приготовления, остаются пригодными для опытов в течение нескольких дней; наиболее быстро (за 2—3 дня при комнатной температуре) портится водная вытяжка из мяса. Порчу растворов белков удастся замедлить добавлением капли толуола.

Растворы миозина и казеина имеют наиболее высокую концентрацию белка, а растворы лейкозина и водорастворимых белков молока наиболее разбавлены.

Щелочные растворы белков (казеин, желатина) при проведении 4 и 8 работы следует предварительно осторожно нейтрализовать, добавляя к пробе раствора разбавленную уксусную кислоту до появления слабой опалесценции (казеин) или до порозовения лакмусовой бумаги (желатина). Для остальных опытов щелочные растворы белков можно применять без нейтрализации (см. также работу 2).

## **Работа 2. Отношение белков к кислотам и щелочам**

Материалы:

растворы белков;

уксусная кислота (концентрированная);

сернокислый аммоний (15%-ный раствор);

гидроксид натрия (5%-ный раствор).

К 2—3 мл раствора белка добавляют уксусную кислоту по каплям, при встряхивании. Во всех растворах (кроме раствора желатины) наблюдается выпадение белка в осадок в виде мути или хлопьев. При дальнейшем добавлении кислоты осадок белка снова растворяется.

Полученный кислый раствор делят на две части. Одну из них нагревают до кипения; в отличие от исходного раствора (см. работу 5) свертывания белка не наблюдается. Добавление к горячей кислой жидкости 1—2 капель раствора сульфата аммония вызывает свертывание.

К другой части кислого раствора белка осторожно добавляют раствор щелочи по каплям при встряхивании. При постепенной нейтрализации избытка кислоты образуется осадок белка, снова растворяющийся в избытке щелочи. Добавив 1—2 мл раствора щелочи, нагревают полученную щелочную жидкость до кипения; при этом свертывания белка не наблюдается.

Если раствор белка не слишком разбавлен, то при кипячении с избытком щелочи обнаруживается отщепление аммиака и сероводорода (см. работу 12).

### **Примечание к работе 2**

Белки являются коллоидными амфотерными электролитами; основные свойства обусловлены наличием аминного азота, а кислотные свойства — главным образом присутствием карбоксильных групп:

В большинстве случаев константа диссоциации белка как кислоты слегка превышает константу диссоциации того же белка как основания; поэтому частица чистого белка в водном растворе обычно заряжена отрицательно. При постепенном подкислении такого раствора степень кислотной диссоциации белка снижается (влияние избытка  $H^+$ ), а степень основной диссоциации повышается (связывание  $HO^-$ ). При достижении равенства концентраций положительной и отрицательных частиц белка коллоидный раствор белка оказывается наименее устойчивым и особенно

легко коагулирует, т. е. свертывается. Отвечающая этой «изоионной точке» концентрация протонов в растворе является величиной, характерной для данного белка. Isoионные точки белков, применяемых в описанной работе, лежат в пределах рН 4,5—6,5.

Добавление избытка кислоты, т. е. уменьшение рН ниже изоионной точки, резко усиливает диссоциацию белка как основания, частицы белка заряжаются положительно, и коллоидный раствор белка снова делается более устойчивым. Наоборот, избыток щелочи повышает устойчивость отрицательно заряженных коллоидных частиц белка.

Желатина в условиях опыта не коагулирует.

### **Работа 3. Осаждение белков концентрированными минеральными кислотами**

Материалы;

растворы белков;

азотная кислота (концентрированная, пл. 1,4);

соляная кислота (концентрированная, пл.1,18).

Наливают в одну пробирку 1 мл азотной кислоты, а в другую 1—2 мл соляной кислоты. Наклоняя каждую пробирку, осторожно влипают в нее по стенке 1 —1,5 мл исследуемого раствора белка так, чтобы он не смешивался с более тяжелым слоем кислоты; затем ставят пробирку в штатив. На границе раздела двух жидкостей сразу или постепенно появляется белое кольцо осадка белка. При встряхивании количество осадка, выпавшего при действии азотной кислоты, заметно увеличивается, а осадок, выпавший при действии соляной кислоты, растворяется в ее избытке.

Желатина в условиях опыта не осаждается минеральными кислотами.

#### **Примечание к работе 3**

Концентрированные минеральные кислоты образуют с белками солеобразные соединения за счет аминогрупп белковой молекулы и одновременно вызывают необратимые изменения (денатурацию) белка и выделение осадка. В большинстве случаев этот осадок растворим в избытке

кислоты (за исключением осадка, выпадающего при действии азотной кислоты).

Из фосфорных кислот лишь метафосфорная кислота  $\text{HPO}_3$  осаждает белок в описанных условиях, даже в более разбавленных растворах; этим путем можно обнаруживать наличие метафосфорной кислоты в присутствии других фосфорных кислот — ортофосфорной  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , и пиррофосфорной  $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$

#### **Работа 4. Высаливание белков из растворов**

Материалы:

растворы белков;

серноокислый аммоний насыщенный (примерно 43%-ный раствор);

серноокислый аммоний (в порошке).

К 3—4 мл раствора белка добавляют равный объем насыщенного раствора серноокислого аммония и слегка встряхивают смесь. Появляется муть или хлопья выпадающих в осадок глобулинов. Отлив около 1 мл мутной жидкости отдельную пробирку, добавляют в нее 2—3 мл воды; встряхивании осадок белка снова растворяется.

Главную часть полученной мутной жидкости фильтруют через сухой складчатый фильтр. Прозрачный фильтрат делят на две части. Одну часть фильтрата нагревают до кипения и наблюдают свертывание (ср. работу 5) находящегося в растворе белка, который выделяется в виде хлопьев или мути. К другой части фильтрата добавляют при легком встряхивании 1—2 г серноокислого аммония в порошке до прекращения его растворения. При этом в жидкости над небольшим осадком избытка кристаллов соли появляется муть или хлопья высокоосажденного белка. При последующем добавлении двойного объема воды выделившийся осадок снова растворяется.

Раствор миозина почти не содержит альбуминов, поэтому опыт с ним заканчивают на стадии образования сгустка белка при добавлении



насыщенного раствора сульфата аммония; при последующем добавлении воды высоланный миозин растворяется плохо.

#### **Примечание к работе 4**

Соли щелочных металлов и магния при достаточно высокой их концентрации осаждают — «высаливают» — многие белки из их растворов. Причинами высаливания белков являются как снятие электрического заряда коллоидных частиц белка адсорбирующимися на них противоположно заряженными ионами соли, так и снятие водных оболочек с гидрофильных частиц белка сильно гидратирующимися ионами добавленной в большом количестве соли. Оба указанных фактора уменьшают устойчивость коллоидного раствора, так как облегчают слипание и укрупнение (коагуляцию) частиц белка, и последний выпадает в осадок. Серноокислый аммоний обладает особенно резко выраженной высаливающей способностью и осаждают белки как в слабокислой, так и в нейтральной среде; в случае других солей, например, хлоридов и сульфатов натрия и магния, для полноты высаливания требуется подкисление раствора (ср. работу 2); при применении серноокислого аммония легкое подкисление также резко усиливает высаливание.

Различные белки высаливаются с неодинаковой легкостью. При добавлении к раствору белка равного объема насыщенного раствора сульфата аммония в жидкости получается вдвое меньшая концентрация его. В таком «полунасыщенном» растворе этой соли глобулины выпадают в осадок и могут быть отделены от остающихся в растворе альбуминов. В насыщенном растворе сульфат аммония высаливает и альбумины.

Осаждение белков солями щелочных металлов и магния не сопровождается денатурацией, т. е. изменением структуры молекул белка:

поэтому такое осаждение — высаливание — обратимо, и полученные осадки при добавлении воды снова переходят в раствор.

### **Работа 5 Свертывание белков при нагревании**

Материалы:

растворы белков;

сернокислый аммоний (15%-ный раствор);

уксусная кислота (концентрированная);

гидроксид натрия (10%-ный раствор).

В пробирку наливают 2—3 мл раствора исследуемого белка и нагревают его в пламени горелки до кипения в течение 0,5—1 мин. Большинство белков при этом выпадает в осадок; в виде мути или хлопьев. Затем слегка охлаждают жидкость, делят ее на две части и добавляют к одной из них 1-2 капли уксусной кислоты, а к другой—1-2 капли раствора сернокислого аммония. Снова нагревают обе смеси до начала кипения; при этом в обеих пробирках количество свернувшегося белка заметно увеличивается.

К слегка охлажденной смеси в одной из пробирок добавляют при встряхивании сначала равный объем воды, затем 1 мл раствора щелочи. Хлопья свернувшегося белка нерастворимы в воде, а в щелочи быстро растворяются. Щелочной раствор при кипячении уже не обнаруживает свертывания белка.

Раствор желатины при нагревании не свертывается даже в присутствии соли.

#### **Примечание к работе 5**

Свертывание белков — выпадение их в осадок при кипячении растворов — характерно для большинства представителей этого класса соединений. Наиболее легко происходит свертывание в слабо кислой среде, вблизи от изоионной точки (см. работу 2), хуже в нейтральной среде, а в щелочной среде обычно совсем не наблюдается, Казеин, являющийся кислотой, в нейтральном растворе находится в виде соли и для свертывания

при кипячении требует слабого подкисления. Добавление нейтральных солей (сернокислый аммоний, хлористый натрий и др.) облегчает и ускоряет свертывание белков при кипячении; наоборот, добавление сахаров, многоатомных спиртов, многих альдегидов, кетонов, аминов защищает белки от свертывания.

Осаждение белка в результате свертывания необратимо, и полученные осадки уже нерастворимы ни в воде, ни в растворах солей. Свертывание белка при кипячении обусловлено способностью крупных белковых молекул изменять структуру — «денатурироваться» — при 80—100°. При последовательном расщеплении молекулы белка, например, при его гидролизе, способность белка свертываться постепенно ослабевает вплоть до полного исчезновения. Желатина не свертывается при кипячении ее раствора. Нейтральный раствор желатины при охлаждении легко застудневает; после длительного кипячения способность к застудневанию при охлаждении исчезает.

#### **Работа 6. Осаждение белков солями тяжелых металлов**

Материалы:

растворы белкой;

сульфат медь (насыщенный водный раствор);

ацетат свинец (20%-ный водный раствор).

Поместив в 2 пробирки по 1 —1,5 мл исследуемого раствора белка, добавляют в одну из них раствор сульфата меди, а в другую раствор ацетата свинца. Добавление реактива в обоих случаях производят медленно, по каплям, при встряхивании. Первоначально образуется хлопьевидный осадок или муть вследствие выделения мало растворимого соединения белка с солью меди (голубого цвета) или с солью свинца (белого цвета). При дальнейшем добавлении реактива осадок снова растворяется.

#### **Примечание к работе 6**

Соли тяжелых металлов уже в очень малых концентрациях осаждают белки, образуя с ними нерастворимые в воде солеобразные соединения.

Поэтому белки являются противоядием при отравлениях солями многих тяжелых металлов, например, ртути (ср. работа 7).

Осаждение белков солями тяжелых металлов необратимо. Однако некоторые из таких осадков, в частности, полученные в условиях описанного опыта, растворяются в избытке осадителя — раствора соли меди или свинца - в результате пептизации осадка адсорбирующимися на его частицах ионами.

### **Работа 7. Осаждение белков алкалоидными реактивами**

Материалы:

растворы белков;

пикриновая кислота (насыщенный водный раствор);

таннин (10%-ный водный раствор);

ртутноиодистый калий в растворе (для приготовления раствора

ртутноиодистого калия к 1 мл 5%-ного раствора хлорной или

азотнокислой окисной ртути добавляют по каплям 5%-ный раствор

иодистого калия до полного растворения образующегося

первоначально красного осадка.);

уксусная кислота (концентрированная);

соляная кислота (разбавленная 1 : 5).

Исследуемый раствор белка наливают в пробирки (по 1 -1,5 мл). В одну пробирку добавляют равный объем раствора пикриновой кислоты; выделяется желтый осадок, а при малой концентрации белка—муть.

В другую пробирку добавляют 1-2 капли уксусной кислоты и 3-4 капли раствора таннина; образуется объемистый хлопьевидный осадок.

В третью пробирку добавляют 1—2 капли соляной кислоты и несколько капель раствора ртутиоидистого калия; выпадает осадок.

#### **Примечание к работе 7**

Осаждение белков алкалоидными реактивами обнаруживает наличие в молекулах белков тех азотсодержащих группировок — аминокрупп, гетероциклов, которые характерны для алкалоидов. Эти реакции осаждения

лучше протекают в слабо кислой среде. Осадок, образовавшийся при действии танина, растворим в избытке последнего.

### **Работа 8. Осаждение белков фенолом и формалином**

Материалы:

растворы белков;

фенол (насыщенный водный раствор);

формалин (30—40%-ный раствор формальдегида).

Наливают в две пробирки по 1—1,5 мл исследуемого раствора белка и добавляют в одну пробирку равный объем раствора фенола, а в другую — равный объем формалина. Обе смеси оставляют стоять 15—20 мин.

Фенол осаждает белки быстро, образуя муть, хлопья или сгустки. Формалин вызывает свертывание белка лишь постепенно, при стоянии.

#### **Примечание к работе 8**

Белки образуют с фенолом и формалином мало растворимые продукты конденсации с участием имеющихся в молекуле белка свободных аминогрупп. На этом основано дезинфицирующее действие фенола и формальдегида.

### **Работа 9. Биуретовая реакции белков**

Материалы:

гидроксид натрия (20—30%-ный раствор);

сульфат меди (насыщенный водный раствор, разбавленный водой в отношении 1 : 30).

**А.** К 1—2 мл раствора белка добавляют равный объем щелочи и затем 3—5 капель (не больше) раствора сульфата меди. Жидкость окрашивается в яркофиолетовый цвет, который заметен даже в окрашенной водной вытяжке из мяса.

**В.** При малом содержании белка (растворы лейкозина или молочного альбумина) и недостаточной яркости и отчетливости получаемой окраски снова смешивают в чистой пробирке растворы белка и щелочи, наклоняют пробирку и осторожно приливают по ее стенке из пипетки 0,5—1 мл

раствора сульфата меди — так, чтобы он образовал в пробирке верхний слой, не смешиваясь с остальной жидкостью. В этом случае на границе слоев появляется очень отчетливое фиолетовое прозрачное кольцо.

### **Примечание к работе 9**

Биуретовая реакция обнаруживает наличие в молекуле белка пептидных группировок —CO—NH—; ее дают все белки. Продукты распада белка—полипептиды — также дают биуретовую реакцию, причем цвет образующихся медных комплексов определяется числом аминокислот, связанных пептидной связью. Дипептиды дают синюю окраску, трипептиды — фиолетовую, а тетрапептиды и более сложные пептиды — красную. Фиолетовый цвет медного комплекса с белком в условиях проведения биуретовой реакции и другие данные указывают на преобладание в сложной белковой частице трипептидных группировок.

Некоторые другие атомные группы, например —CS—NH—, —CH—NH—, при накоплении их в молекуле также могут обусловить положительную биуретовую реакцию. При ее проведении следует избегать избытка медной соли, так как образующийся в этом случае синий гидрат окиси меди маскирует появление фиолетовой окраски.

Наблюдение цветных реакций в форме окрашенного кольца, т. е. проведение их путем переслаивания жидкостей (Б), часто весьма удобно. Такой метод относительно более чувствителен потому, что диффузия на границе раздела двух жидкостей обуславливает наличие на различных уровнях различных соотношений концентраций реагирующих веществ, в том числе и того соотношения их, которое наиболее благоприятно для появления четкой окраски.

### **Работа 10. Азотнортутная реакция белков**

Материалы:

растворы белков;

азотнортутный реактив (Миллонов реактив) (для приготовления азотнортутного реактива растворяют 2 г (0,15 мл) металлической ртути в 3 мл концентрированной азотной кислоты пл. 1,4; полученный раствор разбавляют водой до объема 10 мл).

К 0,5—1 мл исследуемого водного раствора белка добавляют равный объем азотнортутного реактива и очень осторожно нагревают смесь, не доводя ее до кипения. Выпавший первоначально белый хлопьевидный осадок при нагревании собирается в комки и окрашивается с характерный кирпично-красный цвет; иногда краснеет и раствор.

### **Примечание к работе 10**

При действии азотнортутного реактива белки сначала выпадают из раствора в виде белого ртутного соединений (см. работу 7), этот осадок окрашивается в розовый или красный цвет лишь в том случае, если исходный белок имеет в составе молекулы остатки тирозина или триптофана. Тирозин, или п-оксифенилаланин, содержит фенольный гидроксил; триптофан, или β-индолилаланин, является гетероциклическим соединением. Некоторые белки, например, чистая желатина, почти не содержат ни тирозина, ни триптофана и не дают при азотнортутной реакции характерного окрашивания; в то же время многие фенолы сами дают эту реакцию в отсутствие белков. В присутствии некоторых неорганических соединений — перекиси водорода, хлоридов и других солей — четкость реакции резко снижается.

Природа образующихся красных продуктов еще недостаточно выяснена.

Для успеха реакции необходимо, чтобы реактив содержал в растворе некоторое количество свободных окислов азота.

### **Работа 11. Ксантопротеиновая реакция белков**

Материалы:

растворы белков;

азотная кислота (концентрированная, пл.1,4);

гидроксид натрия или калия (20—30%-ный раствор).

К 1 мл раствора белка добавляют 0,2—0,3 мл азотной кислоты; появляется белый осадок или муть (ср. работу 3). Затем нагревают смесь на пламени спиртовки до кипения и поддерживают его в течение 1—2 мин.; при этом раствор и осадок окрашиваются в яркожелтый цвет. При кипячении выделившийся осадок может частично или полностью раствориться в результате гидролиза, но характерная желтая окраска раствора сохраняется.

Охладив смесь, осторожно добавляют к кислой жидкости по каплям избыток (1—2 мл) раствора щелочи. Выпадает осадок кислотного альбумината, образующий с избытком щелочи яркооранжевый раствор.

### **Примечание к работе 11**

Ксантопротеиновая реакция обнаруживает наличие в белке свободных или конденсированных ароматических ядер, т. е. остатков таких кислот, как фенилаланин, тирозин, триптофан. Желтое окрашивание появляется в результате нитрования этих ядер азотной кислотой и образования полинитросоединений. Переход в щелочной среде желтой окраски подобных веществ в оранжевую обусловлен образованием более интенсивно окрашенных анионов. Взамен едкой щелочи можно применять аммиак.

Кислотные альбуминаты, образующиеся при энергичном действии кислот на белки, нерастворимы в воде и в разбавленных растворах солей, но хорошо растворяются в щелочах и разбавленных кислотах. Кислотные альбуминаты связывают значительно большее количество кислоты, чем исходный белок.

Чистая желатина не содержит многих аминокислот, в том числе и перечисленных выше, и не даст ксантопротеиновой реакции.

### **Работа 12. Расщепление белка действием щелочи**

Материалы:

растворы белков;

гидроксид натрия или калия (30%-ный раствор);

нитрат или ацетат свинца (10%-ный раствор).



К 1—2 мл исследуемого раствора белка добавляют двойной объем концентрированного раствора щелочи и кипятят смесь в течение 2—3 мин. При этом выпадает осадок (иногда незначительный), растворяющийся при дальнейшем кипячении, и выделяется аммиак, запах которого ясно заметен при применении не слишком разбавленных растворов белка; особенно четко обнаруживается выделение аммиака при кипячении со щелочью проб растворов яичного белка, казеина и водной вытяжки из мяса.

К полученному горячему сильнощелочному раствору добавляют 1 мл раствора соли свинца и снова кипятят смесь; образующийся сначала белый осадок гидроксида свинца растворяется в избытке щелочи. Если белок при действии щелочи отщепляет серу, то образуется сульфид свинца, в результате чего прозрачная жидкость постепенно окрашивается в коричневый цвет; при относительно высоком содержании отщепляемой серы выпадает темнокоричневый или черный осадок сульфида свинца.

### **Примечание к работе 12**

При энергичном воздействии едких щелочей белки подвергаются глубоким изменениям. Помимо частичного гидролиза по пептидным связям, наблюдается отщепление части аминокрупп в виде аммиака. При наличии в молекуле белка цистина или цистеина из этих аминокислот постепенно, отщепляется также сера в виде сероводорода; его образование обнаруживается действием солей свинца по интенсивной окраске нерастворимого в щелочах сульфида свинца:

Белки при действии едких щелочей превращаются в щелочные альбуминаты, резко отличные от исходного белка как по составу, так и по свойствам. Они имеют кислотный характер, легко растворимы в щелочах и разбавленных кислотах и не выпадают из щелочных растворов ни при кипячении, ни при высаливании.

Желатина, в отличие от большинства белков, почти не содержит серы.

## ТЕМА 2. УГЛЕВОДЫ

### Работа 13. Получение исходных материалов

Из числа моносахаридов для проведения многих опытов требуются глюкоза и фруктоза. При отсутствии чистых сахаров обычно можно заменить глюкозу картофельной патокой или так называемым постным сахаром, а фруктозу - медом, содержащим глюкозу и фруктозу в примерно равных количествах. Инвертный сахар, получаемый при гидролизе обычного свекловичного (тростникового) сахара — сахарозы, также является смесью глюкозы и фруктозы и дает реакции последней.

Из числа дисахаридов наиболее доступна сахароза; однако желательно применять в некоторых опытах и дисахариды другого типа строения (редуцирующие), например, мальтозу или лактозу (молочный сахар).

Из полисахаридов в опытах используются крахмал (или картофельная мука) и клетчатка (фильтровальная бумага или вата). Наконец, для некоторых опытов нужны такие материалы, как молоко, отруби и т. п.

Все углеводы являются твердыми, чаще кристаллическими, веществами; большинство моносахаридов и дисахаридов хорошо растворимо в воде и часто выделяется из растворов в виде кристаллогидратов. При нагревании углеводы разлагаются, не перегоняясь; некоторые из них имеют характерные температуры плавления, однако, отдельные сахара характеризуют по температурам плавления различных их производных.

### Работа 14. Общая реакция на углеводы с $\alpha$ -нафтолом

*Материалы:*

любые углеводы (сахара, крахмал, клетчатка);

$\alpha$ -нафтол (10% - ный спиртовый раствор);

серная кислота (концентрированная, пл. 1,84).

Опыт одновременно проводят с несколькими различными углеводами.

Помещают в пробирку 0,5—1 мл воды и вносят в нее очень немного исследуемого углевода (.например, несколько крупинок сахара или крахмала или же маленький кусочек фильтровальной бумаги размером 2—3 мм). Затем

добавляют 2 капли раствора  $\alpha$ -нафтола; смесь слегка мутится вследствие выделения плохо растворимого в воде нафтола. После этого, наклонив пробирку, осторожно приливают по стенке (лучше из пипетки) 1 —1,5 мл серной кислоты; тяжелый слой кислоты должен опуститься на дно пробирки, почти не смешиваясь с водным слоем. На границе слоев быстро образуется красивое фиолетовое кольцо; при взбалтывании смесь разогревается и окрашивается по всему объему, а при разбавлении ее водой выделяются окрашенные хлопья.

В отсутствие углеводов фиолетового кольца не образуется, хотя слой кислоты может слегка позеленеть.

#### **Примечание к работе 14**

Реакцию с  $\alpha$ -нафтолом дают все углеводы, причем кетозы — свободные, или связанные в дисахаридах и полисахаридах, — реагируют более интенсивно. Появление окраски обусловлено расщеплением молекулы углевода при действии крепкой серной кислоты с образованием в числе прочих продуктов фурфурола или его производных, которые вступают в реакцию конденсации с  $\alpha$ -нафтолом, образуя окрашенные соединения.  $\alpha$ -Нафтол можно заменить резорцином, тимолом, дифениламином, камфорой и другими веществами, способными конденсироваться с производными фурфурола с образованием окрашенных продуктов.

Описанная цветная реакция на углеводы очень чувствительна; при недостаточно аккуратной работе даже случайно попавшие в пробирку волокна фильтровальной бумаги или пыль могут обусловить положительную реакцию с  $\alpha$ -нафтолом. Окрашенное кольцо с нафтолом и серной кислотой дают некоторые соединения, не являющиеся собственно углеводами, например таннин, содержащий в молекуле остаток глюкозы, а также пирогаллол; в последнем случае при разбавлении реакционной смеси водой окраска исчезает.

## **Работа 15. Взаимодействие углеводов с концентрированной серной кислотой**

*Материалы:*

сахар (любой);

серная кислота (концентрированная, пл. 1,84).

Несколько крупинок какого-либо сахара растворяют в 1—2 мл воды. К холодному раствору осторожно, по стенкам пробирки, добавляют равный объем серной кислоты, стараясь не взбалтывать смесь. Серная кислота образует нижний, тяжелый, слой под раствором сахара. На границе этих слоев постепенно появляется темное бурое кольцо. Если на холоду кольца не образуется, слегка подогревают содержимое пробирки, не взбалтывая его.

### **Примечание к работе 15**

При действии концентрированных минеральных кислот молекулы углеводов постепенно расщепляются, образуя смесь различных продуктов: фурфурол и его производные, леволиновую и муравьиную кислоты и так называемые гуминовые вещества. Сложное строение гуминовых веществ еще не может считаться точно установленным; они окрашены в темное бурое или черный цвет, плохо растворимы в воде и в условиях опыта выделяются на границе слоев жидкости. Кетозы дают окрашивание быстрее, чем альдозы.

## **Работа 16. Реакция Селиванова на кетозы**

*Материалы;*

глюкоза, фруктоза, мальтоза (или лактоза), (сахароза 2%-ные водные растворы)

реактив Селиванова (раствор 0,01 г резорцина в смеси 10 мл воды и 10 мл концентрированной соляной кислоты). Реактив Селиванова должен применяться свежеприготовленным.

Опыт одновременно проводят с растворами нескольких сахаров.

К 0,5—1 мл каждого из исследуемых растворов добавляют 2 мл реактива Селиванова, после чего погружают все пробирки на 2 мин. в кипящую водяную баню.

Растворы, содержащие фруктозу или сахарозу, быстро окрашиваются в яркокрасный цвет; при последующем нагревании их на пламени спиртовки до начала кипения красные растворы мутнеют и выделяют окрашенный осадок. Растворы других сахаров в этих условиях лишь слегка желтеют или розовеют.

### **Примечание к работе 16**

При нагревании с соляной кислотой гексозы образуют в числе прочих веществ оксиметилфурфурол, который дает с резорцином ярко окрашенный продукт конденсации. Кетозы в условиях опыта превращаются в оксиметилфурфурол в 15—20 раз быстрее, чем альдозы, что и обуславливает быстроту появления окраски и ее интенсивность в растворах фруктозы и сахарозы.

Реакция эта была найдена Ф. Ф. Селивановым в 1887 г. и позволяет быстро обнаружить в смеси сахаров наличие кетогексоз как свободных, так и связанных в молекулах дисахаридов. В условиях проведения реакции дисахариды успевают частично гидролизироваться, давая свободные моносахариды.

### **Работа 17. Гидролиз (инверсия) сахарозы**

*Материалы:*

сахароза (2%-ный водный раствор);

серная кислота (разбавл. 1 :5} или соляная кислота (разбавл. 1:1).

Наливают в две пробирки по 8—10 мл раствора сахарозы; в одну из пробирок добавляют 3—4 капли кислоты. Обе пробирки нагревают одновременно на кипящей водяной бане 10—15 мин., затем охлаждают и проводят с содержимым каждой из них в отдельности реакции; со щелочью; с метиленовым голубым; с солью окиси меди; с аммиачным раствором окиси серебра ; с  $\alpha$ -нафтолом .

Отмечают различие в результатах реакций для растворов сахарозы, нагревавшихся без кислоты или с кислотой. Реакция с  $\alpha$ -нафтолом такого различия не обнаруживает.

### **Примечание к работе 17**

Сахароза не имеет в молекуле ни свободных глюкозидных гидроксидов, ни карбонильных групп и поэтому отличается от моносахаридов и большинства дисахаридов по своему отношению ко многим реактивам.

Гидролиз сахарозы ведет к ее раащеплению с образованием глюкозы и фруктозы. Как и во многих других случаях, гидролиз сахарозы очень резко ускоряется действующими каталитически ионами водорода, т. е. практически — сильными кислотами. Гидролиз сахарозы ведет к изменению направления вращения плоскости поляризации света, проходящего через раствор сахара, вследствие чего эта реакция получила название «инверсии» (т. е. обращения).

Перечисленные выше реакции обнаруживают появление в растворе сахарозы, в результате ее гидролиза, сильных восстановителей — глюкозы и фруктозы; ход реакции сахарозы с  $\alpha$ -нафтолом, который является общим реактивом на углеводы, после гидролиза не изменяется.

### **Работа 18. Реакции крахмала**

*Материалы:*

крахмал;

йод в растворе (2 г иода и 5 г йодистого калия в 100 мл воды);

этиловый спирт;

гидроксид натрия или калия (5%-ный водный раствор);

серноокислая медь (5%-ный водный раствор).

Около 1 г сухого крахмала взбалтывают с 5—6 мл воды, дают смеси отстояться 1—2 мин., сливают воду и повторяют промывание крахмала еще 2—3 раза новыми порциями воды. Добавив последнюю порцию воды и хорошо взболтав смесь, выливают суспензию крахмала в 50 мл воды,

нагретой до кипения в стакане или колбе; образуется почти прозрачный, слегка опалесцирующий коллоидный раствор — крахмальный клейстер.

Охладив раствор, проводят с ним следующие реакции.

**А.** К 1—2 мл раствора крахмала добавляют 1 каплю раствора иода. Полученную темносинюю жидкость нагревают. Окраска исчезает, но при охлаждении снова появляется.

**Б.** Другую пробу раствора крахмала (1—2 мл) смешивают с 1 мл спирта; последующее добавление иода дает лишь слабое буроватое окрашивание.

**В.** К 1—2 мл крахмального клейстера добавляют несколько капель раствора щелочи и нагревают смесь до кипения; жидкость не обнаруживает изменений или лишь слегка желтеет.

**Г.** К 1—2 мл клейстера добавляют несколько капель щелочи и 1—2 капли раствора сернокислой меди и нагревают смесь в кипящей воде 2—3 мин. Раствор остается почти не окрашенным; голубые хлопья нерастворившейся гидрооксида меди при нагревании чернеют, красного или желтого осадка не образуется.

### **Примечание к работе 18**

Обычный растительный крахмал содержит два полисахарида — амилозу и амилопектин, молекулы которых построены из остатков дисахарида мальтозы. В амилозе остатки мальтозы соединены в виде цепочки, а в амилопектине они расположены по более сложной схеме. Часть гидроксильных групп в молекуле амилопектина этерифицирована фосфорной кислотой.

При действии иода амилоза окрашивается в чисто синий, а амилопектин — в сине-фиолетовый.

Причиной появления окраски, по последним данным, следует считать образование молекулярных комплексных соединений иода с амилозой и амилопектином; одновременно последний также просто адсорбирует иод. Обесцвечивание комплекса при нагревании и в присутствии спирта во

многих случаях затрудняет применение крахмала в качестве индикатора при иодометрическом титровании.

В очень длинных цепеобразных молекулах амилозы и амилопектина свободные глюкозидные гидроксильные группы расположены лишь на концах цепи, т. е. относительное количество их в молекуле очень мало; поэтому крахмал не дает достаточно четких реакций ни со щелочью, ни с солями меда .

Технический крахмал часто содержит растворимые примеси, осмолемые щелочами и восстанавливающие окисную медь. Поэтому для большей четкости опытов В и Г крахмал до изготовления клейстера освобождают от примесей, промывая его водой.

### **Работа 19. Гидролиз крахмала кислотами**

*Материалы:*

крахмал;

серная кислота (разбавленная 1 :5);

иод в растворе (2 г иода и 5 г йодистого калия в 100 мл воды);

карбонат кальций (в порошке).

Изготавливают крахмальный клейстер из 1 г крахмала. К 40—50 мл клейстера в стаканчике или колбочке добавляют 1 мл разбавленной серной кислоты и кипятят смесь 5—10 мин.; при этом через каждые 1—2 мин. отливают в отдельную пробирку немного (1—2 мл) горячей жидкости, быстро охлаждают пробу в воде, добавляют 1 каплю раствора иода и ставят пробирку в штатив. Последовательные пробы обнаруживают постепенное изменение окраски при реакции с иодом. Это происходит в результате все более глубокого гидролиза крахмала и первоначально образующихся декстринов.

После того как окраска пробы при действии иода совершенно перестанет появляться, кипятят смесь еще 5—6 мин., затем слегка охлаждают ее и понемногу, при сильном взбалтывании, добавляют 2 г углекислого кальция в порошке. После прекращения вспенивания фильтруют горячую



смесь через складчатый фильтр, собирая 10—20 мл прозрачного фильтрата. Полученный раствор дает все реакции моносахаридов.

Выпаривая 10—15 мл этого фильтрата в фарфоровой чашечке (под конец на кипящей водяной бане во избежание пригорания), получают несколько капель густого, желтоватого, сладкого на вкус сиропа-патоки.

### **Примечание к работе 19**

Гидролиз крахмала, как и другие реакции гидролиза, весьма ускоряется в присутствии кислот. В результате последовательно углубляющегося гидролиза крахмала дает сначала декстрины, затем дисахарид мальтозу и как конечный продукт гидролиза моносахарид D-глюкозу.

Добавление мела имеет целью удаление из раствора серной кислоты:

Образующийся мало растворимый (около 2 г в литре) гипс и избыток мела отделяются при фильтровании. Для ускорения гидролиза крахмала пригодна любая сильная кислота, например, соляная, однако последнюю труднее удалить из гидролизата, чем серную кислоту. Гидролиз — осахаривание крахмала кислотами — проводится в технике для получения патоки.

Гидролиз крахмала в присутствии кислоты впервые осуществил в 1811 г. русский академик К- С. Кирхгоф (1764—1883).

### **Работа 20. Гидролиз крахмала под действием слюны**

*Материалы;*

крахмал;

раствор слюны (свежеприготовленный);

иод в растворе (2 г иода и 5 г йодистого калия с 100 мл воды).

Для получения раствора слюны ополаскивают рот в течение при близительно 1 мин. дистиллированной водой (20—30 мл); полученную жидкость фильтруют через складчатый фильтр.

Опыт проводят одновременно в трех номерованных пробирках; в две из них помещают по 5 мл раствора слюны, а в третью 5 мл дистиллированной воды (для контроля). Раствор слюны во второй пробирке нагревают до

кипения и кипятят 1—2 мин., прогревая пламенем спиртовки не только жидкость, но и образующуюся пену; затем пробирку охлаждают.

Изготавливают обычным путем 20—25 мл крахмального клейстера из 0,5 г крахмала, охлаждают его и вносят по 5 мл клейстера в каждую из трех подготовленных пробирок, после чего встряхивают все три пробирки и помещают их одновременно в стакан с нагретой до 40° водой, отметив время начала гидролиза.

Через каждые 1—2 мин, отливают из каждой пробирки по 0,5—1 мл жидкости и добавляют к взятой пробе 1 каплю раствора иода. В первой пробирке (с непрогревавшимся предварительно раствором слюны) реакция с иодом очень быстро обнаруживает превращение крахмала в декстрины; через 5—6 мин. окраска от иода перестает появляться, а реакция с солями меди обнаруживает появление в растворе редуцирующих сахаров.

Во второй пробирке (прокипяченная слюна) и в третьей (контрольной) гидролиза крахмала по реакции с иодом не обнаруживается.

Слюна содержит фермент птиалин (амилазу), чрезвычайно энергично катализирующий гидролиз крахмала. В отличие от кислотного гидролиза, гидролиз крахмала птиалином идет лишь до образования дисахарида мальтозы.

Для всех ферментативных процессов характерно существование известного оптимума температуры, в данном случае лежащего около 40°. Нагревание до 100° разрушает (денатурирует) фермент, который представляет собой белок, и способность слюны гидролизовать крахмал исчезает.

Ферментативный гидролиз крахмала до мальтозы при действии диастаза (из солода) был впервые обнаружен в 1814 г. акад. К. С. Кирхгофом в Петербурге.