

Міністерство освіти і науки України
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича

Г.П. Копильчук, І.М. Николайчук

ЛАБОРАТОРНИЙ ПРАКТИКУМ ІЗ БІОХІМІЇ

Навчально-методичний посібник

Чернівці
Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича
2019

УДК 577.1 (076.5)
К 658

Друкується за ухвалою редакційно-видавничої ради
Чернівецького національного університету
імені Юрія Федьковича

Копильчук Г.П., Николайчук І.М.

К 658 Лабораторний практикум із біохімії: навч.-метод. посібник.
Чернівці : Чернівец. нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2019. 144 с.

У виданні подано лабораторні роботи з основних розділів нормативного курсу «Біохімія», які охоплюють методи якісного та кількісного аналізу біомолекул – протеїнів, ензимів, вуглеводів, ліпідів, вітамінів і гормонів. Навчально-методичний посібник підготовлений для закріплення теоретичних знань через набуття практичних умінь і навичок виконання лабораторних робіт у галузі статичної та динамічної біохімії.

Для студентів денної та заочної форм навчання спеціальностей 091.6 – біологія, 014.05 – середня освіта (біологія та здоров'я людини).

© Чернівецький національний університет
імені Юрія Федьковича, 2019
© Копильчук Г.П., Николайчук І.М., 2019

ПЕРЕДМОВА

Лабораторний практикум підготовлений відповідно до програми нормативного курсу «Біохімія» для студентів денної та заочної форм навчання спеціальностей 091.6 – біологія, 014.05 – середня освіта (біологія та здоров'я людини) та може бути успішно використаний студентами інших напрямків, які вивчають біологічну хімію.

Мета видання – закріплення теоретичних загальних уявлень про фундаментальні досягнення біологічної хімії через формування практичних умінь і навичок виконання лабораторних робіт в області статичної та динамічної біохімії.

До практикуму ввійшли лабораторні роботи різного ступеня складності, що дасть змогу студентам опанувати методи біохімічних досліджень та вміння аналізувати отримані результати.

Лабораторні роботи охоплюють класичні та сучасні методи якісного та кількісного аналізу основних груп біомолекул. Під час виконання лабораторних робіт із біохімії при дослідженні властивостей протеїнів, ензимів, вуглеводів, ліпідів, вітамінів і гормонів студенти повинні оволодіти безпечними прийомами використання хімічних реактивів, навичками роботи з лабораторним устаткуванням та вимірювальними приладами; вміти оцінювати інформативність біохімічних тестів за умов розвитку деяких патологічних станів.

До кожного завдання детально сформульовані принципи методів, що допоможе студентам не лише самостійно, але й усвідомлено його виконати. Самостійно опрацьована лабораторна робота, вчасне оформлення протоколу, обґрунтовані та вичерпні відповіді на запитання оцінюються максимальною кількістю балів.

Виконання лабораторних робіт та засвоєння теоретичного матеріалу сприятиме глибшому розумінню студентами теоретичних і практичних проблем сучасної біохімії, полегшить опанування програми нормативного курсу «Біохімія».

ОСОБЛИВОСТІ РОБОТИ В БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ ТА ІНСТРУКТАЖ ІЗ ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ

Лабораторний практикум з біохімії потребує знань правил техніки безпеки та особливостей роботи в лабораторії з біологічним матеріалом, основних положень міжнародної системи одиниць (СИ).

Вимоги безпеки під час виконання роботи

З метою безпечного виконання лабораторних робіт потрібно керуватися міжнародними стандартами належної лабораторної практики (*GLP, Good Laboratory Practice*), а також загальнодержавними законами та відомчими документами із техніки безпеки у біохімічній лабораторії.

Усі лабораторні заняття в навчальній біохімічній лабораторії проводять під безпосереднім керівництвом викладача та лаборанта. Кожен студент повинен бути повністю проінформований про вимоги техніки безпеки, прийняті в лабораторії, знаходження засобів протипожежної безпеки та аптечки першої допомоги. До виконання лабораторної роботи допускаються студенти, які пройшли інструктаж із техніки безпеки та отримали допуск до занять. Результат інструктажу заноситься у спеціальний журнал.

Всі роботи, пов'язані з використанням отруйних та з неприємним запахом речовин, проводять у витяжній шафі. Не виливати до раковини залишки кислот, лугів, вогнебезпечних рідин, а зливати їх у спеціальні склянки під витяжною шафою.

Розчини, які містять кислоти та луги, перш як виливати до каналізаційної системи, необхідно нейтралізувати. Речовини з різким запахом, і отруйні речовини повинні бути знешкоджені хімічною обробкою або спалені у спеціально відведеному місці за межами лабораторії, бажано на повітрі.

1. Ознайомитися зі змістом лабораторної роботи. Перевірити наявність посуду, приладів і реактивів для проведення даної лабораторної роботи.

2. До експериментальної роботи допускаються студенти тільки за наявності спецодягу (халата).

3. Необхідно точно дотримуватися послідовності операцій, зазначених у методичному посібнику з виконання лабораторної роботи. На робочому місці не повинно бути сторонніх предметів.

4. Заборонене використання реактивів без етикеток.

5. Надлишок реактиву не висипати та не виливати назад у посудину, з якої він був узятий. Зливати нерозбавлені кислоти і луги в каналізаційну систему категорично забороняється!

6. Заборонено під час наливання реактивів нахилитися над посудиною, щоб уникнути потрапляння бризок на обличчя або одяг.

7. Заборонено нахилитися над посудиною з рідиною, яка нагрівається. При потраплянні на обличчя або руки бризок рідини негайно змити їх водою.

8. Банки з легкозаймистими реактивами не можна тримати близько біля нагрівальних приладів.

9. Концентровані хлоридну та нітратну кислоти потрібно переливати тільки у витяжній шафі. При роботі з кислотами і розчинами лугів або іншими агресивними рідинами категорично забороняється насмоктувати ці рідини ротом; для цього використовують піпетки з гумовими грушами.

10. Реакції, які супроводжуються сильним розігрівом (розчинення кислот, лугів), проводять тільки в посуді з хімічного скла. При цьому реакційну посудину поміщають в кристалізатор. **Необхідно обережно, невеликими порціями, додавати кислоту в воду, а не навпаки!**

11. У хімічній лабораторії не можна пити воду, використовуючи хімічний посуд, та вживати їжу.

12. Перед умиканням електроприладу потрібно перевірити цілісність шнурів, наявність заземлення та справність розеток.

13. Вмикати прилад потрібно строго в порядку, описаному в інструкції до приладу. Більшість приладів, які використовуються в біохімічній лабораторії, вимагають попереднього прогрівання протягом пів години.

14. Не можна залишати без нагляду ввімкнені електронагрівальні прилади, пальники та інші пристрої. При роботі з нагрівальними приладами довге волосся не залишати розпущеним.

15. Закінчивши роботу, необхідно вимкнути прилади, закрити воду, навести порядок у витяжній шафі, здати лаборанту чистий посуд і своє робоче місце та вмити руки з милом. Лаборант зобов'язаний здати лабораторію викладачу.

Перша допомога при травмах та отруєннях

У лабораторії опіки можуть бути спричинені вогнем, парою, гарячими або розжареними речовинами, лугами, кислотами, а також речовинами, які мають дуже низьку температуру (рідкий кисень, рідка вуглекислота, рідкий азот тощо).

При *термічних опіках* не дозволяється змочувати обпечене місце водою. В жодному разі не можна проколювати утворені пухирі і перев'язувати опік бинтом. На обпечені місця накладають складений у кілька разів бинт або марлю, змочені 3 %-м розчином перманганату калію, 5 %-м розчином таніну, етиловим спиртом, або змащені спеціальним кремом від опіків.

При *потраплянні кислоти* (сульфатної, хлоридної, нітратної, фосфорної) вражене місце промивають спочатку великою кількістю проточної води, потім 3–5 %-м розчином гідрокарбонату натрію або 10 %-м розчином вуглекислого амонію і знову промивають водою.

При опіках *лугами* після промивання великою кількістю води шкіру змочують 2–3 %-м розчином оцтової кислоти або 1–2 %-м розчином соляної кислоти і потім знову промивають водою.

При *опіках порожнини рота (або очей) лугами* необхідно прополоскати (промити) великою кількістю води, а потім прополоскати (промити) 3 %-м розчином оцтової кислоти або 2 %-м розчином борної кислоти. При ураженні слизової оболонки рота або очей кислотою їх обробляють 3–5 %-м розчином гідрокарбонату натрію.

При потраплянні на тіло органічних речовин, нерозчинних у воді, їх змивають великою кількістю розчинника цієї речовини,

а потім промивають етиловим спиртом і змащують кремом. При опіках рідким фенолом необхідно розтирати уражене місце гліцирином доти, поки не відновиться нормальний колір шкіри. Після цього шкіру промивають водою і накладають на уражене місце серветку або марлевий тампон, змочений гліцирином.

При *ураженні тканин* (пораненні), особливо при порізах битим скляним лабораторним посудом, рану очищають від уламків скла стерильним пінцетом або стерильною марлею, зупиняють кровотечу, очищають поверхню шкіри навколо рани від бруду і обробляють краї рани антисептиком (наприклад розчином йоду).

При раптовому виникненні кровотечі заливають рану (безпосередньо) 3 %-м розчином пероксиду водню або водним розчином хлориду феруму (III), а потім накладають стерильну серветку або марлевий тампон (ватаю в даному разі користуватися не можна, щоб її волокна не потрапили в рану) і щільно забинтовують, після чого потерпілого відправляють в медичну установу.

При *отруєннях газом* потерпілого потрібно негайно винести на свіже повітря, напоїти великою кількістю молока і забезпечити спокій.

При *електротравмах* до прибуття лікаря забезпечити повний спокій та надходження свіжого повітря. Якщо порушене дихання і серцева діяльність, необхідно негайно вдатися до штучного дихання та непрямого масажу серця і не припиняти ці операції до повного відновлення функцій.

МІЖНАРОДНА СИСТЕМА ОДИНИЦЬ (СІ) У БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРНІЙ ПРАКТИЦІ

Маса – величина, яка характеризує інерційні та гравітаційні властивості тіла. Масу тіла у стані спокою визначають зважуванням на вагах. Одиницями маси є кілограм (кг), грам (г), частки грама – міліграми (мг), мікрограми (мкг), нанограми (нг). У біохімічних дослідженнях одиницями маси користуються для вираження речовин, відносна молекулярна маса яких невідома.

Кількість речовини – величина, яка визначається кількістю структурних елементів (атомів, молекул, іонів, електронів тощо) у досліджуваній речовині. За одиницю кількості речовини беруть моль (моль – це кількість речовини, яка містить стільки ж структурних одиниць, скільки атомів в 0,012 кг ізотопу карбону ^{12}C . Вона дорівнює $6,02 \times 10^{23}$ і називається постійною Авогадро). На практиці використовуються також його частки – кіломоль (кмоль), мілімоль (ммоль), мікромоль (мкмоль), наномоль (нмоль) тощо. Кількість речовини застосовують для вираження результатів досліджень речовин, відносна молекулярна маса яких відома.

Молярна маса – це маса речовини в кількості 1 моль. Її виражають в кг/моль або г/моль і зазвичай позначають буквою *M*. Молярна маса речовини, виражена в грамах, чисельно дорівнює його відносній молекулярній (атомній) масі, вираженій в атомних одиницях маси.

Масова концентрація – відношення маси речовини до об'єму суміші. Одиниці в СІ – $\text{кг}/\text{м}^3$, у біохімічних дослідженнях – г/л.

Молярна концентрація – відношення кількості речовини до об'єму суміші. Одиниці в СІ – $\text{моль}/\text{м}^3$, у біохімічних дослідженнях – моль/л.

Нормальна концентрація, або нормальність виражається числом еквівалентів речовини, яке міститься в 1 л розчину. Розчин, в 1 л якого міститься один еквівалент розчиненої речовини, називається нормальним.

Швидкість (активність) ферментативної реакції визначають за зміною концентрації субстрату або за утворенням продуктів реакції.

За **одиницю активності (E)** ензиму беруть таку його кількість, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хв за оптимальних умов. *Катал* (кат) – це активність ензиму, при якій реакція відбувається зі швидкістю 1 моль/с. 1 катал характеризує досить високу ферментативну активність, яка майже не трапляється у звичайних умовах. Тому активність ензимів виражають у частках каталу: мілікаталах (1мл-кат =

10^{-3} кат), мікрокаталах (1 мк-кат = 10^{-6} кат), нанокаталах (1н-кат = 10^{-9} кат).

Одна міжнародна одиниця активності (Е) = 16,67 н-кат.

Для вираження активності ензимів у практичній роботі часто користуються поняттями питомої та молярної активності. *Питому активність* ферментів виражають числом міжнародних одиниць ферментативної активності на 1 мг білка (або числом каталів на 1 кг білка). Питома активність перебуває у прямій залежності від ступеня чистоти ферменту.

Кількість молекул субстрату, яка перетворюється однією молекулою ферменту за 1 хв, називають числом оборотів, або *молярною активністю* і виражають у каталах на 1г-моль ферменту.

Показники екскреції досліджуваного компонента з добовим об'ємом сечі визначають за кількістю речовини, яка виводиться з сечею за добу (наприклад ммоль/добу, мкмоль/добу, нмоль/добу).

РОЗДІЛ 1 СТАТИЧНА БІОХІМІЯ

СТРУКТУРА ТА ВЛАСТИВОСТІ БІОМОЛЕКУЛ

Тема 1. Білки

Лабораторна робота 1

ЯКІСНІ РЕАКЦІЇ НА АМІНОКИСЛОТИ ТА БІЛКИ

Участь амінокислот у біохімічних реакціях визначається наявністю α -аміногрупи, α -карбокисильної групи, а також функціональних груп бічних ланцюгів.

Для ідентифікації та кількісного визначення білків і окремих амінокислот використовують **кольорові реакції**, основані на взаємодії специфічних реактивів з функціональними групами радикалів амінокислот, які входять до складу білків чи пептидів.

Якісні реакції застосовують у лабораторній практиці для ідентифікації як білків, так і окремих амінокислот.

Відомо два типи кольорових реакцій:

- *загальні, або універсальні*: біуретова (на всі білки), зумовлена наявністю пептидного зв'язку, та нінгідрінова (на всі α -амінокислоти), зумовлена наявністю в амінокислотах аміногруп в α -положенні;
- *специфічні*: тільки на окремі амінокислоти як в молекулі білка, так і в розчинах амінокислот, наприклад реакція Фоля (на амінокислоти, які містять слабозв'язаний Сульфур – цистеїн, цистин), ксантопротеїнова (на ароматичні амінокислоти) тощо.

Матеріали дослідження та реактиви: 1 %-й розчин яєчного білка, 1 %-й розчин желатину, 1 %-й NaOH, 1 %-й CuSO_4 , 0,5 %-й розчин нінгідрину, 30 %-й NaOH, 5 %-й $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, концентрована HNO_3 , концентрована H_2SO_4 .

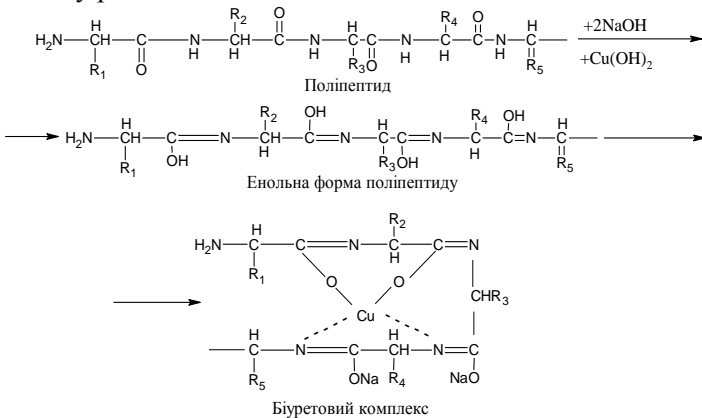
Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, водяна баня.

1. Біуретова реакція на пептидний зв'язок (реакція Піотровського)

Грунтується на здатності пептидного зв'язку в білках і поліпептидах (–CO–NH–) утворювати в лужному середовищі з іонами Cu^{2+} комплексну сполуку фіолетового кольору з червоним або синім відтінком залежно від кількості пептидних зв'язків у молекулі. Так, фіолетове забарвлення утворюють розчини білків, а продукти їх неповного гідролізу – червоне або рожеве.

Біуретова реакція позитивна з білками і пептидами, які мають не менш як два пептидні зв'язки. Біуретову реакцію дають і небілкові речовини з не менш ніж двома пептидними групами, наприклад похідне сечовини – біурет $\text{H}_2\text{N–CO–NH–CO–NH}_2$, що й дало назву цій реакції.

Механізм реакції полягає в тому, що при надлишку лугу кетогрупа (–C=O) пептидного зв'язку відновлюється до ОН-групи, далі відбувається дисоціація ОН-групи, з'являється негативний заряд, унаслідок чого атом Оксигену взаємодіє з Купрумом, утворюючи солеподібні зв'язки. Купрум також утворює координаційні зв'язки з атомами Нітрогену пептидного зв'язку. У лужному середовищі пептидні групи поліпептидів переходять в енольну форму, яка і взаємодіє з іонами Cu^{2+} , утворюючи стабільний забарвлений біуретовий комплекс. Інтенсивність забарвлення залежить від концентрації білка та іонів Cu^{2+} у розчині.



1.1. У пробірки № 1 налейте 0,5 мл 1 %-го розчину яєного білка, у № 2 – 0,5 мл 1 %-го розчину желатину.

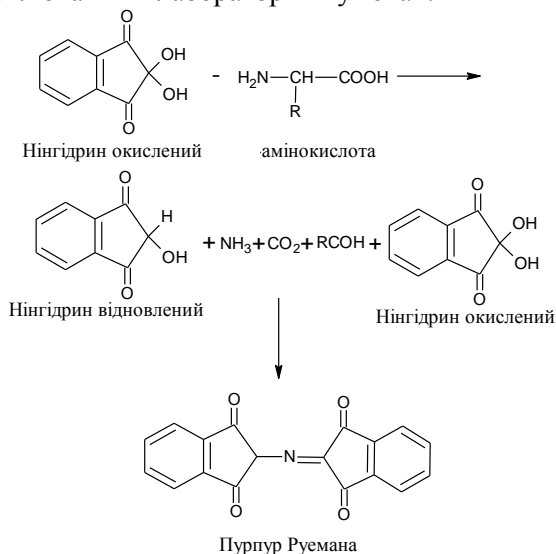
1.2. У кожену пробірку додайте 1 мл 1 %-го розчину NaOH і 3 краплі 1 %-го розчину CuSO₄.

1.3. Спостерігайте за зміною забарвлення. Отримані результати занесіть до таблиці.

2. Нінгідринова реакція на α-амінокислоти

Нінгідринову реакцію використовують для якісного та кількісного виявлення амінокислот під час хроматографічного аналізу. Кількісне визначення амінокислот здійснюють вимірюванням інтенсивності забарвлення, що виникає внаслідок їх взаємодії з нінгідрином.

Реакція зумовлена наявністю в амінокислотах аміногруп в α-положенні. Нінгідринова реакція – одна з найчутливіших для виявлення α-аміногруп. Білки, поліпептиди та α-амінокислоти утворюють під час кип'ятіння з нінгідрином сполуку синьо-фіолетового кольору. Суть реакції полягає в тому, що α-амінокислоти та поліпептиди, взаємодіючи з нінгідрином, підлягають процесам окислювального дезамінування та декарбоксілювання в лабораторних умовах.



При кип'ятінні білка з розчином нінгідрину (трикетогідринденгідрату) амінокислоти окислюються з утворенням вуглекислого газу, аміаку та альдегіду. Нінгідрин при цьому відновлюється. Відновлений нінгідрин конденсується з аміаком і молекулою окисленого нінгідрину, утворюючи сполуку синьо-фіолетового кольору (комплекс Руемана).

2.1. У пробірки № 1 налейте 0,5 мл 1 %-го розчину яєчного білка, у № 2 – 0,5 мл 1 %-го розчину желатину.

2.2. У кожну пробірку додайте 0,5 мл 0,5 %-го розчину нінгідрину й нагрійте до кипіння.

2.3. Отримані результати спостережень занесіть до таблиці.

3. Ксантопротеїнова реакція (на ароматичні амінокислоти)

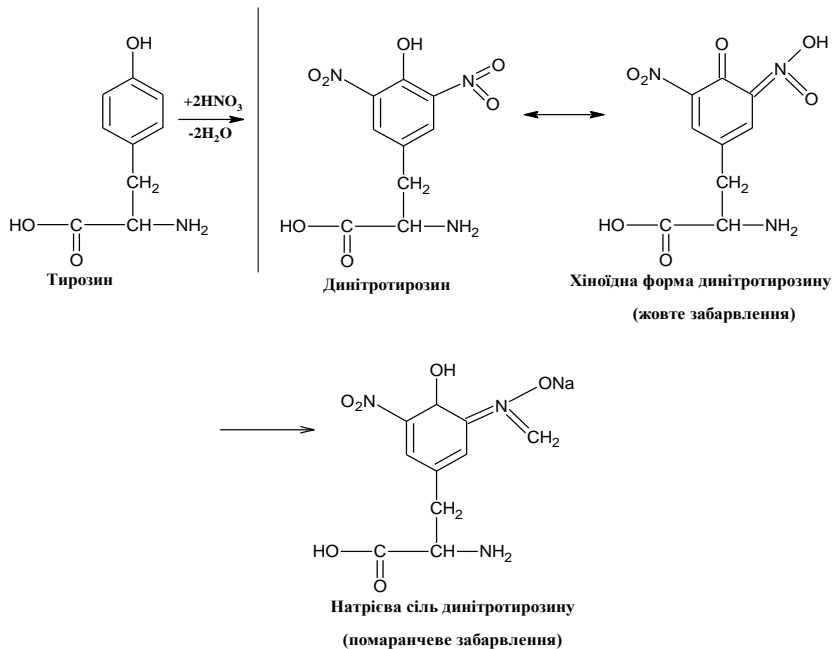
Назва «ксантопротеїнова» походить від грецького *xanthos* – жовтий.

Ксантопротеїнова реакція – це якісна реакція на ароматичні амінокислоти – **фенілаланін, тирозин і триптофан**.

Реакція ґрунтується на здатності амінокислот та амінокислотних залишків білків, які містять ароматичне кільце, під час нагрівання з концентрованою нітратною кислотою забарвлюватися у жовтий колір, що в лужному середовищі змінюється на помаранчевий.

За умов обробки білків концентрованою нітратною кислотою білок спочатку випадає в осад, а при нагріванні – розчиняється. Реакція зумовлена нітруванням бензольного кільця циклічних амінокислот з утворенням нітросполук жовтого кольору, а в лужному середовищі – солей хіноїдної природи, забарвлених у помаранчевий колір.

Наприклад, у реакції з тирозином утворюється динітротирозин; додавання розчину NaOH призводить до утворення натрієвої солі хіноїдної структури динітротирозину.



3.1. У пробірки № 1 налейте 0,5 мл 1 %-го розчину яєчного білка, у № 2 – 0,5 мл 1 %-го розчину желатину.

3.2. У кожну пробірку додайте по 3 краплі концентрованої HNO_3 та обережно нагрійте.

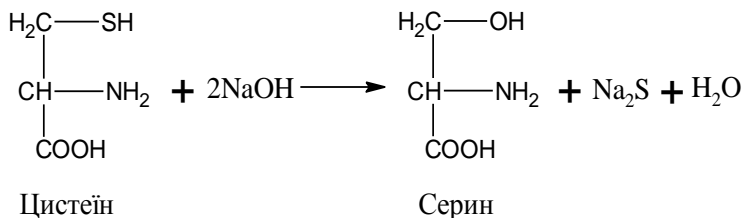
3.3. Після охолодження в пробірки додайте по 10 крапель 30 %-го розчину NaOH .

3.4. Результати спостережень занесіть до таблиці.

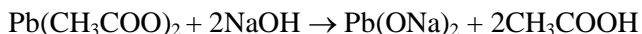
4. Реакція Фоля

Реакція Фоля виявляє в білках *цистеїн* і *цистин* (сульфуровмісні амінокислоти), які містять слабков'язаний сульфур, але не виявляє *метіонін*, у якому Сульфур зв'язаний ковалентно.

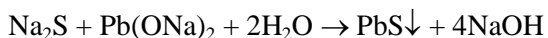
Суть реакції полягає в тому, що під час кип'ятіння білка з основами останні руйнують цистин і цистеїн, відщеплюючи від них Сульфур у вигляді дигідрогену сульфідру (H_2S), який у лужному середовищі утворює сульфід натрію (Na_2S):



Для виявлення сульфідів натрію використовується ацетат плюмбуму ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), який, взаємодіючи з гідроксидом натрію (NaOH), перетворюється на його плюмбіт ($\text{Pb}(\text{ONa})_2$):



Унаслідок взаємодії іонів Сульфуру та Плюмбуму утворюється сульфід плюмбуму (PbS) чорного або бурого (залежно від концентрації білка та кількості сульфуровмісних амінокислот) кольору:



4.1. У три пробірки налейте по 0,5 мл розчину 5 %-го $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

4.2. По краплях додайте 30 %-й розчин NaOH до розчинення утвореного осаду $\text{Pb}(\text{ONa})_2$.

4.3. У пробірки № 1 налейте 1 мл яєчного білка, № 2 – 1 мл желатину, № 3 – помістіть 1 – 2 волосини.

4.4. Суміш обережно нагрійте. При позитивній реакції розчин починає темніти.

4.5. Результати спостережень занесіть до таблиці.

Реакція	Матеріали досліді	Спостереження	Принцип реакції
Біуретова	Яєчний білок		
	Желатин		

Нінгідрінова	Яечний білок		
	Желатин		
Ксантопро- теїнова	Яечний білок		
	Желатин		
Фоля	Яечний білок		
	Желатин		
	Волосся		

Контрольні запитання

1. Охарактеризуйте принципи загальних та специфічних якісних реакцій на білки й амінокислоти.
2. З чим пов'язана неможливість виявлення метіоніну за допомогою реакції Фоля?
3. За допомогою якої якісної реакції в складі білка можна виявити фенілаланін, тирозин та триптофан?
4. За допомогою яких якісних реакцій можна встановити відмінності амінокислотного складу яєчного альбуміну та желатину?
5. Чому желатин із біуретовим реактивом утворює червоно-фіолетове забарвлення?
6. Як за допомогою кольорових реакцій виявити в білку: 1) фенілаланін; 2) цистеїн?

ВИЗНАЧЕННЯ СТУПЕНЮ ГІДРОЛІЗУ ПРОТЕЇНУ МЕТОДОМ ФОРМОЛЬНОГО ТИТРУВАННЯ

У процесі гідролізу білків відбувається руйнування пептидних зв'язків і молекула білка розпадається спочатку до високомолекулярних поліпептидів, а потім – до пептидів і, нарешті, до амінокислот.

Гідролізати протеїну (отримані штучно шляхом нагрівання з кислотою) застосовують з метою створення препаратів для парентерального харчування.

Матеріали дослідження та реактиви: 1 %-й розчин альбуміну, 1 %-й NaOH, 1 %-й CuSO_4 , концентрована H_2SO_4 , 20 %-й нейтральний розчин формаліну, 1 %-й розчин фенолфталеїну, 0,1 М розчин NaOH.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, зворотний холодильник, водяна баня.

1. Кислотний гідроліз протеїнів

Кислотний гідроліз білків у лабораторії проводять з участю концентрованої хлоридної або сульфатної кислот під час кип'ятіння. Це важливий метод вивчення первинної структури білка.

1.1. У невелику колбу, обладнану зворотним холодильником, додайте 20 мл 1 %-го розчину альбуміну і 5 мл концентрованої H_2SO_4 .

1.2. Кип'ятіть вміст колби під витяжною шафою протягом 60 – 90 хв.

1.3. Через кожні 30 хв (із моменту закипання) з гідролізатом здійснюйте біуретову реакцію: для цього до 0,5 мл гідролізату додайте 1 мл 1 %-го розчину NaOH і 3 краплі 1 %-го розчину CuSO_4 .

1.4. Для порівняння проведіть біуретову реакцію з 1 %-м розчином альбуміну. Проміжні продукти розпаду білка – пептони – при проведенні біуретової реакції дають рожеве або червоне забарвлення, а білки – синьо-фіолетове. Негативна біуретова реакція вказує на повне розщеплення білка до амінокислот.

1.5. Опишіть результати біуретової реакції, проведеної з білком і різними за часом порціями гідролізату.

Матеріали досліджу	Час гідролізу	Біуретова реакція	Обґрунтування

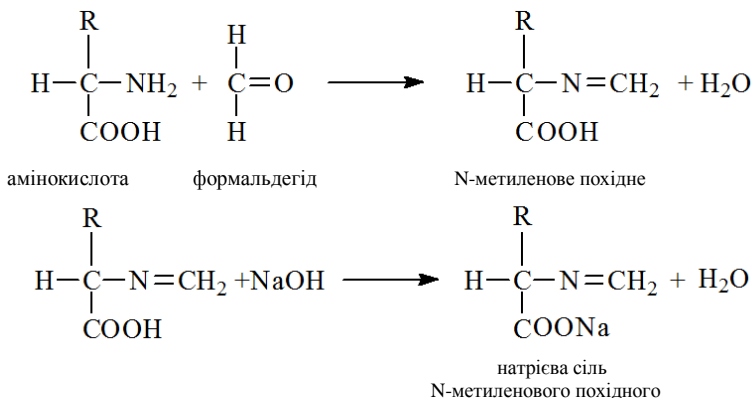
2. Визначення ступеню гідролізу білка методом Серенсена

Метод формольного титрування дозволяє прослідкувати за перебігом гідролізу білка, вивчати дію протеолітичних ензимів, а також визначати кількість білка, наприклад у молоці.

Принцип методу ґрунтується на тому, що кількість карбоксильних, отже й еквівалентну їм кількість аміногруп, визначають титруванням 0,1 М розчином натрію гідроксиду в присутності формальдегіду.

Формальдегід блокує аміногрупи, які володіють основними властивостями, внаслідок чого сполука втрачає амфотерний характер, розчин стає кислим (через наявність у амінокислот і білків карбоксильних груп), після чого його можна титрувати лугом.

Тому дана реакція використовується при кількісному визначенні α -амінокислот методом формольного титрування (алкаліметрія за методом Серенсена).



Білковий гідролізат отримують нагріванням протеїну з сульфатною кислотою. Вміст Нітрогену аміногруп визначають у 4-х пробах:

- 1) розчині білка до гідролізу;
- 2) гідролізаті протеїну, отриманого через 10 хвилин після гідролізу;
- 3) гідролізаті протеїну, отриманого через 40 хвилин;
- 4) розчині після повного гідролізу (1 годину).

2.1. У конічні колби налейте 5 мл відповідного розчину.

2.2. Додайте 3 мл 20 %-го нейтрального розчину формаліну і 2 – 3 краплі 1 %-го розчину фенолфталеїну.

2.3. Відтитруйте з бюретки 0,1 М розчином натрію гідроксиду до утворення рожевого забарвлення.

2.4. Проведіть розрахунок ступеню гідролізу, віднімаючи від кожного значення титрування кількість мл натрію гідроксиду, яка пішла на титрування розчину протеїну до гідролізу (1-а проба).

Приклад розрахунку. Наприклад, на титрування 5 мл першої проби пішло 0,4 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду, другої проби – 1,2 мл, третьої проби – 2,4 мл, четвертої проби – 4,5 мл.

Віднімаючи від кожного результату титрування кількість мл NaOH, яка пішла на титрування першої проби (0,4 мл), отримаємо наступні значення: на титрування другої проби

використано 0,8 мл; третьої проби – 2 мл; четвертої проби – 4,1 мл.

Кількість мл NaOH, яку використано на титрування четвертої проби, становить 100 %. Звідси ступінь гідролізу дорівнює:

1) для розчину протеїну до гідролізу:

$$\begin{array}{l} 4,5 \text{ мл} \quad \text{—————} \quad 100 \% \\ 0,4 \text{ мл} \quad \text{—————} \quad X \% \end{array}$$

$$X = \frac{0,4 \text{ мл} \cdot 100 \%}{4,5 \text{ мл}} = \mathbf{8,9 \%}$$

2) для гідролізату, отриманого через 10 хвилин:

$$\begin{array}{l} 4,5 \text{ мл} \quad \text{—————} \quad 100 \% \\ 0,8 \text{ мл} \quad \text{—————} \quad X \% \end{array}$$

$$X = \frac{0,8 \text{ мл} \cdot 100 \%}{4,5 \text{ мл}} = \mathbf{17,8 \%}$$

3) для гідролізату, отриманого через 40 хвилин:

$$\begin{array}{l} 4,5 \text{ мл} \quad \text{—————} \quad 100 \% \\ 2 \text{ мл} \quad \text{—————} \quad X \% \end{array}$$

$$X = \frac{2 \text{ мл} \cdot 100 \%}{4,5 \text{ мл}} = \mathbf{44,4 \%}$$

4) для гідролізату, отриманого через 60 хвилин:

$$\begin{array}{l} 4,5 \text{ мл} \quad \text{—————} \quad 100 \% \\ 4,1 \text{ мл} \quad \text{—————} \quad X \% \end{array}$$

$$X = \frac{4,1 \text{ мл} \cdot 100 \%}{4,5 \text{ мл}} = \mathbf{91,1 \%}$$

Оформлення роботи

Обрахуйте ступінь гідролізу альбуміну за методом Серенсена та зробіть відповідні висновки.

Контрольні запитання

1. З якою метою в лабораторних умовах проводять кислотний гідроліз білків?
2. За участю яких концентрованих кислот у лабораторії проводять кислотний гідроліз білків?
3. Яке забарвлення спостерігається при проведенні біуретової реакції із розчином альбуміну, пептонами та амінокислотами?
4. Яке практичне значення методу формольного титрування?
5. Охарактеризуйте принцип методу Серенсена.
6. Чому титрування гідролізату протеїну проводять за участю гідроксиду натрію в присутності формальдегіду?
7. Опишіть принцип розрахунку ступеню гідролізу протеїну методом формольного титрування.

ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ БІЛКІВ

Незворотне осадження білків

Білки рідин і тканин організму за дії різних фізико-хімічних факторів підлягають складним структурним змінам і можуть випадати з розчину в осад. За дії зовнішніх факторів порушується структурна організація білкової молекули при збереженні первинної структури. При цьому білок втрачає свої нативні фізико-хімічні та біологічні властивості.

Існує два основні **фактори стабілізації білків у розчинах**: *заряд і гідратна оболонка*, яка формується за рахунок орієнтації диполів води навколо гідрофільних залишків амінокислот. Група –ОН утримує дві молекули води; –COOH – три молекули; пептидний зв'язок – чотири молекули води.

Заряд білкової молекули виникає в результаті іонізації функціональних груп бокових радикалів амінокислотних залишків.

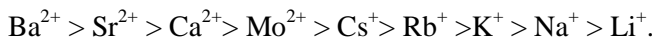
Розчинність білків залежить від:

- 1) амінокислотного складу;
- 2) особливостей структурної організації білків;
- 3) властивостей розчинників. Нейтральні солі здатні підвищувати розчинність білків через взаємодію їх іонів із полярними групами білків.

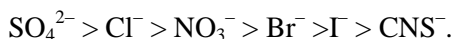
Основою осадження білків є дегідратація молекул (руйнування гідратної оболонки), яка спостерігається при додаванні до розчинів білків водовідбірних речовин (спирту, ацетону, концентрованих розчинів нейтральних солей) або при зниженні електричного заряду білкових молекул до ізоелектричного стану внаслідок зміни рН-середовища.

Наприклад, для осадження гідрофільних частинок необхідно зняти гідратну оболонку спиртом і заряд частинок – електролітом. Послідовність цих дій не має значення для процесу осадження. Ступінь осадження білків солями лужних і лужноземельних металів залежить від радіусів іонів та їх властивостей гідратуватися. Так, іони можуть бути розташовані

рядами, які називаються ліотропними рядами катіонів і аніонів (рядами Гофмейстера). Наприклад, ліотропний ряд для катіонів має такий вигляд:



Для аніонів у більш лужному середовищі порівняно з ізоелектричною точкою білка це буде такий ряд:



За глибиною зміни білка реакції осадження можна поділити на **зворотні** (висолування) та **незворотні** (денатурація).

Зворотні реакції – це ті, за яких осаджені білки не підлягають глибоким структурним змінам і можуть бути знову перерозчинені. До зворотних реакцій належить більшість реакцій висолування, осадження білків спиртом або ацетоном за умов короткочасної дії цих реактивів на білок і низької температури. При обережному осаджуванні водовідбірними засобами можна отримати білки в кристалічному стані, які ще містять деяку кількість води й добре зберігають свою кристалічну форму лише в тому розчині, з якого вони осаджені. При висушуванні білкові кристали, втрачаючи воду, перетворюються на аморфну масу.

При *незворотних реакціях* осадження білки підлягають глибоким структурним змінам і не можуть бути знову перерозчинені. При цьому втрачається специфічна біологічна й ферментативна активність білка, здатність кристалізуватися, змінюється форма та розмір молекул, збільшується реактивність і кількість вільних хімічних груп, особливо сульфогідрильних. Білок стає менше гідрофільним.

Матеріали дослідження та реактиви: 1 %-й розчин яєчного білка, 1 %-й розчин желатину, 1 %-й розчин та концентрована CH_3COOH , 5 %-й CuSO_4 , 10 %-й NaOH , насичений розчин NaCl , концентрована HCl , HNO_3 , 10 %-й розчин $\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_5(\text{OH})\text{COOH}$ (сульфосаліцилова кислота), 10 %-й розчин CCl_3COOH , ацетон,

10 %-й розчин пікринової кислоти, 5 %-й $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 1 %-й NaCl , 0,1 та 1 М CH_3COOH , 0,1 М CH_3COONa .

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, водяна баня.

Осадження білків неорганічними осаджувачами

1. Осадження білків мінеральними кислотами

Білок під час взаємодії з мінеральними кислотами (окрім фосфатної) денатурується і випадає в осад унаслідок дегідратації та нейтралізації зарядів колоїдних частинок, а також утворення комплексних солей. За умов тривалої дії, а також при надлишку всіх мінеральних кислот, за винятком нітратної, відбувається частковий гідроліз і перезарядження білка, осад його розчиняється. При надлишку нітратної кислоти розчинення не відбувається. Реакція осаження білка з нітратною кислотою високоспецифічна та високочутлива і використовується в клініко-біохімічних дослідженнях для виявлення білка в сечі.

1.1. У дві пробірки налейте по 1 мл відповідно концентрованої HCl та HNO_3 .

1.2. Акуратно по стінці в обидві пробірки додайте по 1 мл розчину білка. На межі двох шарів рідин утворюється осад білка у вигляді тонкої плівки.

1.3. Результати спостережень занесіть до таблиці.

2. Осадження білків солями важких металів

Білки з розчинів легко осаджуються солями важких металів (Плюмбуму, Купруму, Аргентуму, Меркурію), які адсорбуються на поверхні білкових молекул й утворюють з ними міцні солеподібні комплексні сполуки, а також змінюють електричний заряд і структуру макромолекул. Для осаження білків солями важких металів потрібні незначні концентрації останніх. При застосуванні ацетату плюмбуму та сульфату купруму надлишок цих солей спричиняє розчинення утвореного ними осаду, що пояснюється адсорбцією надлишкових іонів металів і

перезарядженням білкового комплексу, внаслідок чого в розчин переходить комплекс зміненого білка з металом. Це явище називається *адсорбційною пептизацією*.

Осадження солями важких металів призводить до денатурації білка. Осади солей важких металів, як правило, нерозчинні навіть після видалення солей діалізом або розчинення водою. Властивістю білків зв'язувати важкі метали користуються в клінічній практиці, вживаючи білки (молоко, яйця) як протиотруту при отруєнні солями аргентуму (сулема), плюмбуму або купруму (від недоброякісного посуду), поки ці солі не встигли всмоктатися.

2.1. У дві пробірки налейте по 1 мл 1 %-го розчину яєчного білка.

2.2. Потім у першу пробірку додайте 5 крапель 5 %-го розчину CuSO_4 , у другу – 5 %-го розчину $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

2.3. Спостерігайте за утворенням осаду в пробірках.

2.4. Результати спостережень занесіть до таблиці.

Осадження білків органічними осаджувачами

3. Осадження білків органічними кислотами

Органічні кислоти неоднаково діють на білки. CCl_3COOH (трихлороцтова) і $\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_5(\text{OH})\text{COOH}$ (сульфосаліцилова) – дуже чутливі та специфічні реактиви на білок, їх широко використовують у лабораторній практиці.

Трихлороцтова кислота (ТХО) осаджує лише білки й не осаджує високомолекулярні та низькомолекулярні продукти їх розпаду – пептиди, сечовину, аміди, амінокислоти. Осадження білків за допомогою трихлороцтової кислоти в кінцевій концентрації 2,5–5 % часто застосовується для повного видалення білка з біологічних рідин (наприклад сироватки крові), оскільки ТХО осаджує тільки білки, а продукти їх гідролізу залишаються в розчині. Це має важливе значення для визначення білкового та небілкового азоту в тканинах.

Сульфосаліцилова кислота осаджує не лише білки, а й пептиди.

Механізм осадження білків органічними кислотами пояснюється дегідратацією білкової молекули та зняттям електричного заряду.

3.1. У дві пробірки налейте по 1 мл 1 %-го розчину білка.

3.2. У пробірці № 1 додайте 5 крапель 10 %-го розчину $\text{HO}_3\text{SC}_6\text{H}_5(\text{OH})\text{COOH}$, № 2 – стільки ж розчину CCl_3COOH . У пробірках утворюється осад білка.

3.3. Результати спостережень занесіть до таблиці.

4. Осадження білків органічними розчинниками

Більшість органічних розчинників (спирт, ацетон, ефір, хлороформ) осаджують білки з нейтральних і слабкокислих розчинів. Дія органічних розчинників полягає у зв'язуванні молекул води та дегідратації частинок білка, а також у зменшенні діелектричної сталої водних розчинів та іонізації білків, унаслідок чого знижується їх стійкість у розчинах. Якщо в розчині білка є солі, то осад утворюється швидше й повніше. Іони солі зв'язуються колоїдними частинками білка і нейтралізують їх заряд, що ще більше знижує стійкість білка в розчині. Коли осадження проводити на холоді й одержаний осад швидко відокремити від спирту, то білок може бути знову розчинений у воді. При тривалому перебуванні в спирті відбувається денатурація білка.

4.1. У пробірку налейте 1 мл 1 %-го розчину яєчного білка та додайте 1 мл ацетону. Спостерігайте за помутнінням.

4.2. Додайте до пробірки кілька крапель 1 %-го NaCl .

4.3. Результати спостережень занесіть до таблиці.

5. Осадження білків алкалоїдними реактивами

Реакції осадження білків алкалоїдними реактивами незворотні та зумовлені тим, що білки як і алкалоїди містять азотисті гетероциклічні угруповання. Механізм осадження полягає в утворенні нерозчинних солеподібних сполук з основними азотистими групами білка. У цьому комплексі білок слугує катіоном, а алкалоїдний реактив – аніоном. Осадження

білків треба проводити в кислому середовищі, оскільки частинки білка перезаряджаються та переходять у стан катіонів. У лужному середовищі осад білка розчиняється. Протаміни та гістони, які мають позитивний заряд, добре осаджуються алкалоїдними реактивами в нейтральному середовищі без підкислення.

Алкалоїдні реактиви: танін, пікринова кислота, калію гексаціаноферат (жовта кров'яна сіль) та ін.

5.1. У пробірку налейте 1 мл 1 %-го розчину яєчного білка та додайте краплю 1 %-го розчину CH_3COOH .

5.2. Додайте до пробірки 2 – 3 краплі 10 %-го розчину пікринової кислоти.

5.3. Результати спостережень занесіть до таблиці.

Запишіть результати реакцій незворотного осадження білка за дії неорганічних і органічних осаджувачів у вигляді таблиці:

Назва речовин, які осаджують білки	Використані реактиви	Характер і колір осаду	Чим зумовлена реакція
Мінеральні кислоти			
Солі важких металів			
Органічні кислоти			

Органічні розчинники			
Алкалоїдні реактиви			

6. Осадження білків під час нагрівання та вплив рН на осадження білка

Майже всі білки під час нагрівання коагулюють (зсідаються). Теплова денатурація різних білків відбувається за різних температур. Одні білки коагулюють за 40–55 °С, інші можуть витримувати довгочасне кип'ятіння або зовсім не зсідаються (протаміни, гістони тощо). Із підвищенням температури теплова коагуляція прискорюється.

Найповніше та найшвидше осадження білка під час нагрівання відбувається в ізоелектричній точці. Ізоелектрична точка для більшості білків знаходиться в слабкокислому середовищі (рН приблизно 5). Виняток становлять гістони та протаміни з ізоелектричною точкою в лужному середовищі (рН приблизно 8).

У сильноокислих (за винятком нітратної, трихлороцтової та сульфосаліцилової кислот) розчинах денатурований під час нагрівання білок не випадає в осад, тому що частинки білка перезаряджуються. Це підвищує їхню стійкість у розчині внаслідок дії електростатичних сил відштовхування.

Однак у сильноокислих розчинах білки під час нагрівання можуть коагулювати, якщо додати достатню кількість нейтральної солі, адсорбція іонів якої приведе до нейтралізації заряду білка.

6.1. У 5 пронумерованих пробірок налейте по 1 мл 1 %-го розчину яєчного білка.

6.2. У пробірку № 2 додайте 2 краплі 1 %-го розчину CH_3COOH , в пробірку № 3 – 2 краплі концентрованої CH_3COOH , № 4 – 1 мл концентрованої CH_3COOH і 5 – 6 крапель насиченого розчину NaCl , № 5 – 1 мл 10 %-го розчину NaOH .

6.3. Усі пробірки нагрійте до кипіння.

6.4. Запишіть у таблицю результати осадження білків під час кип'ятіння в різних середовищах. Вкажіть у кожному випадку причини появи або відсутності осаду білка.

Результати спостережень дослідів з осадження білків під час нагрівання оформіть у вигляді таблиці:

№ пробір-ки	Середовище	Результати спостережень	Чим зумовлена реакція
1.	Нейтральне середовище		
2.	Слабкокислое середовище (1 % CH_3COOH)		
3.	Кислое середовище (конц. CH_3COOH)		
4.	Кислое середовище + електроліт (конц. CH_3COOH + NaCl)		

5.	Лужне середовище (10 % NaOH)		
----	------------------------------	--	--

Контрольні запитання

1. Які основні фактори забезпечують стабілізацію білків у розчинах?
2. Чим зумовлена розчинність білків?
3. Охарактеризуйте особливості зворотного та незворотного осадження білків.
4. Що таке денатурація білка? Які фізичні та хімічні чинники викликають денатурацію білка?
5. Які речовини використовують для осадження білків? На чому ґрунтується принцип їх дії?
6. Охарактеризуйте білки як амфотерні електроліти.
7. Які особливості температурного осадження білків?
8. За яких значень рН при температурі білки швидше підлягають коагуляції?
9. У чому різниця між зворотним і незворотним осадженням білків під впливом температури?
10. При якому значенні рН відбувається найінтенсивніше осадження білків?

ВИЗНАЧЕННЯ ІЗОЕЛЕКТРИЧНОЇ ТОЧКИ БІЛКА

Білки розглядають як амфотерні сполуки, яким притаманні одночасно кислотні та основні властивості. Кислотні властивості білків реалізуються, в основному, за рахунок карбоксильних груп аспартату та глутамату. Кислу реакцію проявляють також фенільні, гідроксильні та сульфогідрильні групи амінокислот. Основні властивості білка проявляються за наявності гуанідинової та імінної груп. Маючи одночасно кислотні та основні властивості, білки утворюють біполярні іони.

У лужному середовищі білок відіграє роль аніона. При втраті протона з групи $-\text{NH}_3^+$, наприклад, при дії NaOH, утворюється натрієва сіль білка (протеїнат натрію).

У кислих розчинах, навпаки, білок відіграє роль катіона, наприклад, з хлоридною кислотою утворюється хлористоводнева сіль (протеїну хлорид).

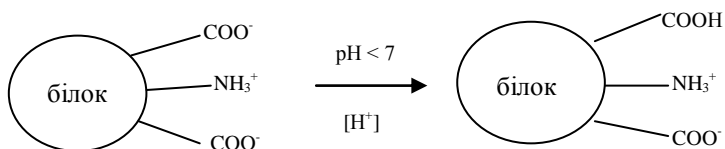
Отже, фактором, який визначає поведінку білка як аніона чи катіона, є концентрація водневих іонів, підвищення якої (кисле середовище) зменшує кислотну дисоціацію білка і переводить його в катіон, а зниження, – навпаки, пригнічує основну дисоціацію і переводить білкові частинки в аніони. Однак при певному значенні рН (неоднаковому для різних білків) кислотна дисоціація білкової частини стає рівною основній – кількість позитивних зарядів амфотерного іона білка дорівнює кількості негативних зарядів, тому заряд в цілому може стати майже рівним нулю. За даних умов білок перебуває в ізоелектричному стані.

рН розчину, при якому білок перебуває в ізоелектричному стані, називається *ізоелектричною точкою білка*. У цій точці білок майже цілком має у вигляді амфотерних іонів, які несуть рівні кількості позитивних і негативних зарядів, натомість при інших концентраціях водневих іонів у білка переважно позитивний або негативний заряди. Розчини білків в ізоелектричній точці найнестійкіші. У цьому разі

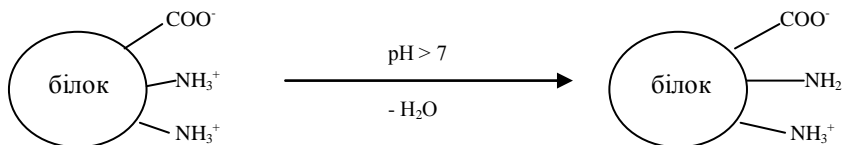
відштовхування однойменно заряджених частинок, які підвищують стійкість розчину, припиняється, і як стабілізаційний чинник діє лише гідратна оболонка білка.

Для більшості білків ізоелектрична точка наближена до нейтрального середовища, але зсунута до кислих значень рН.

Для кислих білків значення ізоелектричної точки лежить в межах рН менш як 7,0, в якій пригнічується дисоціація карбоксильних груп:



Для деяких білків значення ізоелектричної точки перебуває у межах рН понад 7,0, у якій пригнічується дисоціація аміногруп:



Визначення ізоелектричної точки білка на практиці означає з'ясувати рН розчину, при якому спостерігається найшвидше та повне випадання білка в осад.

У даному завданні проводитиметься визначення ізоелектричної точки желатину. На відміну від інших білків, желатин осаджується в ізоелектричній точці без додавання водовідбірних засобів.

Матеріали дослідження та реактиви: 1 %-й розчин желатину, 0,1 М-й розчин CH₃COOH, 1 М-й розчин CH₃COOH, 0,1 М-й розчин CH₃COONa, 96 %-й етиловий спирт.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки.

1.1. У 6 сухих пробірок внесіть реактиви у кількості (в мл) відповідно до таблиці.

№	1	2	3	4	5	6
H ₂ O	3,8	3,5	3,0	2,0	-	3,2
0,1 М СН ₃ СООН	0,8	0,5	1,0	2,0	4,0	-
1 М СН ₃ СООН	-	-	-	-	-	0,8
0,1 М СН ₃ СООНа	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
1 %-й розчин желатину	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
pH	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
Ступінь помутніння						

1.2. Вміст кожної пробірки перемішайте.

1.3. У всі пробірки повільно по стінці внесіть по 2 мл 96 %-го етанолу. Пробірки залишіть на 30 хв.

1.4. Визначте ізоелектричну точку желатину. Ізоелектрична точка відповідатиме рН пробірки з максимальним ступенем помутніння. Ступінь помутніння позначте у таблиці «-», «+», «++», «+++».

Контрольні запитання

1. Чому в ізоелектричній точці розчини білків нестійкі?
2. Чому ізоелектрична точка є індивідуальною характеристикою кожного білка?
3. Чому білки при нагріванні в ізоелектричній точці швидко випадають в осад і не випадають при нагріванні в сильноокислому або сильнолужному середовищі?
4. Що означає визначення ізоелектричної точки білка на практиці?
5. Який принцип визначення ізоелектричної точки желатину?

МЕТОДИ ВИСОЛЮВАННЯ Й ОЧИЩЕННЯ БІЛКІВ

I. Висолювання білків

При додаванні до водних розчинів білків сульфатів або хлоридів лужних і лужно-земельних металів відбувається дегідратація та нейтралізація білкових частин, при цьому білки випадають в осад без зміни нативної структури. Такий тип осадження білків називається **висолюванням**.

Висолювання – зворотний процес, і після видалення солі (наприклад діалізом) білок знову набуває природних властивостей. Оскільки різні білки висолюються при різних концентраціях солей, цей метод використовується для фракціонування білків.

Для розділення білків методом висолювання використовують високі концентрації розчинів солей: NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgSO_4 , Na_2SO_4 . У практиці найчастіше використовують хлорид натрію (NaCl) чи сульфат амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Гідратна оболонка утворює захисний шар для білкових частинок, не дає їм можливості коагулювати. Важливий фактор стійкості білкових розчинів – однойменний електричний заряд частинок, який сприяє їх відштовхуванню.

Якщо до розчинів білків додавати солі лужних і лужно-земельних металів, то їхні іони адсорбуються молекулами білків, знімають з них електричні заряди та перетворюють на електронейтральні. Надалі колоїдні частинки збільшуються, що зумовлює утворення осаду. Окрім того, солі лужних металів розчиняючися, зв'язують велику кількість води, що призводить до дегідратації білкової молекули. Втративши електричний заряд і гідратну оболонку, білки випадають в осад.

Осадження білків методом висолювання при різному насиченні та різних рН розчину залежить від різниці молекулярної маси, міри дисперсності, іонної сили осаджувача та використовується для фракціонування білків, їх кристалізації, отримання очищених ферментних препаратів. Так, глобуліни, маючи більшу молекулярну масу порівняно з альбумінами,

легше випадають в осад. Концентрованими розчинами амонію сульфату висолюються майже всі білки: глобуліни – при напівнасиченні, альбуміни – при повному насиченні. Натрію і калію хлоридами, магнію сульфатом осаджуються глобуліни при повному насиченні, а при слабкому підкисленні (в ізоелектричній точці) цими солями осаджуються й альбуміни.

Матеріали дослідження та реактиви: 1 %-й розчин яєчного білка, 1 %-й розчин CH_3COOH , порошок NaCl , 1 %-й NaOH , 1 %-й CuSO_4 , порошок і насичений розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 %-й AgNO_3 .

1. Висолювання білків натрію хлоридом

1.1. У пробірку налейте 4 мл розчину яєчного білка та додайте порошок NaCl до повного насичення розчину (доки нова порція порошку припинить розчинятися). Через кілька хвилин з'являється осад глобулінів.

1.2. Вміст пробірки відфільтруйте. У фільтраті залишаються альбуміни, які в нейтральних розчинах не випадають в осад навіть при додаванні натрію хлориду до повного насичення.

1.3. До фільтрату додайте 1 мл 1 %-го розчину CH_3COOH й прокип'ятіть. У слабкокислому середовищі альбуміни випадають в осад.

1.4. Через 2 хвилини альбуміни відфільтруйте та перевірте фільтрат на відсутність білка за допомогою кип'ятіння та біуретової реакції.

1.5. Для цього у дві пробірки додайте по 1 мл фільтрату. Пробірку № 1 поставте на киплячу баню, а до пробірки № 2 додайте 1 мл 1 %-го розчину NaOH і 3 краплі 1 %-го розчину CuSO_4 .

1.6. Через 3 хвилини проведіть спостереження. Негативна реакція (№ 1 – прозорий, № 2 – блакитний) в обох випадках вказує на відсутність білка.

1.7. Результати спостережень занесіть до таблиці.

2. Висолювання білка амонію сульфатом

2.1. До 3 мл білка додайте 3 мл насиченого розчину $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ і перемішайте. Утворюється напівнасичений розчин амонію сульфату, у якому випадає осад глобулінів.

2.2. Через 5 хв відфільтруйте вміст пробірки. У фільтраті залишається інша фракція – альбуміни.

2.3. До фільтрату додайте порошок амонію сульфату до повного насичення. Випадає осад яєчного альбуміну.

2.4. Осад відфільтруйте й перевірте фільтрат на відсутність білка за допомогою кип'ятіння та біуретової реакції (див. 1.5.)

2.5. Результати спостережень занести до таблиці.

Занести результати фракціонованого розділення білків до таблиці:

Білкові фракції	Насичений розчин NaCl	Слабокисле середовище після висолювання NaCl	Напівнасичений розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Насичений розчин $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
Альбуміни				
Глобуліни				

II. Очищення білків

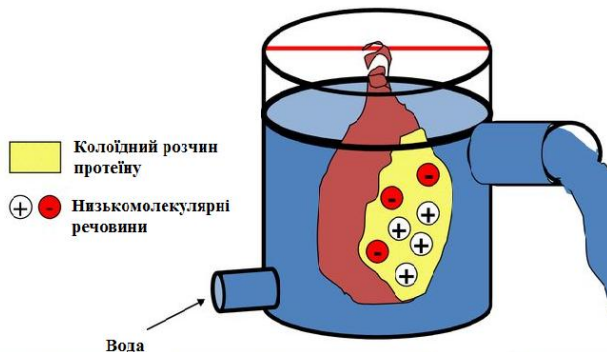
3. Діаліз

Процес розділення високомолекулярних і низькомолекулярних часток за допомогою напівпроникних мембран називається **діалізом**. *Метод ґрунтується* на нездатності колоїдних частинок проникати через напівпроникні мембрани (штучні мембрани, колодій, целофан, пергамент тощо). Цей метод широко використовується для очищення білків від низькомолекулярних домішок, зокрема надлишку солей. Низькомолекулярні речовини легко дифундують через

напівпроникні мембрани в чистий розчинник, утворюючи діалізат. Дифузія триватиме доти, доки не відбудеться вирівнювання концентрацій дифундуючих речовин між діалізуючим розчином і діалізатом. Процес поновиться, якщо діалізат замінити чистим розчинником або якщо ця зміна відбуватиметься постійно (проточний діаліз).

Прикладом природних напівпроникних мембран можуть виступати капсули Шумлянського-Боумена нирок.

Прилад, який використовується для діалізу, називається *діалізатором*. Найпростішим діалізатором може виступати колодісвий або целофановий мішечок, опущений в склянку з водою. Розчин білка поміщають в целофановий мішечок; при цьому молекули низькомолекулярних речовин дифундують через мембрану, а колоїдний розчин білка залишається в діалізному мішечку.



На основі штучних напівпроникних мембран створені клінічні діалізатори, зокрема штучна нирка. Метод діалізу використовують в наукових лабораторіях, промисловості та клінічній практиці.

Методом діалізу можна частково розділити глобуліни та альбуміни. З переходом солей у навколишнє середовище глобуліни будуть випадати в осад, оскільки вони розчинні лише за наявності електролітів, альбуміни будуть залишатися в розчині.

3.1. Целофан (квадрат 10×10 см) змочіть дистильованою водою, зробіть у ньому заглиблення та отримаєте діалізний мішечок.

3.2. У діалізний мішечок налейте 5 мл сольового розчину білка.

3.3. Верхній край мішечка закріпіть між двома суміжними паличками, скріпіть їх краї і занурте діалізний мішечок у склянку з дистилатом на 60 хв.

3.4. Мішечок із сольовим розчином білка помістіть у стакан з дистильованою водою так, щоб частина мішечка з розчином білка була повністю занурена у воду. Зразу ж на просвіт можна помітити цівки сольового розчину, які опускаються з мішечка на дно склянки, що зумовлено зміною рефракції води.

3.5. Після закінчення діалізу вміст мішечка виллїть у пробірку № 1 (діалізат), у пробірку № 2 налейте рідину зі склянки, у пробірку № 3 – дистилат. Уміст трьох пробірок використайте для аналізу на хлориди й білок. Для цього проведіть нижчеподані реакції.

3.6. У три пробірки налейте по 1 мл відповідно діалізату (№ 1), розчину зі склянки (№ 2) та дистилату (№ 3). У кожную пробірку додати по 3 краплі 10 %-го розчину AgNO_3 . Проаналізуйте, у якій пробірці випадає осад аргентуму хлориду.

3.7. У три інші пробірки налейте по 1 мл відповідно діалізату (№ 1), рідини зі склянки (№ 2) та дистилату (№ 3). В усі пробірки додайте по 1 мл 1 %-го NaOH та 3 краплі 1 %-го розчину CuSO_4 . Синьо-фіолетове забарвлення свідчить про наявність білка в розчині.

Занесіть результати спостережень до таблиці.

Розчини, які досліджуються	Реакція з AgNO_3	Біуретова реакція	Чим зумовлена реакція
Діалізат			
Рідина зі склянки			
Дистилат			

Контрольні запитання

1. Що таке висолювання білків? Чим зумовлений даний процес?
2. Які білкові фракції можна розділити методом висолювання?
3. Якими із відомих Вам методів можна розділити альбуміни та глобуліни?
4. Які протеїнові фракції випадають в осад при 50 %-му насиченні розчину яєчного білка сульфатом амонію?
5. Які білки осаджуються при повному насиченні розчину білків сульфатом амонію?
6. До якого виду реакцій осадження (зворотних чи незворотних) належить висолювання?
7. Як визначити наявність в розчині глобулінів?
8. Яким методом можна очистити розчин білка від низькомолекулярних речовин?
9. Як довести, що під час діалізу білок залишається в діалізному мішечку, а іони солі переходять у воду?

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТЕЇНІВ

Для кількісного визначення протеїнів використовують *фізичні, хімічні та біологічні методи*.

Із фізичних методів найпростішим є зважування чистого протеїну. Однак протеїни дуже гігроскопічні, і повністю видалити з їх складу воду важко, тому цей спосіб застосовують рідко.

Найбільшого поширення серед фізичних методів кількісного визначення протеїнів отримали рефрактометричний (за показником заломлення розчинів протеїнів), спектрофотометричний (поглинання в ультрафіолетовій частині спектру) та полярографічний (за кривими, які показують залежність між силою струму та напругою, застосованими до системи, що містить протеїн), пікнографічний метод (за густиною білкових розчинів).

Хімічні методи кількісного визначення білків різноманітні. Найпростіший хімічний метод – кількісне визначення загального або білкового (після осадження протеїну та відділення його від розчинних нітрогеновмісних речовин) Нітрогену.

Найпоширенішим біологічним методом кількісного визначення протеїнів є колориметричний метод. Він ґрунтується на вимірюванні інтенсивності забарвлення, яке розвивається після взаємодії білка зі специфічним реагентом.

На практиці найчастіше використовують колориметричні та спектрофотометричні методи. До колориметричних методів кількісного визначення білка належить біуретовий метод, метод Лоурі, Бредфорда тощо.

У клініко-біохімічних лабораторіях проводять визначення концентрації білків у біологічних рідинах організму (крові, спинномозковій рідині, ексудатах). У нормі вміст загального білка в сироватці крові дорослих – 60–85 г/л. Зменшення вмісту протеїну нижче від 60 г/л – *гіпопротеїнемія*, а збільшення концентрації понад ніж 85 г/л – *гіперпротеїнемія*.

Для кількісного визначення білків у крові не можна використовувати сироватку, яка містить сліди гемолізу, оскільки гемоглобін, який вивільняється при гемолізі еритроцитів, також дає позитивну біуретову реакцію.

Матеріали дослідження та реактиви: стандартні розчини білків (100 г/л, 1 мг/мл, 10 мкг/мл), сироватка крові, біуретовий реактив, реактив Фоліна (розвести у два рази); реактив А (2 %-й розчин Na_2CO_3 в 0,1 н NaOH); реактив В (0,5 %-й розчин $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ в 1 %-му розчині $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$); реактив С (1 мл реактиву В змішати з 50 мл реактиву А), розчин *Coomassie brilliant blue*, 95 %-й етиловий спирт, 95 %-а H_3PO_4 .

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, фотоелектроколориметр, спектрофотометр.

1. Спектрофотометричний метод

Спектрофотометричний метод ґрунтується на визначенні абсорбції розчину при довжині хвилі 280 нм. Здатність поглинати світло в ультрафіолетовій частині спектра мають лише **триптофан, тирозин і фенілаланін**. Оскільки білки відрізняються за вмістом ароматичних амінокислот, їх поглинання в ультрафіолетовій частині спектра може відрізнитися. Абсорбція розчинів білків, які містять дані амінокислоти, при 280 нм прямо пропорційна їх концентрації в розчині.

Умовно вважають, що при усередненому вмісті білка в розчині 1 мг/мл, величина абсорбції при 280 нм дорівнює 1,0 (при товщині шару рідини в 1 см). Використання даного методу дозволяє здійснювати визначення білка швидко та не потребує використання додаткових реагентів.

Однак дослідженню концентрації протеїну даним методом заважає присутність нуклеїнових кислот і нуклеотидів.

1.1. У кварцеві кювети № 1 помістіть 3 мл стандартного розчину протеїну, № 2 – сироватки крові, розведеної у співвідношенні 0,01 : 1000.

1.2. Визначте величину екстинкції на спектрофотометрі при довжині хвилі 260 нм (частина спектра поглинання сполук нуклеотидної природи) і 280 нм.

1.3. Вміст білка розрахуйте за допомогою номограми Адамса (рис. 1): експериментально отримані величини екстинкцій при 260 і 280 нм знайдіть у відповідних стовпцях номограми і з'єднайте їх прямою лінією; точка перетину цієї прямої зі шкалою, на якій наведена концентрація білка, визначає вміст білка в досліджуваному розчині.

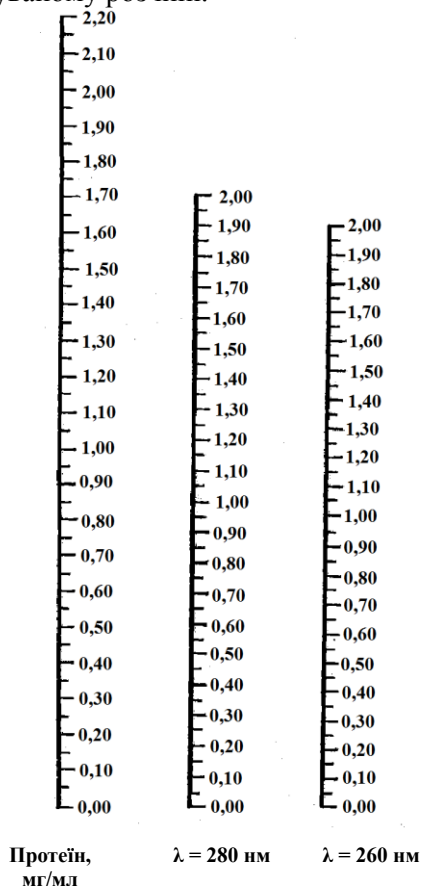


Рис. 1. Номограма для визначення концентрації протеїну

1.4. Концентрацію протеїну можна також розрахувати за формулою Калькара:

$$C = 1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260}$$

2. Біуретовий метод

Біуретовий метод ґрунтується на утворенні комплексних сполук синьо-фіолетового забарвлення в результаті взаємодії іонів купруму з пептидними зв'язками білка в лужному середовищі. Забарвлений комплекс утворюється лише з пептидами, які містять більш ніж 4 амінокислотні залишки. Абсорбцію розчину (прямо пропорційну концентрації пептиду) визначають при 540 – 560 нм.

Чутливість методу – 2 – 10 мг/мл.

2.1. У пробірки № 1 налейте 1 мл сироватки крові, № 2 – 1 мл стандартного розчину білка, № 3 – 1 мл води (контроль).

2.2. У кожену з пробірок налейте по 2 мл біуретового реактиву, добре перемішайте й залишіть на 30 хв.

2.3. Після закінчення цього часу проведіть вимірювання на ФЕКу при зеленому світлофільтрі (540–560 нм) і розрахуйте вміст білка в розчинах за формулою:

$$C_{\text{досл.}} = C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{досл.}} / E_{\text{ст.}}$$

де $C_{\text{досл.}}$ – концентрація невідомого розчину білка,

$C_{\text{ст.}}$ – концентрація стандартного розчину білка (100 г/л),

$E_{\text{досл.}}$ – екстинкція дослідної проби (невідомого розчину білка),

$E_{\text{ст.}}$ – екстинкція стандартного розчину білка.

Приклад розрахунку. Якщо екстинкція стандартної проби дорівнює 0,40, а дослідної – 0,28, то:

$$C = 100 \cdot 0,28 / 0,40 = 70 \text{ (г/л)}$$

3. Метод Лоурі

Метод Лоурі базується на утворенні забарвлених продуктів синього кольору, які утворюються внаслідок двох самостійних реакцій:

- біуретової із купрум-іонами в лужному середовищі;
- відновлення фосфатномолібденової та фосфатновольфрамної солей реактиву Фоліна.

Поєднання двох реакцій (біуретової та реакції Фоліна) значно підвищує чутливість методу. Метод Лоурі майже в 100 разів чутливіший, ніж біуретовий, і в 10–20 разів, ніж спектрофотометричний; та специфічніший. Це дає змогу визначати слідові кількості білка (20–50 мкг/мл).

3.1. Візьміть дві пробірки: у першу (дослідну) внесіть 0,1 мл сироватки крові та 0,9 мл дистилату, в другу (контрольну) – 1 мл дистильованої води.

3.2. До вмісту обох пробірок додайте 2 мл реактиву С та перемішайте.

3.3. Через 5 хв до кожної пробірки додайте 0,2 мл розведеного реактиву Фоліна та залишіть на 30 хв у темряві.

3.4. Виміряйте інтенсивність забарвлення реакційної суміші на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 750 нм (червоний світлофільтр).

3.5. Кількість білка в розчині знайдіть за калібрувальною кривою.

3.6. Побудова калібрувального графіка

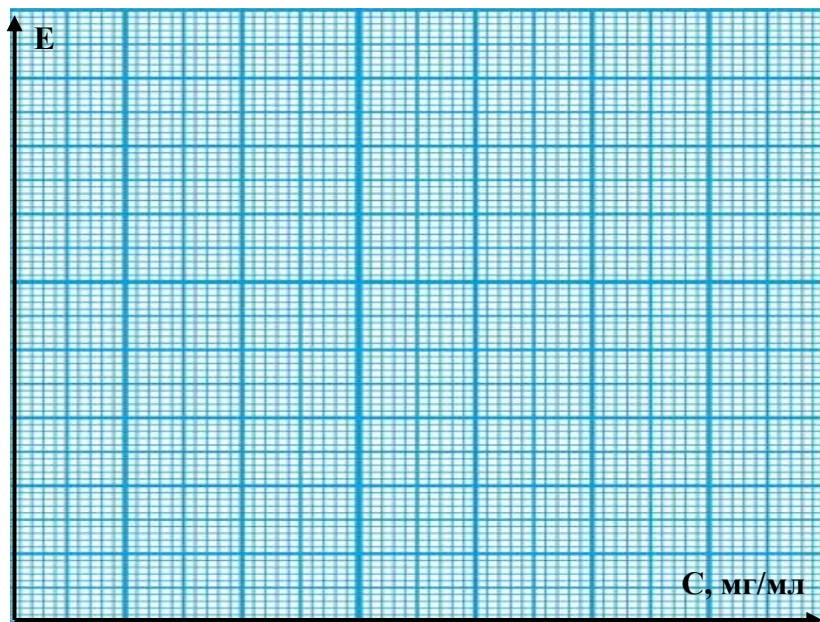
Для побудови калібрувального графіка приготуйте 50 мл стандартного розчину білка, який містить 1 мг білка у 1 мл розчину.

У серію пробірок відберіть по 0,05, 0,1, 0,2, 0,025, 0,4, 0,6, 0,8, 1 мл стандартного розчину білка й довести об'єм кожної пробірки до 1 мл дистилатом. З кожною пробіркою проведіть реакцію, як описано вище.

Виміряйте інтенсивність забарвлення кожної проби на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 750 нм.

Калібрувальний графік побудуйте, відкладаючи на осі абсцис концентрації використаних розчинів білка, а на осі ординат – відповідні їм значення екстинкції.

Концентрація білка, мг/мл	Екстинкція, од. абсорбції	Екстинкція, од. абсорбції	\bar{E}
0,05			
0,1			
0,2			
0,025			
0,4			
0,6			
0,8			
1			



4. Метод Бредфорда

Метод ґрунтується на зв'язуванні з білками одного з кислих барвників *Coomassie brilliant blue*, що випускається в двох модифікаціях: R-250 і G-250.

При зв'язуванні з протеїнами спектр поглинання барвника змінюється. Даний метод надзвичайно чутливий та дозволяє визначити вміст протеїну в діапазоні 1-10 мкг/мл.

Оскільки протеїни відрізняються за здатністю зв'язувати барвники, калібрувальний графік необхідно будувати з використанням того білка, концентрацію якого в подальшому припускають визначати.

4.1. Барвник *Coomassie brilliant blue G* масою 10 мг прогомогенізуйте в 5 мл 95 %-го етилового спирту. Отриманий розчин змішайте з 10 мл 95 %-ї фосфорної кислоти, доведіть водою до кінцевого об'єму 100 мл. Відфільтрований розчин барвника зберігайте при кімнатній температурі близько двох тижнів.

4.2. Візьміть дві пробірки: у першу (дослідну) внесіть 0,05 мл сироватки крові та 1,45 мл дистилату, в другу (контрольну) – 1,5 мл дистильованої води.

4.3. До вмісту обох пробірок додайте 1,5 мл барвника *Coomassie brilliant blue G*.

4.4. Побудова калібрувального графіка

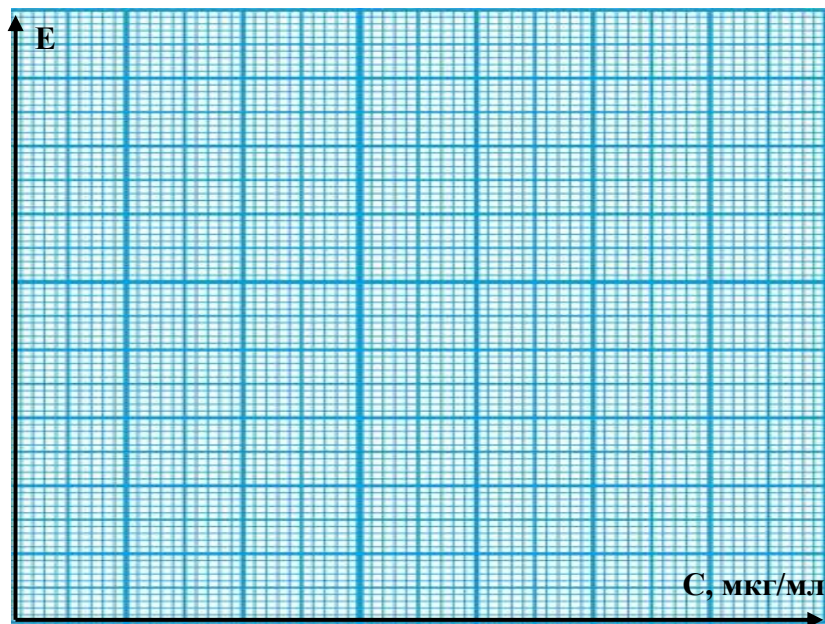
Для побудови калібрувального приготуйте 20 мл стандартного розчину протеїну, який містить 10 мкг білка у 1 мл розчину.

У серію пробірок відберіть по 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 мкг білка. Для отримання відповідних концентрацій у кожен пробірку внесіть необхідну кількість стандартного розчину (як зазначено в таблиці).

Об'єм кожної пробірки доведіть дистилатом до 1,5 мл. З кожною пробіркою проведіть реакцію, як описано вище.

Виміряйте інтенсивність забарвлення кожної проби через 5 хв на фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 595 нм.

Кількість стандартного розчину, мл	Кількість H ₂ O, мл	Концентрація білка, мкг/мл	Екстинкція, од. абсорбції
0,15	1,35	1	
0,30	1,2	2	
0,45	1,05	3	
0,6	0,9	4	
0,75	0,75	5	
0,9	0,6	6	
1,05	0,45	7	
1,2	0,3	8	
1,35	0,15	9	
1,5	–	10	



Оформлення роботи

Розрахуйте концентрацію протеїну в дослідних зразках з використанням різних методів. Порівняйте отримані результати.

Контрольні запитання

1. Наведіть порівняльну характеристику основних колориметричних методів кількісного визначення білка.
2. Що лежить в основі спектрофотометричного визначення кількісного вмісту білка в біологічному матеріалі?
3. Які підходи обрахунку кількості протеїну в біоматеріалі використовуються при спектрофотометричному визначенні?
4. Які амінокислоти білків володіють максимумом поглинання при 280 нм? Як дана властивість використовується у лабораторній практиці?
5. Поясніть принцип реакції, на якій ґрунтується кількісне визначення білка біуретовим методом.
6. Який принцип визначення білка методом Лоурі?
7. Чому метод Лоурі чутливіший порівняно з біуретовим?
8. Яке значення має кількісне визначення вмісту білка?
9. Чому сироватка крові, яку використовують для визначення вмісту білка, не повинна містити слідів гемолізу?
10. Охарактеризуйте принцип методу Бредфорда.
11. Який барвник для зв'язування протеїнів за методом Бредфорда?

ЯКІСНЕ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА В СЕЧІ

Сеча здорової людини майже не містить білка. Проте ціла низка патологічних станів супроводжується появою білка у сечі в кількості до 0,033 г/л. Поява білка у сечі називається **протеїнурією**. Розрізняють *ниркову* (справжню) і *позаниркову* (несправжню) протеїнурію. Ниркова протеїнурія виникає під час нефриту, гіпертонічної хвороби. Позаниркова виникає за умов запальних процесів у сечоводах, сечовому міхурі.

Фізіологічна протеїнурія спостерігається при споживанні великої кількості білків (*аліментарна*), стресових ситуаціях (*емоційна*), у вагітних, новонароджених (перші 4–6 днів).

Основними причинами протеїнурії вважаються: підвищена концентрація нормальних або патологічних білків у плазмі крові (протеїнурія Бенс-Джонса), збільшення секреції та зниження реабсорбції білків у ниркових канальцях тощо.

Кольорові реакції не придатні для виявлення білка в сечі, оскільки як за фізіологічних умов, так і при патологічних станах сеча містить речовини, які запобігають утворенню забарвлених продуктів реакцій.

Для виявлення білка в сечі зазвичай використовують три реакції його осадження: кип'ятінням, концентрованою нітратною кислотою (проба Хеллера) і сульфосаліциловою кислотою.

Кількісне визначення білка в сечі проводять лише після позитивних результатів якісних проб.

Матеріали дослідження та реактиви: 1 %-й розчин CH_3COOH , 10 %-й розчин CH_3COOH , концентрована HNO_3 , 3 %-й та 20 %-й розчини сульфосаліцилової кислоти, стандартний розчин альбуміну (5 мг/мл), ізотонічний розчин NaCl .

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, водяна баня, фотоелектроколориметр.

I. Якісні реакції виявлення білка в сечі

1. Осадження кип'ятінням

1.1. Попередньо перевірте реакцію сечі універсальним індикатором. Якщо сеча має кислу реакцію, то її (2–3 мл) зразу прокип'ятіть у пробірці, а якщо основну – прокип'ятіть після додавання по краплях 1 %-го розчину CH_3COOH до слабкокислої реакції за універсальним індикатором.

1.2. Спостерігайте за появою помутніння або осаду за умов наявності білка в сечі.

1.3. Додайте 5 крапель 10 %-го CH_3COOH і повторно прокип'ятіть.

1.4. Осад білка за цих умов не розчиняється, на відміну від осаду фосфатів і карбонатів кальцію та магнію, які також випадають в осад у слабкокислому середовищі, але розчиняються під час нагрівання у кислшому розчині CH_3COOH .

1.5. Результати спостережень занесіть у таблицю.

2. Проба Хеллера

2.1. У пробірку налийте 1 мл концентрованої HNO_3 і обережно піпеткою по стінці пробірки нашаруйте 1 мл сечі.

2.2. Спостерігайте через 2–4 хв на межі обох рідин появу аморфного шару (білкового кільця) у разі наявності в пробі білка.

2.3. За відсутності білка у сечі на межі рідин спостерігається поява кольорового кільця, зумовленого зміною пігментів сечі за дії HNO_3 .

3. Проба з сульфосаліциловою кислотою

3.1. До 1 мл сечі додайте 2 краплі свіжоприготованого 20 %-го розчину сульфосаліцилової кислоти.

3.2. Вміст пробірки ретельно перемішайте.

3.3. За наявності білка у сечі спостерігайте за появою білого осаду або помутніння.

Запишіть результати реакцій виявлення білка в сечі у вигляді таблиці:

Метод виявлення	Спостереження	Пояснення

II. Кількісне визначення білка в сечі

4. Метод кількісного визначення білка в сечі з сульфосаліциловою кислотою

4.1. У пробірку (дослід) внесіть 0,5 мл профільтрованої сечі.

4.2. Додайте 1,5 мл 3 %-го розчину сульфосаліцилової кислоти та ретельно перемішайте.

1.3. Через 5 хв виміряйте абсорбцію дослідної проби при довжині хвилі 590–650 нм (оранжевий чи червоний світлофільтр) навпроти контролю у кюветі товщиною робочого шару 5 мм.

1.4. Контрольну пробу приготуйте аналогічно, але замість розчину сульфосаліцилової кислоти використовуйте ізотонічний розчин NaCl.

1.5. Розрахунок вмісту білка проведіть за калібрувальним графіком, для побудови якого зі стандартного розчину альбуміну (5 мг/мл) приготуйте наступні розведення:

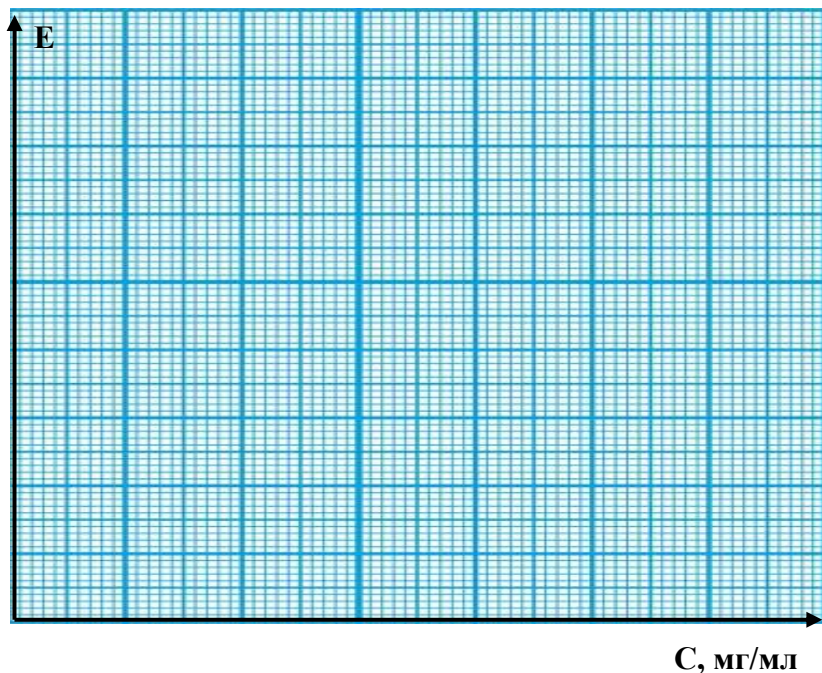
№ з/п	Альбумін	Ізотонічний розчин NaCl	Кінцева концентрація білка, мг/мл	Екстинкція, од.абсорбції
1	0,05	4,95	0,05	
2	0,1	4,9	0,1	
3	0,2	4,8	0,2	
4	0,4	4,6	0,4	

5	0,5	4,5	0,5	
6	0,8	4,2	0,8	
7	0,9	4,1	0,9	
8	1	4	1	

1.6. Із кожного одержаного калібрувального розчину в чисті пробірки відберіть 0,5 мл альбуміну та додайте 1,5 мл розчину сульфосаліцилової кислоти.

1.7. Виміряйте екстинкцію дослідних зразків і побудуйте калібрувальний графік залежності екстинкції від концентрації білка.

1.8. Лінійна залежність зберігається до 1 мг/мл. За більшої концентрації протеїну в сечі дослідну пробу необхідно розвести і провести повторне визначення, врахувавши кратність розведення сечі.



2. Метод Робертса-Стольнікова

Принцип методу ґрунтується на тому, що під час проведення проби з концентрованою нітратною кислотою біле кільце на межі з сечею з'являється між 2,5-ю і 3-ю хв за наявності 0,033 г/л протеїну.

Якщо кільце утворюється раніше, то білка в такій сечі більше 0,033 г/л, тому сечу розводять до того часу, поки кільце не буде утворюватись у зазначений термін (між 2,5- і 3-хвилинним інтервалом).

2.1. У 6 пробірок внесіть по 2 мл дистильованої води.

2.2. У першу пробірку додайте 2 мл сечі та перемішайте

2.3. Із першої пробірки 2 мл розведеної сечі перенесіть у другу пробірку, із другої пробірки 2 мл суміші перенесіть у третю пробірку і т.д. Із останньої (шостої) 2 мл суміші вилийте. Так отримаємо розведення сечі в 2, 4, 8, 16, 32, 64 рази.

2.4. В інші 6 пробірок внесіть по 1 мл концентрованої нітратної кислоти.

2.5. Піпеткою нашаруйте (додайте по стінках нахиленої пробірки, щоб не перемішувалась рідина) 1 мл розведеної сечі із першої пробірки в пробірку з нітратною кислотою.

2.6. Визначте час появи кільця. Аналогічно проведіть дослід з наступними пробірками з розведеною сечею. У тому розведенні, де кільце з'явиться між 2,5-ю і 3-ю хв, вміст білка становить 0,033 г/л.

2.7. Розрахунок кількості протеїну в сечі здійсніть шляхом множенням 0,033 г/л на кратність розведення сечі та виразіть кількістю грамів білка на 1 л сечі.

2.8. Наприклад, кільце з'явилося між 2,5-ю і 3-ю хв у пробірці з розведенням сечі у 8 разів.

Показник	№ пробірки					
	1	2	3	4	5	6
Розведення біологічної рідини	2	4	8	16	32	64
Результат	–	–	+	-	-	-

Отже,

$$0,033 \text{ г/л} \cdot 16 = 0,528 \text{ г/л протеїну в сечі.}$$

Оформлення роботи

Розрахуйте концентрацію білка в дослідному зразку різними методами. Проаналізуйте отримані результати та зробіть відповідні висновки.

Контрольні запитання

1. За допомогою яких методів можна виявити білок у сечі?
2. Охарактеризуйте за яких умов у людини може спостерігатися протеїнурія.
3. Чи можна за допомогою кольорових реакцій визначити кількість білка в сечі?
4. Чому для виявлення білка в сечі осадження кип'ятінням необхідно, щоб рН середовище біологічної рідини знаходилося в діапазоні менше 7?
5. Обґрунтуйте використання проби Хеллера для виявлення білка в сечі.
6. Чому кількісне визначення білка в сечі проводять лише після позитивних результатів якісних проб?
7. Охарактеризуйте метод кількісного визначення білка в сечі з сульфосаліциловою кислотою.
8. На чому ґрунтується принцип методу Робертса-Стольнікова?

Тема 2. Ензими – біологічні каталізатори

Лабораторна робота 8

ВИВЧЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЕНЗИМІВ

Ензиматична активність залежить від низки чинників:

- 1) концентрації ензиму та субстрату (швидкість ензиматичної реакції збільшується зі збільшенням кількості ензиму за високої концентрації субстрату);
- 2) температури (оптимальна температура для більшості ензимів – 38–40 °С);
- 3) рН середовища (для кожного ензиму існує оптимальне значення рН, при якому він проявляє максимальну активність);
- 4) наявності інгібіторів й активаторів (для ензимів характерна регуляція специфічними низькомолекулярними речовинами й іонами металів).

Матеріали дослідження та реактиви: розчин амілази, розчин сахарози, 1 %-й розчин крохмалю, розчин Фелінга, 1 %-й розчин сахарози, 10 %-й NaCl, 10 %-й CuSO₄, 1 %-й розчин KI (розчин Люголя), буферні розчини з рН 1,2; 6,8; 10,0, 0,1 н HCl, 1 %-й Pb(CH₃COO)₂.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, водяні бані з різною температурою.

1. Вплив температури на активність ензимів

З підвищенням температури на кожні 10 °С швидкість ензиматичної реакції закономірно зростає приблизно вдвічі. Ензими чутливі до впливу температури. Температура, за якої зберігаються нативні властивості ензимів протягом тривалого часу та проявляється максимальна активність, називається **оптимальною температурою** дії ензиму.

Кожний ензим має свій температурний оптимум, за якого його активність максимальна. Температурний оптимум дії

більшості ферментів тваринного походження становить 38–40 °С, а рослинного – 40–60 °С.

При нагріванні вище оптимальної температури активність ензимів знижується. Поступово руйнування ферменту призводить до того, що швидкість основного хімічного процесу, який каталізується ензимом, сповільнюється і, нарешті, припиняється.

За температури 75 °С більшість ензимів інактивується внаслідок денатурації апоферменту. При температурах нижче 0 °С дія ферментів уповільнюється.

Швидкість розщеплення крохмалю під дією амілази залежить від температури та визначається за інтенсивністю забарвлення розчину крохмалю або продуктів його перетворення з йодом.

Амілаза слини каталізує гідроліз α -глікозидних зв'язків крохмалю до проміжних продуктів – декстринів. У процесі гідролізу крохмалю збільшується кількість вільних глікозидних гідроксилів, що можна підтвердити реакціями Тромера або Фелінга.

Послідовно процес розщеплення крохмалю можна відтворити такою схемою: крохмаль \rightarrow амілодекстрини (фіолетово-синє забарвлення з йодом) \rightarrow еритродекстрини (буро-червоне забарвлення з йодом) \rightarrow ахродекстрини (буро-жовте забарвлення з йодом) \rightarrow мальтодекстрини (з йодом не дають забарвлення) \rightarrow мальтоза (з йодом не дає забарвлення).

1.1. У 4 пробірки налийте по 10 крапель 1 %-го розчину крохмалю.

1.2. Пробірки № 1 поставте у льодову баню (0 °С), № 2 – у штатив за кімнатної температури (20 °С), № 3 – у водяну баню за температури 38 °С, № 4 – у водяну баню за температури 75 °С і залишіть на п'ять хвилин.

1.3. Через 5 хв у пробірки з крохмалем додайте по 10 крапель розчину амілази (розведена слина) та залишіть за вищезазначених температур ще на 10 хв.

1.4. Після інкубації в усі пробірки додайте 1 краплю розчину йоду та перемішайте.

1.5. За зміною забарвлення розчину крохмалю з йодом судять про гідроліз у кожній пробірці. У пробірці 4, яка містилася на водяній бані за температури 75 °С, суміш забарвлюється в синій колір. Фермент у ній інактивований, і гідроліз крохмалю не відбувається.

1.6. В інших пробірках забарвлення залежить від ступеня гідролізу крохмалю: в пробірці 3 за оптимальної температури (38 °С) – жовте, оскільки гідроліз крохмалю відбувається повною мірою, в пробірках 1 і 2 колір розчинів може бути фіолетово-синім або буро-червоним, що свідчить про частковий гідроліз крохмалю до аміло- чи еритродекстринів.

Результати зафіксуйте в таблиці:

№ проб	Температура, °С	Забарвлення розчину
1	0	
2	20	
3	38	
4	75	

2. Вплив рН на активність ензимів

Вплив рН на активність ферментів пояснюється тим, що білкова молекула ензиму – це амфотерний поліелектроліт, тому концентрація водневих іонів діє на активний центр ензимів, ступінь його іонізації, а також ступінь іонізації субстрату та ензимосубстратного комплексу. Це своєю чергою впливає на структуру, стан ензиму та швидкість реакції. Для кожного ензиму існує оптимальне значення рН, яке відповідає найменшій рухливості ензиму в електричному полі. Незначні відхилення рН від оптимального значення сповільнюють або гальмують дію ензиму.

Оптимум рН для дії амілази можна визначити за допомогою крохмалю за різних значень рН середовища. Ступінь гідролізу

крохмалю оцінюють за реакцією даного полісахариду з розчином йоду. При оптимальному значенні рН гідроліз крохмалю відбувається повністю (забарвлення з йодом немає). Із віддаленням від точки оптимального рН в кислу чи лужну сторону гідроліз крохмалю відбувається лише частково до стадії декстринів (червоно-буре або фіолетове забарвлення) або крохмаль взагалі не буде гідролізуватися (синє забарвлення). Оптимум рН для дії амілази дорівнює 6,8.

Оптимальні значення рН для деяких ферментів: пепсин – 1,5–2,5; амілаза слини – 6,8; трипсин – 7,5–8,5; панкреатична ліпаза – 7,0–8,5; аргіназа – 9,5–10,0; уреаза – 7,0–7,2; амілаза солоду – 4,9–5,2; ліпаза (насіння рицини) – 4,7–5,0; мальтаза (дріжджі) – 6,7–7,2; сахараза (дріжджі) – 4,6–5,0.

2.1. У 3 пробірки налейте по 2 мл буферного розчину з рН 1,2; 6,8; 10,0.

2.2. У кожену пробірку додайте по 1 мл розчину амілази і по 1 мл 1 %-го розчину крохмалю. Перемішайте й інкубуйте за 38 °С протягом 10 хв.

2.3. Після інкубації до вмісту 2 і 3 пробірок додайте відповідно 1 і 2 мл 0,1 н розчину НСІ (реакція на крохмаль позитивна лише в кислому середовищі) та проведіть пробу Люголя.

2.4. До кожного досліджуваного розчину додайте 2–3 краплі розчину йоду в йодиді калію.

2.5. Порівняйте інтенсивність гідролізу крохмалю залежно від рН і зробіть висновки.

№ проб	рН	Забарвлення розчину
1	1,2	
2	6,8	
3	10,0	

3. Специфічність дії ензимів

Специфічність дії ензимів зумовлена відповідністю конфігурації активного центру ензиму до конформації

субстрату, на який він діє. Ензими специфічні щодо типу реакцій, які вони каталізують, так і субстратів, на які діють.

Амілаза – ензим, який каталізує реакцію гідролізу полісахаридів. Розрізняють: *α-амілазу* (КФ 3.2.1.1) слини, підшлункової залози та слизової кишкової, яка каталізує ендогідроліз 1,4- α -глікозидних зв'язків у полісахаридах, *β-амілазу* (КФ 3.2.1.2) – відщеплює залишки β -мальтози від нередукуючого кінця ланцюга полісахаридів (за дії β -амілази з амілози утворюється мальтоза, а з амілопектину – «залишковий декстрин», міститься β -амілаза в солоді), *γ-амілазу* (КФ 3.2.1.3) – каталізує послідовне відщеплення залишків глюкози від нередукуючих кінців ланцюгів полісахаридів (міститься у плісневих грибах).

Амілаза слини прискорює гідроліз тільки полісахаридів, не діючи на дисахариди. Мальтаза слини прискорює гідроліз дисахариду мальтози, який утворюється при гідролізі крохмалю, але не проявляє жодної дії на інший дисахарид – сахарозу.

Фермент сахарази (КФ 3.2.1.48) гідролізує сахарозу. Сахароза не містить вільної альдегідної групи, тому не дає реакції з реактивом Фелінга. Реакція може бути позитивною тільки в тому разі, якщо сахароза гідролізується до двох моносахаридів – глюкози та фруктози.

3.1. Приготуйте 4 пробірки: № 1, № 2, № 3, № 4. У перші дві налийте по 10 крапель розчину крохмалю, а у дві інші – по 10 крапель розчину сахарози.

3.2. У пробірку № 1 додайте 5 крапель препарату амілази, а в № 2 – 5 крапель препарату сахарози (витяжки з дріжджів). Обидві пробірки поставте у водяну баню за 38 °С на 10 хв.

3.3. У пробірку № 3 додайте 5 крапель препарату сахарози (витяжка з дріжджів), а № 4 – 5 крапель препарату амілази. Обидві пробірки поставте на водяну баню за 38 °С на 10 хв.

3.4. Через зазначений час у пробірки № 1 і № 2 додайте по 2 краплі розчину йоду та відмітьте забарвлення, а з вмістом пробірок № 3 і № 4 проробіть реакцію Фелінга.

3.5. Для цього до вмісту пробірок № 3, № 4 додайте 5 крапель розчину Фелінга і підігрійте на киплячій бані 5–7 хв.

3.6. Результати дослідження занесіть до таблиці.

№	Фермент	Субстрат	Реакція з йодом	Реакція Фелінга
1.	Амілаза	Крохмаль		
2.	Сахараза	Крохмаль		
3.	Сахараза	Сахароза		
4.	Амілаза	Сахароза		

У пробірці з амілазою синє забарвлення розчину зникає внаслідок розщеплення крохмалю амілазою. У другій пробірці розчин має синій колір, тому що сахараза не діє на крохмаль. Сахароза відновних властивостей не має, тому в пробірці, де під впливом сахарази сахароза розщепилася на глюкозу та фруктозу, спостерігається червоне забарвлення внаслідок утворення геміоксиду міді.

4. Вплив активаторів та інгібіторів на активність ензимів

Речовини, які підвищують активність ензимів, називають *активаторами*; речовини, які знижують активність ензиму, називають *інгібіторами*. Наприклад: для амілази слини активатором слугує NaCl, для ліпази – жовчеві кислоти. Інгібіторами можуть бути продукти біохімічних реакцій, різні денатуруючі агенти (концентровані кислоти, луги, спирти).

Механізм дії активаторів та інгібіторів не завжди зрозумілий. У деяких випадках за відсутності активатора дія ензиму абсолютно не проявляється. Наприклад, амілаза після діалізу повністю втрачає здатність гідролізувати крохмаль і знову набуває її після додавання NaCl. Активаторами та інгібіторами часто користуються в біохімічних дослідженнях для вивчення механізму дії окремих ензимів, наявних у тканинах. Через додавання різних токсинів вдається блокувати активні центри одних ензимів, не впливаючи при цьому на активність інших.

4.1. У три пробірки налейте по 3 мл препарату амілази.

4.2. У пробірку № 1 додайте 2 краплі 10 %-го розчину NaCl, у пробірку № 2 – 2 краплі 10 %-го розчину CuSO₄, у пробірку № 3 – 2 краплі дистилляту.

4.3. До кожної пробірки додайте по 5 крапель 1 %-го розчину крохмалю та поставте на водяну баню при 38 °С на 10 хв.

4.4. Після зазначеного часу до вмісту кожної пробірки додайте по 2 краплі розчину йоду. Спостерігайте за зміною забарвлення.

4.5. Результати занесіть до таблиці.

№	Субстрат	Фермент	Доданий реагент	Реакція з йодом (колір)
1.	Крохмаль	Амілаза	NaCl	
2.	Крохмаль	Амілаза	CuSO ₄	
3.	Крохмаль	Амілаза	H ₂ O	

Рідина в першій пробірці забарвлюється в червоний або жовтий колір, у другій – синій, у третій – фіолетовий або червоний. Одержані результати свідчать, що активатором амілази є NaCl (перша пробірка), а інгібітором – CuSO₄ (друга пробірка).

5. Білки як протиотрута для іонів важких металів

Взаємодія іонів металів з білками – це основа використання молока як протиотрути при отруєнні важкими металами. Солі важких металів адсорбуються на поверхні білкових молекул молока та утворюють з ними міцні солеподібні комплексні сполуки, які випадають у осад, тим самим запобігаючи пошкодженню білків організму.

5.1. У дві пробірки налейте по 1 мл розчину амілази, 1 %-го розчину крохмалю, 1 %-го $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

5.2. У пробірку № 1 додайте 1 мл молока (дослід), у пробірку № 2 – 1 мл води (контроль). Пробірки стряхніть і витримати 10 хв за температури 38 °С.

5.3. Після інкубації в обидві пробірки додайте по 1 краплі 1 %-го розчину йоду. В обох пробірках є іони Pb^{2+} , які інактивують амілазу. Проте за наявності молока активність амілази зберігається, про що свідчить відсутність синього забарвлення при додаванні йоду.

Примітка: Приготування розчину амілази. Сполоснути ротову порожнину дистилатом для очищення від залишків їжі. Набрати нову порцію води і споліскувати ротову порожнину протягом 2 хв. Зібрану в склянку рідину можна використовувати для аналізу.

Контрольні запитання

1. До якого класу ензимів належить α -амілаза слини?
2. Які хімічні зв'язки в молекулі крохмалю розщеплює α -амілаза слини?
3. Які види амілаз Вам відомі?
4. За допомогою якої якісної реакції виявляють наявність крохмалю у реакційній суміші?
5. Що таке декстрини? Яку кольорову реакцію вони дають з йодом?
6. Які чинники впливають на швидкість ферментативної реакції?
7. Як зміна температури впливає на активність амілази?
8. Які значення температурного оптимуму для амілази слини?
9. Чим пояснюється чутливість ферментів до рН середовища?
10. Як зміна рН середовища впливає на активність α -амілази слини?
11. Які межі значень рН для активності більшості ензимів? Чому?
12. За якого значення рН активність ферментів мінімальна?

13. Наведіть приклади ензимів із абсолютною та відносною специфічністю.
14. Який вид специфічності характерний для амілази і сахарози? Чому?
15. Як виявляють дію сахарози?
16. Які аніони активатори чи інгібітори амілази слини?
17. Як активатори впливають на активність ферментів?
18. Чому під впливом інгібіторів активність ферментів знижується?

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ α -АМІЛАЗИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ МЕТОДОМ ВОЛЬГЕМУТА

Ферменти наявні в тканинах та біологічних рідинах у дуже низьких концентраціях, які визначити майже неможливо. Тому кількість ферменту визначається за швидкістю реакцій, які вони каталізують. За оптимальних значень температури і рН середовища та повному насиченні ферменту субстратом (реакція нульового порядку) швидкість реакції прямо пропорційна до концентрації ферменту і називається **активністю ферменту**. *Швидкість (активність) ферментативної реакції* визначають за зміною концентрації субстрату або за утворенням продуктів реакції.

За *одиницю активності* (Е) ферменту беруть таку його кількість, яка каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату за 1 хв за оптимальних умов.

Катал (кат) – це активність ферменту, за якої реакція відбувається зі швидкістю 1 моль/с. 1 катал характеризує досить високу ферментативну активність, яка майже не трапляється у звичайних умовах. Тому активність ферментів виражають у частках каталу: мілікаторах (1мкат = 10^{-3} кат), мікрокаторах (1 мкат = 10^{-6} кат), нанокаторах (1нкат = 10^{-9} кат). Одна міжнародна одиниця активності (Е) = 16,67 нкат.

Для вираження активності ферментів у практичній роботі часто користуються поняттями питомої та молярної активності. *Питому активність* ферментів виражають числом міжнародних одиниць ферментативної активності на 1 мг білка (або числом каталів на 1 кг білка). Питома активність перебуває у прямій залежності від ступеня чистоти ферменту.

Кількість молекул субстрату, яка перетворюється однією молекулою ферменту за 1 хв, називають числом оборотів, або *молярною активністю* і виражають у каторах на 1г-моль ферменту.

Коли відомо кількість активних центрів у молекулі ферменту, то вводиться поняття *активності каталітичного центру*. Вона

характеризується кількістю молекул субстрату, які перетворюються за 1 хв при розрахунку на 1 каталітичний центр.

Кількісне визначення активності амілази в біологічних рідинах методом Вольгемута ґрунтується на визначенні мінімальної кількості ферменту, який повністю гідролізує 1 мл 0,1 %-го розчину крохмалю. Амілазна активність біологічних рідин визначається за кількістю 0,1 % розчину крохмалю (мл), яку може гідролізувати 1 мл біологічної рідини (слини, крові, сечі) за температури 38 °С протягом 30 хв.

Метод Вольгемута широко застосовується в клінічній практиці для визначення амілазної активності в біологічних рідинах. В організмі людини основні джерела α -амілази – це підшлункова залоза та слинні залози (амілаза Р і амілаза S). Амілаза Р утворюється тільки в підшлунковій залозі, амілаза S – переважно в слинних залозах.

У нормі амілазна активність слини становить 160–320 одиниць, активність амілази в сечі коливається від 16 до 64 одиниць, у крові – 28–100 одиниць.

Різке підвищення амілазної активності крові (в 10–30 разів) спостерігається при гострих панкреатитах, пухлинах підшлункової залози.

Високий рівень амілазної активності в сечі зазначається при нирковій недостатності внаслідок зниження гломерулярної фільтрації.

Зниження активності амілази в крові та сечі виникає при гепатитах, дистрофії печінки, цукровому діабеті, гіпотиреозі, токсичній диспепсії.

Підвищення активності амілази слинних залоз спостерігають при стоматиті, невралгії лицевого нерва. Під час епідемічного паротиту, який характеризується пошкодженням клітин привушної слинної залози також з'являється посилений вихід амілази в кров. Зниження активності амілази відбувається при анацидних порушеннях.

Матеріали дослідження та реактиви: розчин амілази, сироватка крові, сеча, 0,1 %-й розчин крохмалю, 0,85 %-й

розчин натрію хлориду, 0,1 %-й йод в 0,2 %-му розчині йодиду калію.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, крапельниці, термостат.

1.1. У 10 пробірок налейте по 1 мл 0,85 %-го розчину натрію хлориду.

1.2. У першу пробірку налейте 1 мл досліджуваної біологічної рідини (слини, сироватки крові, сечі) та ретельно перемішайте.

1.3. 1 мл отриманої суміші перенесіть у 2 пробірку, з другої пробірки 1 мл суміші перенесіть у 3 пробірку, з третьої – в 4 і т.д. З десятої пробірки 1 мл суміші вилийте. Так у кожній наступній пробірці вміст ферменту вдвічі менший, ніж у попередній.

1.5. У кожен пробірку додайте 2 мл 0,1 %-го розчину крохмалю, перемішайте і залиште на водяній бані за температури 38 °С.

1.6. Після закінчення часу інкубації пробірки охолодіть і додайте в кожен по 2 краплі 0,1 %-го розчину йоду в 0,2 %-му розчині калію йодиду.

1.7. Вміст пробірок перемішайте і виберіть для розрахунку розведення пробірки з розчином жовтого кольору після проведення йодної проби (де відбулося повне розщеплення крохмалю).

Показник	№ пробірки									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Розведення біологічної рідини	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Забарвлення йодної проби										

Приклад розрахунку: якщо остання пробірка, в якій з'явилося жовте забарвлення, – третя, то розведення слини,

сироватки крові чи сечі в ній дорівнює 1:8. Тобто 1 мл нерозведеної біологічної рідини може розщепити у 8 разів більшу кількість крохмалю, тобто

$$A = 2 \times 8 / 1 = 16, \text{ де}$$

2 – кількість 0,1 %-го розчину крохмалю в мл, яка використовується в досліді,

1 – кількість біологічної рідини в мл, яка використовується для проведення аналізу.

Контрольні запитання

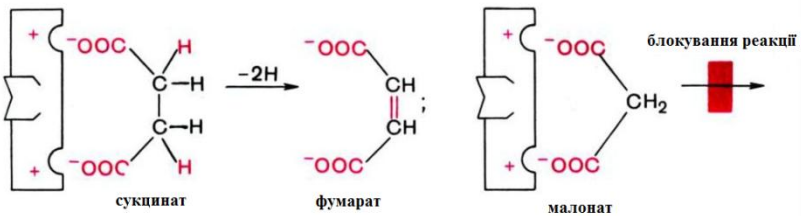
1. Як виявити наявність ферментів у біологічному матеріалі?
2. Чому для порівняння ензиматичної активності різних препаратів потрібно проводити реакцію в однакових умовах?
3. За якими біохімічними параметрами визначають швидкість ензиматичної реакції?
4. Чи можна виявити кількість ферменту в тканинах та біологічних рідинах організму?
5. Що називають активністю ферменту? Охарактеризуйте одиниці ензиматичної активності.
6. Яке клінічне значення має визначення активності ферментів у біологічних рідинах?
7. Охарактеризуйте принцип визначення амілазної активності в сироватці крові, сечі та слині методом Вольгемута.
8. Назвіть основні джерела α -амілази в організмі людини.
9. Чи відрізняються норми амілазної активності в біологічних рідинах за методом Вольгемута?
10. До якого класу ферментів належить α -амілаза? Яка її біологічна роль?
11. Який вид специфічності характерний для α -амілази? Чому?
12. Поясніть механізм дії альфа-амілази.

КОНКУРЕНТНЕ ІНГІБУВАННЯ МАЛОНОВОЮ КИСЛОТОЮ СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ М'ЯЗІВ

У ензимології важлива роль належить інгібіторам, які знижують активність ферментів. **Конкурентний інгібітор** – це сполука, що володіє структурною подібністю з субстратом. Тому такий інгібітор може взаємодіяти з активним центром ензиму, конкуруючи з істинним субстратом.

За даного типу інгібування збільшується K_m . Швидкість реакції знижується, оскільки комплекс ензим-інгібітор є неактивним (не розпадається з утворенням продуктів). Однак максимальна швидкість реакції (V_{max}) не змінюється.

Прикладом конкурентного інгібування є інгібування сукцинатдегідрогенази малонною кислотою.



Сукцинатдегідрогеназа (КФ 1.3.99.1) – це складний FAD-залежний фермент, який належить до оксидоредуктаз. Як окислюваний субстрат використовують бурштинову кислоту, а як акцептор водню – барвник метиленовий синій, який у разі відновлення перетворюється на безбарвну лейкоформу.

Принцип методу ґрунтується на тому, що в присутності малонату в м'язах знижується активність сукцинатдегідрогенази.

Матеріали дослідження та реактиви: гомогенат м'язів, 0,25 М розчин сахарози, 1 %-й розчин малонної кислоти, 1 %-й розчин сукцинату, 1 %-й метиленовий синій, вазелін.

Посуд і обладнання: пробірки, піпетки, штативи, термостат.

1.1. У три пробірки внесіть по 2 мл гомогенату м'язів, приготованого на 0,25 М розчині сахарози.

1.2. У першу пробірку додайте 0,4 мл води, в другу – 0,2 мл 1 %-го розчину малонової кислоти та 0,2 мл води, в третю – 0,4 мл 1 %-го розчину малонової кислоти.

1.3. В усі три пробірки додайте по 1 мл 1 %-го розчину сукцинату, по 2-3 краплі 1 %-го розчину метиленового синього і після перемішування – по 3-4 краплі вазеліну.

1.4. Пробірки помістіть у термостат при температурі 38 °С на 5–10 хвилин.

1.5. Після інкубації спостерігайте за зміною забарвлення у пробірках.

1.6. Результати спостережень занесіть у таблицю та зробіть висновки.

Вміст пробірок	Пробірки		
	1	2	3
Гомогенат м'язів	+	+	+
Дистилят	+	+	–
Малонова кислота	–	+	+
Бурштинова кислота	+	+	+
Метиленова синь	+	+	+
Зміна забарвлення			
Висновки			

Контрольні запитання

1. Що таке конкурентний інгібітор?
2. Які зміни константи Міхаеліса відбуваються за умов конкурентного інгібування?
3. Охарактеризуйте принцип методу інгібування сукцинатдегідрогенази м'язів малоновою кислотою.

Тема 3. Вітаміни

Лабораторна робота 11

ЯКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНІВ

Якісні реакції на вітаміни допомагають виявити їх у лікарських препаратах, після екстракції у продуктах харчування і лікарських рослинах. Принцип, покладений в основу якісних реакцій на вітаміни, використовується при розробці кількісного визначення їх у різних природних об'єктах і ліках.

Матеріали дослідження та реактиви: розчини вітамінів В₁ (тіаміну), В₂ (рибофлавіну), В₆ (піридоксину), Р (рутину), РР (нікотинаміду, нікотинової кислоти), В₁₂ (ціанкобаламіну), Е (токоферолу), витяжка лимону, риб'ячий жир, 0,05 %-й розчин вікасолу, 5 %-й розчин К₃Fe(CN)₆, 10 %-й та 30 %-й розчин NaOH, ізобутиловий спирт, 10 %-на СН₃COOH, 5 %-й оцтовокислий купрум, концентрована HCl, H₂SO₄, HNO₃, металічний цинк, 1 %-й та 5 %-й та 10 %-й FeCl₃, 0,1 %-й J₂, хлороформ, 0,025 %-й цистеїн, 1 %-й ацетоновий розчин α-нітрузо-β-нафтолу, 10 %-й розчин калію гідрофосфату, гідрогену пероксид, 10 %-й розчин тіосечовини, розчин бром у хлороформі (1:60), аніліновий реактив.

Посуд і обладнання: пробірки, конічні колби, штативи.

I. Якісні реакції на водорозчинні вітаміни

1. Реакція окислення вітаміну В₁ (тіаміну) в тіохром

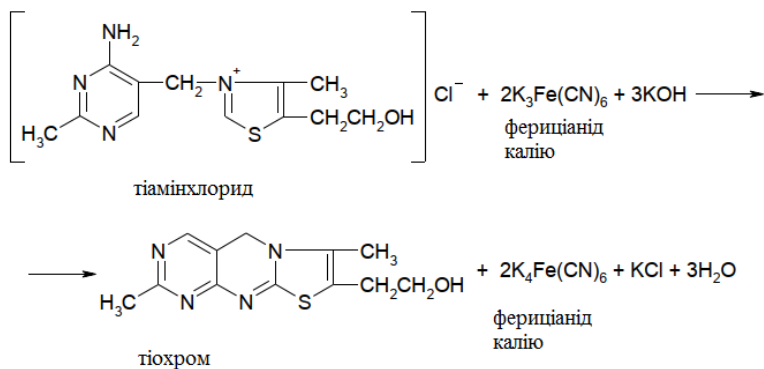
Вітамін В₁ (тіамін, антинеуритний) містить два кільця – піримідинове і тiazолове, з'єднані метиленовим зв'язком. Обидва кільця синтезуються окремо у вигляді фосфорильованих форм, які потім об'єднуються через четвертинний атом нітрогену.

Тіамін добре розчинний у воді. Водні розчини тіаміну в кислому середовищі витримують нагрівання до високих температур без зниження біологічної активності, а в

нейтральному та лужному середовищах вітамін В₁, навпаки, швидко руйнується під час нагрівання. Цим пояснюється руйнування тіаміну під час кулінарної обробки їжі, наприклад випіканні тіста з додаванням натрію гідрокарбонату або амонію карбонату.

Добова потреба вітаміну В₁ – 1,2–2,2 мг.

Принцип якісної реакції на тіамін полягає у здатності вітаміну В₁ у лужному середовищі за наявності К₃Fe(CN)₆ перетворюватися на тіохром – жовтий пігмент, здатний до синьо-фіолетової флуоресценції в ізобутиловому спирті. Ця реакція дуже чутлива, специфічна та використовується для кількісного визначення тіаміну.



1.1. До 1 мл розчину вітаміну В₁ (5 мкг) додайте 2 мл 5 %-го розчину К₃Fe(CN)₆ і 1 мл 30 %-го розчину NaOH, добре перемішайте й проекстрагуйте ізобутиловим спиртом. Пробірку нагрійте.

1.2. Спостерігайте в ультрафіолеті інтенсивну синю флуорисценцію ізобутилового екстракту тіохрому.

2. Реакція відновлення вітаміну В₂ (рибофлавіну)

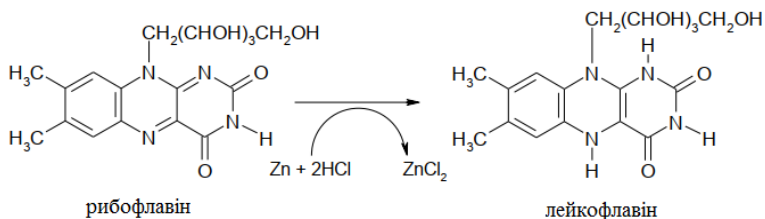
Вітамін В₂ (рибофлавін) в основі хімічної будови містить гетероциклічну сполуку ізоалоксазин (поєднання бензольного, піразинового та піримідинового кілець), до якої в положенні 9 приєднаний п'ятиатомний спирт рибітол.

Рибофлавін добре розчинний у воді, стійкий у кислих розчинах, але легко руйнується в нейтральних і лужних середовищах. Вітамін В₂ чутливий до видимого і УФ-опромінення та відносно легко підлягає зворотному відновленню, приєднуючи водень за місцем подвійних зв'язків і перетворюючись на безбарвну лейкоформу. Ця здатність рибофлавіну легко окислюватися та відновлюватися є основою його біологічної дії.

Похідні рибофлавіну – FAD і FMN – простетичні групи окисно-відновних ферментів, відомі як флавінові коферменти.

Добова потреба рибофлавіну – 1,7 мг.

Принцип якісної реакції на вітамін В₂ зумовлений здатністю рибофлавіну до відновлення зі зміною забарвлення розчину від жовтого (рибофлавін) до червоного (родофлавін) і в подальшому – безбарвного (лейкофлавін).



2.1. Налийте в пробірку 1 мл 0,025 %-го розчину рибофлавіну й додайте 0,5 мл концентрованої НСІ, а також невеликий шматочок металічного цинку.

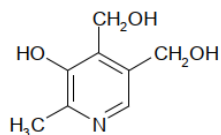
2.2. Спостерігайте за зміною забарвлення розчину з жовтого до червоного, рожевого, а потім безбарвного за рахунок водню, що виділяється з рибофлавіну.

3. Феррихлоридна проба на вітамін В₆ (піридоксин)

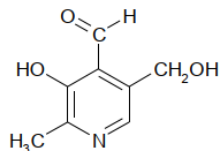
Вітамін В₆ (піридоксин, антидерматитний) – похідне 3-оксипіридину, зокрема 2-метилокси-4,5-діоксиметилпіридину. Вітамін В₆ має три вітамери: піридоксин (піридоксол), піридоксаль і піридоксамін.

Похідні 3-оксипіридину відрізняються природою групи в положенні 4 піридинового ядра. Вітамін В₆ добре розчинний у

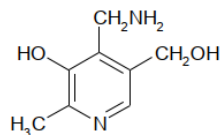
воді й етанолі. Водні розчини досить стійкі до кислот і лугів, однак вони чутливі до впливу світла в нейтральній зоні рН.



піридоксол



піридоксаль



піридоксамін

Добова потреба вітаміну В₆ – 2 мг.

При додаванні до розчину піридоксину розчину феруму хлориду рідина забарвлюється в червоний колір внаслідок утворення комплексної сполуки типу ферум феноляту. Реакція зумовлена наявністю у молекулі вітаміну фенольного гідроксилу у 3-му положенні піридинового кільця.

3.1. До 5 крапель 5 %-го водного розчину піридоксину додати 1 краплю 5 %-го розчину феруму хлориду й стягти.

3.2. Спостерігати забарвлення рідини в червоний колір.

4. Реакція на вітамін Р (рутин) із ферум хлоридом

Термін «вітамін Р» (рутин, цитрин, вітамін проникності) об'єднує групу речовин із подібною біологічною активністю: катехіни, халкони, дигідрохалкони, флавіни, флавонони, ізофлавонони тощо. В основі їх структури – дифенілпропановий вуглеводний скелет хромону або флавону.

При додаванні феруму хлориду до насиченого водного розчину рутину рідина забарвлюється в зелений колір. Реакція зумовлена утворенням комплексної сполуки рутину з феруму хлоридом.

4.1. До 10 крапель насиченого водного розчину рутину додайте 2–3 краплі 1 % розчину феруму хлориду.

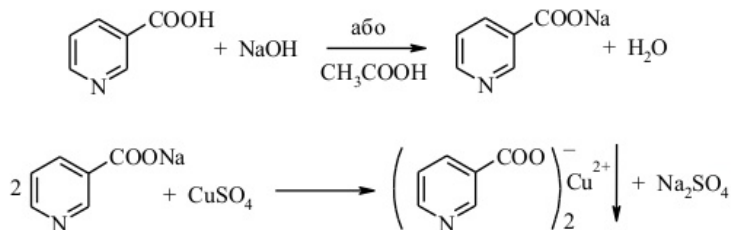
4.2. Спостерігайте появу зеленого забарвлення.

5. Проба з міддю на нікотинову кислоту

В організмі людини вітамін В₃ перебуває в основному у зв'язаному з білками стані. Нікотинамід входить до складу

коферментів NAD- і NADP-дегідрогеназ, задіяних в окисно-відновних реакціях.

Нікотинова кислота при нагріванні з розчином оцтовокислого купруму (II) утворює синій осад погано розчинної мідної солі (нікотинат купруму).



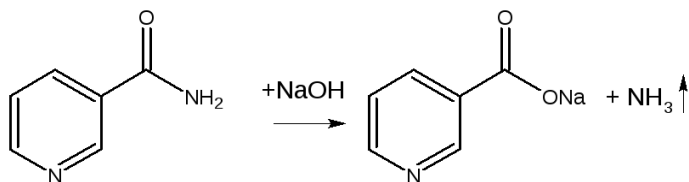
5.1. Розчиніть 10 мг нікотинової кислоти в 20 краплях 10 %-го ацетату під час нагрівання.

5.2. До нагрітого до кипіння розчину додайте рівний об'єм 5 %-го розчину оцтовокислого купруму (II).

5.3. При поступовому охолодженні спостерігайте за появою синього осаду мідної солі нікотинової кислоти.

6. Відмінність між нікотиновою кислотою і нікотинамідом

Принцип реакції ґрунтується на тому, що під час нагрівання нікотинаміду з лугом виділяється аміак, який змінює колір лакмусового папірця.



6.1. У першу пробірку внесіть невелику кількість кристалічної нікотинової кислоти, у другу – нікотинаміду.

6.2. У кожен пробірку додайте по 2 мл води та 1 мл 10 %-го розчину NaOH, перемішайте і нагрійте до кипіння.

6.3. До отвору пробірок приставте змочений водою лакмусовий папірець. Спостерігайте за зміною його кольору. Поясніть результати досліду та зробіть висновки.

7. Виявлення кобальту у складі вітаміну B₁₂

Принцип методу ґрунтується на тому, що при нагріванні вітаміну B₁₂ з калію гідросульфідом або при дії сильного окисника відбувається його руйнування. Кобальт, який вивільняється за цих умов, можна виявити за допомогою α -нітрузо- β -нафтолу, з яким він утворює комплексну сполуку оранжево-червоного кольору. При високій концентрації цієї солі вона може утворювати осад яскраво-червоного кольору.

Варіант 1.

7.1. Половину вмісту ампули з розчином вітаміну B₁₂ внесіть у фарфоровий тигель, випаруйте до утворення сухого залишку і прожарте.

7.2. Після охолодження додайте 1 мл концентрованої нітратної кислоти, 3 мл концентрованої хлоридної кислоти та прокип'ятіть до повного випаровування рідини.

7.3. Після охолодження залишок розчиніть у 2 краплях води, додайте 1 краплю 1 %-го ацетонового розчину α -нітрузо- β -нафтолу і по краплях 10 %-й розчин калію гідрофосфату до слабколужної реакції (за лакмусом).

7.4. За наявності кобальт-(3⁺)-іонів з'являється червоно-буре забарвлення, якщо їх немає – забарвлення жовто-зелене.

Варіант 2

7.1. Вміст ампули з розчином вітаміну B₁₂ внесіть у фарфоровий тигель, додайте 10 крапель концентрованої сульфатної кислоти та поставте на піщану баню на 10 хв.

7.2. Потім додайте 2 краплі гідрогену пероксиду – рідина знебарвлюється.

7.3. Після знебарвлення рідини в тигель додайте 1 мл води.

7.4. Після цього на смужку фільтрувального паперу нанесіть краплю 10 %-го розчину тіосечовини, підсушіть і на те ж саме місце нанесіть 2 краплі одержаного мінералізату.

7.5. Спостерігайте за появою забарвлення. Поясніть результати досліду та запишіть висновок.

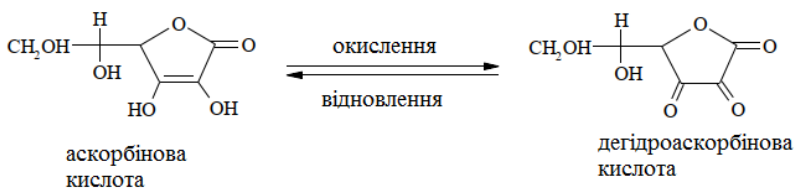
8. Відновлення аскорбіновою кислотою (вітамін С) молекулярного йоду

Аскорбінова кислота – лактон ненасиченої гексонової кислоти. Наявність у її молекулі подвійного зв'язку $C_2=C_3$ робить рухливими протони гідроксильних груп біля цих атомів, що зумовлює кислий характер сполуки.

Під час окислення аскорбінова кислота переходить у дегідроаскорбінову.

У чистому вигляді аскорбінова кислота має вигляд безбарвних кристалів без запаху, кислих на смак, добре розчинних у воді та спирті, нерозчинних в органічних розчинниках.

При додаванні витяжки з шипшини, яка містить аскорбінову кислоту, до розчину йоду в калію йодиді розчин знебарвлюється. Реакція зумовлена окисленням аскорбінової кислоти до дегідроаскорбінової та відновленням молекулярного йоду з утворенням I_2 .



8.1. У 2 пробірки налейте по 10 крапель дистилляту і по 1–2 краплі 0,1 %-го розчину I_2 .

8.2. У першу пробірку додайте 10 крапель дистилляту, у другу – 10 крапель витяжки лимона.

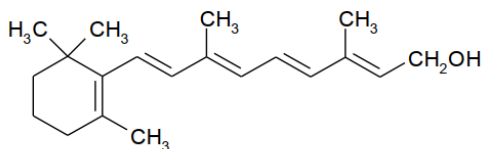
8.3. Спостерігайте за знебарвленням розчину йоду в пробірці з витяжкою лимона.

Досліджувана сполука	Реактиви	Спостереження	Пояснення
Вітамін В ₁			
Вітамін В ₂			
Вітамін В ₆			
Вітамін Р			
Нікотинова кислота			
Нікотинамід			
Вітамін В ₁₂			
Вітамін С			

II. Якісні реакції на жиророзчинні вітаміни

1. Реакція на ретинол (вітамін А) з концентрованою сульфатною кислотою (проба Друмонда)

Вітамін А (ретинол, антиксерофтальмічний вітамін) за хімічною будовою являє собою циклічний одноатомний спирт, який складається з шестичленного кільця (β -іонон), двох залишків ізопрену та первинної спиртової групи.



Відомі три вітаміни групи А: А₁, А₂ і *цис*-форма вітаміну А₁, названа неовітаміном А. Вітамін А₂ відрізняється від вітаміну А₁ наявністю додаткового подвійного зв'язку в кільці β-іону. Вітаміни групи А добре розчинні в жирах і жиророзчинниках: бензолі, хлороформі, ефірі, ацетоні та ін. В організмі вони легко окислюються за участю специфічних ферментів з утворенням відповідних *цис*- і *транс*-альдегідів, які отримали назву ретиненів (ретинолів).

Вітамін А може перебувати у вигляді провітамінів – каротинів. Відомі 3 типи каротинів: α-, β-, γ-каротини, які відрізняються один від одного хімічною будовою та біологічною активністю. Найбільшу біологічну активність має β-каротин, оскільки містить два β-іононові кільця та при розпаді в організмі з нього утворюються дві молекули вітаміну А. При розпаді α- і γ-каротинів утворюється тільки по одній молекулі вітаміну А, оскільки ці провітаміни містять по одному β-іононовому кільцю.

Добова потреба вітаміну А складає 2,7 мг вітаміну А або 5 мг β-каротину.

Хлороформний розчин риб'ячого жиру, який містить ретинол, при додаванні концентрованої сульфатної кислоти набуває червоного забарвлення, яке переходить у червоно-буре. Сульфатна кислота, яка має водовідбірні властивості, сприяє перетворенню вітаміну А на комплексну сполуку. Реакція Друмонда не має специфічності.

1.1. У суху пробірку внесіть 1 краплю риб'ячого жиру й 5 крапель хлороформу, перемішайте та додайте 1 краплю концентрованої сульфатної кислоти.

1.2. Спостерігайте за забарвленням рідини в буро-червоний колір.

2. Реакція на вітамін А з ферум сульфатом

Принцип реакції ґрунтується на тому, що вітамін А з феруму (ІІІ) сульфатом у кислому середовищі утворює комплексну сполуку рожево-червоного кольору (каротини дають зеленувате забарвлення).

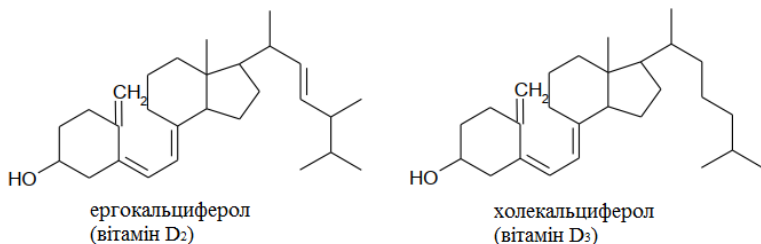
2.1. На сухе предметне скельце нанесіть 2 краплі олійного розчину вітаміну А.

2.2. Обережно додайте 3 краплі концентрованої оцтової кислоти, насиченої феруму сульфатом та 1–2 краплі концентрованої сульфатної кислоти.

2.3. Спостерігайте за блакитним забарвленням, яке поступово переходить у рожево-червоне.

3. Бромохлороформна проба на кальцифероли (вітамін D)

Вітамін D (кальциферол, антирахітичний вітамін) існує у вигляді кількох сполук, які розрізняються як хімічною будовою, так і біологічною активністю. Для людини і тварин активними вважаються вітаміни D₂ і D₃.



У природних продуктах містяться переважно провітаміни D₂ і D₃ – відповідно ергостерол і холестерол. З хімічного погляду ергостерол являє собою ненасичений циклічний спирт, в основі структури якого конденсована кільцева система циклопентанпергідрофенантрону.

Під дією УФ-променів ергостерол через ряд проміжних сполук перетворюється на вітамін D₂. Попередник вітаміну D₃-

холестерол. Завдяки наявності холестеролу та 7-дегідрохолестеролу в складі ліпідів шкіри можливий синтез вітаміну D₃ при сонячному опроміненні або опроміненні лампою УФ-опромінення поверхні тіла. Цей прийом особливо широко використовується під час лікування рахіту в людей.

Добова потреба у вітаміні D для дітей становить 10–25 мкг, для дорослої людини достатньо мінімальної кількості вітаміну D.

3.1. У суху пробірку внесіть 1–3 краплі риб'ячого жиру та 2–4 краплі розчину бром у хлороформі (1:60).

3.2. Спостерігайте за поступовим забарвленням рідини в зеленувато-блакитний колір.

4. Анілінова проба на кальциферол

При нагріванні риб'ячого жиру, який містить холекальциферол, із сумішшю аніліну та концентрованої хлоридної кислоти розчин набуває червоного забарвлення.

4.1. У суху пробірку внесіть 1 краплю риб'ячого жиру й 5 крапель хлороформу, перемішайте та додайте 1 краплю анілінового реактиву (15 частин аніліну та 1 частину концентрованої HCl).

4.2. Під час нагрівання жовта емульсія набуває червоного забарвлення.

5. Якісна реакція на вітамін E (токоферол)

Вітамін E існує у вигляді кількох ізомерів: α -, β - та γ -токоферолів. Ізомери відрізняються в основному порядком розміщення метильних груп у бензольному кільці.

Взаємодія α -токоферолу з концентрованою нітратною кислотою зумовлює забарвлення реакційної суміші у червоний колір. Це спричинено тим, що продукт окислення α -токоферолу має хіноїдну структуру. Дану реакцію використовують і для кількісного визначення α -токоферолу.

5.1. У суху пробірку внесіть 5 крапель спиртового розчину вітаміну Е, додайте кілька кристалів сахарози та 5 крапель концентрованої нітратної кислоти й інтенсивно стрясніть.

5.2. При струшуванні утворюється емульсія, яка поступово набуває червоного забарвлення.

6. Якісна реакція на вітамін Е (токоферол) з феруму хлоридом

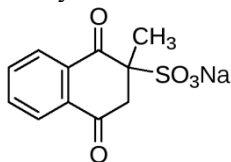
Принцип реакції ґрунтується на тому, що α -токоферол окислюється феруму (III) хлоридом до α -токоферилхінону, який має червоне забарвлення.

6.1. У суху пробірку внесіть 0,5 мл 1 %-го спиртового розчину α -токоферолу, додайте 0,5 мл 10 %-го розчину феруму (III) хлориду та ретельно перемішайте.

6.2. Спостерігайте за зміною забарвлення.

7. Якісна реакція на вітамін К (нафтохінон) із цистеїном

Відомі дві групи природних вітамінів – K_1 і K_2 – похідні нафтохінону. Вітаміни K_1 – філохінони і K_2 – менахінони. Вікасол – штучно синтезований аналог вітаміну K_1 , який має біологічну активність вітаміну.



Вікасол

Принцип методу полягає в тому, що вікасол за наявності цистеїну в лужному середовищі забарвлюється в лимонно-жовтий колір.

7.1. У суху пробірку внесіть 5 крапель розчину вікасолу, додайте 5 крапель розчину цистеїну та 1 краплю 10 %-го розчину NaOH.

7.2. Спостерігайте за появою лимонно-жовтого забарвлення.

8. Якісна реакція вітаміну К₃ з аніліном

Принцип реакції базується на тому, що спиртовий розчин вітаміну К₃ (2-метил-1,4-нафтохінону) за участю аніліну забарвлюється в червоний колір, що зумовлено утворенням 2-метил-3-феніламіно-1,4-нафтохінону та 2-метил-1,4-діокси-нафталіну.

8.1. До 1 мл 0,05 %-го розчину вікасолу додайте 2 краплі розчину аніліну і перемішайте. Рідина забарвлюється в червоний колір.

8.2. Поясніть результати досліду та запишіть висновок.

Досліджувана сполука	Реактиви	Спостереження	Пояснення
Вітамін А			
Вітамін D			
Вітамін E			
Вітамін K			

Контрольні запитання

1. Наведіть приклади якісних реакцій на вітаміни. У чому полягає їх принцип?
2. Охарактеризуйте структуру, властивості та біологічну роль водорозчинних вітамінів.
3. Дайте загальну характеристику жиророзчинних вітамінів.
4. Чим зумовлена реакція Друмонда?

5. Які властивості характерні для вітаміну А?
6. Охарактеризуйте біологічно активні форми вітаміну А.
7. За допомогою якої якісної реакції можна відрізнити каротин і вітамін А?
8. Які межі рекомендованих норм добової потреби у вітаміні А?
9. Які властивості характерні для вітаміну D?
10. На чому ґрунтується якісне визначення вітаміну D у біологічному матеріалі?
11. На яких властивостях α -токоферолу ґрунтується його взаємодія з концентрованою нітратною кислотою?
12. Що являють собою вітамери вітаміну E?
13. Поясніть принцип реакції взаємодії альфа-токоферолу з феруму хлоридом?
14. Чому вітамін E називають антистерильним?
15. Які якісні реакції дають змогу виявити вітамін K у розчині?
16. Чим зумовлена реакція взаємодії вітаміну K з аніліном?
17. Поясніть механізм реакції окислення тіаміну до тіохрому?
18. У яких продуктах харчування міститься вітамін B₁ та які рекомендовані норми добової потреби в цьому вітаміні?
19. Поясніть механізм участі рибофлавіну в реакціях оксидоредукції.
20. Поясніть різницю в будові і властивостях нікотинової кислоти та нікотинаміду.

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ВІТАМІНУ С

У природі існують тільки L-форми аскорбінової та дегідроаскорбінової кислот. Синтетично отримана неактивна D-форма.

Аскорбінова кислота бере участь у окисно-відновних реакціях; реакціях гідроксилювання проліну та лізину (біосинтез колагену), тирозину (біосинтез дофаміну, норадреналіну та адреналіну) та його катаболізму (утворення гомогентизинової кислоти), триптофану (біосинтез серотоніну); стероїдів (синтез холестеролу) та синтезу стероїдних гормонів. Виконує антиоксидантну функцію, забезпечуючи регенерацію відновленої форми феруму.

У людини, мавп та морських свинок аскорбінова кислота не синтезується, у інших ссавців вона утворюється із глюкози.

Матеріали дослідження та реактиви: картопля, яблука, свіжа і кисла капуста, цибуля, лимон, хвоя, шипшина, сеча, 2 %-й розчин HCl, 0,001 н розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу, 5 %-й розчин оцтової кислоти.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, бюретки, колби.

1. Кількісне визначення аскорбінової кислоти в рослинному матеріалі методом Тільманса

Принцип методу ґрунтується на здатності вітаміну С відновлювати 2,6-дихлорфеноліндофенол з утворенням безбарвної сполуки. Вміст вітаміну С визначають титрометричним методом. В еквівалентній точці надлишкова крапля розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу забарвлює суміш у рожевий колір.

1.1. 5 г біоматеріалу (картопля, яблука, свіжа і кисла капуста, цибуля, лимон, хвоя, шипшина) розітріть у ступці з невеликою

кількістю кварцевого піску при поступовому додаванні 9 мл 2 %-го розчину хлоридної кислоти.

1.2. Отриману витяжку відфільтруйте.

1.3. До 3 мл фільтрату додайте 2–5 мл води та відтитруйте з мікробюретки 0,001 н розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 сек.

1.4. Розрахунок вмісту аскорбінової кислоти в рослинному біоматеріалі проведіть за формулою, враховуючи що 1 мл 0,001 н розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти:

$$x = \frac{0,088 \cdot a \cdot V \cdot 100}{b \cdot m}, \text{ де}$$

X – кількість вітаміну С в рослинному біоматеріалі, мг %;

a – кількість 0,001 н розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу, використаного на титрування, мл;

V – загальний об'єм фільтрату, мл;

b – кількість фільтрату, взятого для титрування, мл;

m – наважка біоматеріалу, г.

Проведіть розрахунки та запишіть висновок.

2. Кількісне визначення вітаміну С у сечі

Для оцінки С-вітамінної забезпеченості організму визначають вміст аскорбінової кислоти у крові, сечі й тканинах. Визначення вмісту вітаміну С у сечі дає уявлення про забезпеченість ним організму, оскільки спостерігають відповідність між концентрацією вітаміну С у крові й кількістю його, що виділяється із сечею.

Метод ґрунтується на здатності вітаміну С відновлювати реактив Тільманса (2,6-дихлорфеноліндофенол) в кислому середовищі. Уринарна екскреція вітаміну С дає уявлення про забезпечення організму вітаміном С протягом певного періоду. Погодинна уринарна екскреція вітаміну С визначається за методом А. Железнякової.

При гіповітамінізії С його вміст у сечі не завжди знижений і може бути нормальним. У здорових людей введення 100 мг

вітаміну С призводить до підвищення його концентрації в крові та екскреції із сечею. При гіповітамінозі С тканини, які відчувають нестачу у вітаміні, затримують спожитий вітамін С, тому його екскреція не збільшується. Сеча здорової людини містить 20–30 мг у добовому обсязі.

Упродовж доби із сечею виділяється приблизно 25 мг вітаміну С. Вважається, що протягом двох тижнів увесь вітамін С, який надійшов із їжею, в організмі розщеплюється.

2.1. У дві колби внесіть по 2 мл 5 %-го розчину оцтової кислоти.

2.2. У першу (дослідну) колбу додайте 2 мл профільтрованої сечі, у другу (контрольну) – 2 мл дистильованої води.

2.3. Уміст колб відтитруйте 0,001 н розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 сек.

2.4. Розрахунок вмісту аскорбінової кислоти в сечі, зібраної натще, проведіть за формулою:

$$x = \frac{(A - B) \cdot k \cdot 0,088 \cdot V}{4 \cdot t}, \text{ де}$$

X – кількість аскорбінової кислоти, яка виділилася з сечею за 1 год, мг/год;

A – кількість індикатора, використаного на титрування сечі, мл;

B – кількість індикатора, використаного на титрування розчину в контрольному досліді, мл;

k – поправка до титру;

V – об'єм зібраної сечі, мл;

0,088 – кількість аскорбінової кислоти (в мг), яка відповідає 1 мл 0,001 н розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу;

4 – об'єм розчину, який використовується на титрування;

t – проміжок часу між двома сечовиділеннями, год.

Розрахуйте погодинну уринарну екскрецію вітаміну С та зробіть відповідні висновки.

Контрольні запитання

1. У чому суть кількісного визначення аскорбінової кислоти за методом Тільманса в рослинному матеріалі?
2. Які етапи визначення кількості вітаміну С в рослинному біоматеріалі?
3. Яке діагностичне значення має визначення вмісту вітаміну С в сечі?
4. Яке значення має визначення рівня погодинної уринарної екскреції вітаміну С?
5. Який рівень погодинної уринарної екскреції вітаміну С:
 - а) при забезпеченні організму вітаміном С;
 - б) при С-гіповітамінозах та С-гіпервітамінозах.
6. Які форми аскорбінової кислоти існують у природі?
7. У яких реакціях бере участь вітамін С?
8. Чи може синтезуватися аскорбінова кислота в організмі людини?

Тема 4. Гормони – регулятори обміну речовин

Лабораторна робота 13

ЯКІСНЕ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГОРМОНІВ

Специфічні реакції на гормони використовуються для їх кількісного визначення та під час аналізу гормональних препаратів у контрольно-аналітичних лабораторіях.

Матеріали дослідження та реактиви: таблетки тиреоїдину, 0,1 %-й розчин адреналіну, інсулін, фолікулін, концентрована HNO_3 , H_2SO_4 , 1%-й, 10 %-й та 30 %-й NaOH , 1 %-й розчин CuSO_4 , 0,5 %-й розчин нінгідрину, 5 %-й $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 1 %-й KIO_3 , хлороформ, 1 %-й FeCl_3 , 10 %-й Na_2CO_3 , 10 %-й CH_3COOH , 2 %-й розчин калію гексаціаноферату, стандартний розчин адреналіну (у мірну колбу на 25 мл відміряють 1 мл розчину адреналіну(1:1000) і доводять до мітки водою – 1 мл такого розчину містить 0,04 мг адреналіну), реактив Фоліна.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, мірні колби на 25 мл, водяна баня, ФЕК.

I. Якісні реакції на гормони

1. Якісні реакції на білково-пептидні гормони

Білково-пептидні гормони синтезуються з амінокислот і можуть бути пептидами (2–50 амінокислот) або поліпептидами – білками зі складною просторовою структурою, наприклад інсулін.

До білково-пептидних належать гормони гіпоталамуса, гіпофіза, підшлункової залози та тиреокальцитонін щитоподібної залози.

Інсулін – гормон, який продукується β -клітинами острівців Лангерганса підшлункової залози. Інсулін регулює рівень глюкози в крові, використовується під час лікування цукрового діабету.

Інсулін – це простий білок із молекулярною масою 6000 Да, який складається з двох поліпептидних ланцюгів, з'єднаних дисульфідними зв'язками, утвореними між сульфогідрильними групами залишків цистеїну. Ланцюг А містить 21 амінокислотний залишок, а ланцюг В – 30.

У молекулі інсуліну немає амінокислот метіонін та оксипролін. Інсулін має білкову природу та властивості, характерні для білків, і дає позитивні для них кольорові реакції (біуретову, нінгідринову, ксантопротеїнову та Фоля).

1.1. Біуретова реакція

1.1.1. У пробірку налийте 5 крапель інсуліну.

1.1.2. Додайте 1 мл 1 %-го розчину NaOH і 3 краплі 1 %-го розчину CuSO_4 .

1.1.3. Спостерігайте за зміною забарвлення.

1.2. Нінгідринова реакція

1.2.1. У пробірку налийте 5 крапель інсуліну.

1.2.2. Додайте 0,5 мл 0,5 % розчину нінгідрину й нагрійте до кипіння.

1.2.3. Отримані результати спостережень занесіть до таблиці.

1.3. Ксантопротеїнова реакція

1.3.1. У пробірку налийте 5 крапель інсуліну.

1.3.2. Додайте 3 краплі концентрованої HNO_3 та обережно нагрійте.

1.3.3. Після охолодження в пробірку додайте 10 крапель 30 %-го розчину NaOH.

1.3.4. Результати спостережень занесіть до таблиці.

1.4. Реакція Фоля

1.4.1. У пробірку налийте 0,5 мл розчину 5 %-го $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

1.4.2. По краплях додайте 30 %-го розчину NaOH до розчинення утвореного осаду $\text{Pb}(\text{ONa})_2$.

1.4.3. У пробірку додайте 5 крапель інсуліну. Суміш обережно нагрійте. При позитивній реакції розчин починає темніти.

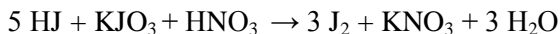
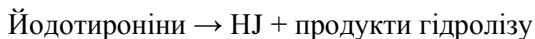
Назва гормону	Назва реакції	Забарвлення розчину
Інсулін		

2. Якісні реакції на гормони – похідні амінокислот

Похідні амінокислот синтезуються з амінокислоти тирозину, яка синтезується з фенілаланіну. До цієї групи належать гормони мозкового шару наднирників і гормони щитоподібної залози.

2.1. Якісна реакція на гормони щитоподібної залози (тироксин)

Гормони щитоподібної залози – йодовмісні сполуки. Метод виявлення йодотиронінів базується на відщепленні при кислотному гідролізі HJ, при взаємодії якої з KJO₃ виділяється вільний йод, який у хлороформі має фіолетове забарвлення:



2.1.1. У пробірку помістіть кілька кристалів тиреоїдину, додайте 10 крапель концентрованої HNO₃ і нагрійте 3–5 хв у киплячій водянній бані.

2.1.2. Додайте 20 крапель 1 %-го KJO₃. Вміст пробірок перемішайте й охолодіть.

2.1.3. Додайте 1 мл хлороформу, струсніть і спостерігайте за зміною забарвлення.

2.2. Якісні реакції на гормони мозкового шару наднирників

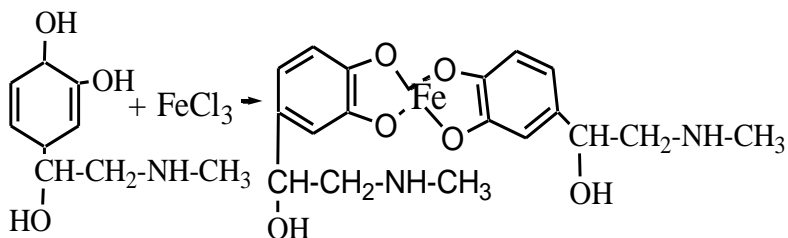
У клітинах мозкового шару надниркових залоз утворюються гормони адреналін та норадреналін. За хімічною природою вони – похідні пірокатехіну (катехоламіни) і утворюються в організмі з амінокислоти тирозину.

У нейтральних розчинах адреналін та норадреналін окислюються з утворенням продуктів, які отримали назву адренохрому (мають червоне забарвлення). Полімеризація адренохрому спричинює утворення темних пігментів типу меланінів.

Норадреналін за своєю будовою відрізняється від адреналіну відсутністю метильної групи. Префікс нор- означає, що у складі органічної сполуки метильна група заміщена на атомом гідрогену.

2.2.1. Реакція на адреналін із FeCl_3

При додаванні до розчину адреналіну феруму хлориду рідина забарвлюється в зелений колір унаслідок утворення комплексної сполуки типу феруму феноляту. Адреналін має слабколужну реакцію, легко окислюється з утворенням адренохрому, внаслідок чого розчин забарвлюється в червоний колір.



2.2.1.1. У пробірку додайте 1 мл адреналіну.

2.2.1.2. Додайте 1 краплю розчину 1 %-го FeCl_3 і розмішайте. Спостерігайте за появою зеленого забарвлення.

2.2.1.3. Додайте 1 краплю розчину 10 %-го NaOH і спостерігайте за появою вишнево-червоного забарвлення.

2.2.2. Реакція з $KJО_3$

Адреналін у кислому середовищі з йодноватокислим калієм утворює сполуку червоно-фіолетового кольору.

2.2.2.1. До 0,5 мл розчину адреналіну додайте 1 мл 1 %-го розчину $KJО_3$, 10 крапель 10 %-го розчину CH_3COOH .

2.2.2.2. Суміш підігрійте до температури 60–65 °С. Спостерігайте за зміною забарвлення.

2.2.3. Окислення адреналіну калію гексаціанофератом

Принцип реакції ґрунтується на здатності адреналіну окислюватися при дії на нього калію гексаціаноферату в адренохром, з якого в лужному середовищі утворюється адренолутин, котрий дає жовто-зелену флуоресценцію.

2.2.3.1. У дві пробірки внесіть по 1 мл 0,1 % розчину адреналіну.

2.2.3.2. У першу пробірку додайте 2 мл води, у другу – 2–3 краплі 0,2 % розчину калію гексаціаноферату та залишіть на 5 хв.

2.2.3.3. Потім у кожен пробірку додайте на кінчику шпателя кристали аскорбінової кислоти та 1 мл 10 %-го розчину натрій гідроксиду (аскорбінова кислота запобігає подальшому окисненню адренохрому, а натрію гідроксид сприяє перетворенню його в адренолутин).

2.2.3.4. Пробірки стрясіть та спостерігайте за інтенсивністю характерної флуоресценції.

2.2.3.5. Поясніть результати досліду та зробіть висновок.

Назва гормону	Назва реакції	Забарвлення розчину
Адреналін		

3. Якісні реакції на стероїдні гормони

Стероїдні гормони синтезуються з холестеролу. До цієї групи належать гормони кори наднирників і статевих залоз.

Статеві гормони відіграють важливу роль у обміні речовин і сприяють виникненню вторинних статевих ознак. Вони виробляються статевими залозами – сім'яниками і яєчниками. До жіночих статевих гормонів належить естрадіол, естрон (фолікулін) і естріол, до чоловічих – андростерон, тестостерон, андростан.

3.1. Реакція на фенільну групу естроу з сульфатною кислотою

При взаємодії естроу і сульфатної кислоти утворюється сполука солом'яно-жовтого кольору із зеленуватою флюоресценцією, яка при нагріванні набуває помаранчевого забарвлення.

3.1.1. Для приготування спиртового розчину фолікуліну (естроу) вміст 5 ампул 0,1 %-го масляного розчину фолікуліну для ін'єкцій вилийте у розділяючу лійку, яка містить 50 мл етанолу. Лійку струсіть.

3.1.2. Після відшарування фаз нижній масляний шар відкиньте, а верхній (спиртовий) використайте для дослідження.

3.1.3. У суху пробірку внесіть 5 крапель спиртового розчину фолікуліну і помістіть її на 5 хв у киплячу водяну баню (для випаровування спирту).

3.1.4. Додайте 1 мл концентрованої H_2SO_4 і поставте пробірку на 5–10 хв на киплячу водяну баню.

3.1.5. Спостерігайте за зміною забарвлення.

3.2. Реакція на фенільну групу естроу з реактивом Фоліна

При взаємодії фолікуліну з солями фосфорно-вольфрамової та фосфорномолібденової кислот, завдяки наявній у складі молекули фолікуліну фенільній групі, відбувається їх відновлення з утворенням комплексів, які мають сине забарвлення.

3.2.1. До 2 мл розчину фолікуліну додайте 1 краплю 30 %-го розчину натрію гідроксиду і 1 мл реактиву Фоліна.

3.2.2. Розвивається характерне для фенільної групи синє забарвлення.

3.2.3. Поясніть результати досліду та зробіть висновок.

3.2.4. Результати спостережень занесіть до таблиці.

Назва гормону	Назва реакції	Забарвлення розчину
Естрон		

II. Кількісне визначення гормонів

1. Кількісне визначення адреналіну за Фоліном

Метод базується на колориметричному визначенні інтенсивності синього забарвлення, яке виникає при взаємодії адреналіну з реактивом Фоліна. Останній складається зі солей фосфорновольфрамної та фосфорномолібденової кислот. Ці солі при взаємодії з адреналіном відновлюються з утворенням нижчих окисів металів, комплекси яких забарвлюються в синій колір.

1.1. У першу (дослідну) пробірку внесіть 1 мл сечі, у другу (стандартну) – 1 мл стандартного розчину адреналіну, у третю (контрольну) – 1 мл води.

1.2. У кожену пробірку додайте по 4 мл 10 %-го свіжоприготовленого розчину карбонату натрію і по 0,5 мл реактиву Фоліна.

1.3. Уміст пробірок перемішайте. Рідина поступово забарвлюється в синій колір, який досягає найбільшої інтенсивності через 3–5 хв.

1.4. Через 5 хв об'єм рідини у пробірках доведіть до 10 мл 10 %-м розчином натрію карбонату.

1.5. Визначте екстинкцію дослідної і стандартної проб на ФЕКу при жовтому світлофільтрі в кюветах з довжиною оптичного шляху 10 мм щодо контролю.

1.6. Розрахунок вмісту адреналіну в досліджуваному матеріалі проведіть за формулою:

$$C = \frac{C_{ст.} \cdot E_{дос.}}{E_{ст.}} \cdot 100 \text{мг\%}, \text{ де}$$

C – концентрація адреналіну в дослідному розчині, мг/мл;

C_{ст.} – концентрація адреналіну у стандартному розчині, мг/мл;

E_{дос.} – екстинкція дослідної проби;

E_{ст.} – екстинкція стандартної проби.

У нормі вміст адреналіну складає 3–15 мкг/добу (16,4–81,9 ммоль/добу).

Клінічне значення. Збільшення вмісту адреналіну в сечі спостерігається при захворюваннях, пов'язаних із больовим синдромом, емоційним і фізичним навантаженням, інсомії (порушенні сну). Незначне збільшення катехоламінів можливе при гіпертонічних кризах, після введення інсуліну, кортизону, АКТГ.

Значне збільшення рівня гормонів відбувається при феохромацитомах, які супроводжуються підвищенням тиску крові у вигляді нападів стійкої гіпертензії.

Зниження вмісту катехоламінів спостерігається при порушенні фільтраційної здатності нирок, симпатичних кризах, які розвиваються внаслідок ураження мозку, при застосуванні деяких лікарських препаратів (резерпін, прозерину, гексонію).

Контрольні запитання

1. Чому інсулін дає позитивну біуретову реакцію?
2. До якої групи якісних реакцій належить біуретова реакція?
3. Яка будова інсуліну, його особливості?
4. Чи буде позитивною ксантопротеїнова реакція з інсуліном?
5. Що виявляють у складі інсуліну за допомогою реакції Фоля?
6. Яке значення дисульфідних зв'язків у молекулі інсуліну?

7. Який механізм утворення активної форми інсуліну?
8. Поясніть біологічну роль катехоламінів.
9. Які особливості біологічних ефектів адреналіну і норадреналіну?
10. Запишіть рівняння реакцій за схемою: фенілаланін → адреналін.
11. На чому ґрунтується якісна реакція на адреналін з ферумом хлоридом?
12. Як відбувається окиснення адреналіну? З якою метою додають аскорбінову кислоту? Який можливий механізм реакції?
13. Під контролем якого тропного фактору перебуває інкреція фолікуліну?
14. Яка хімічна природа адреналіну?
15. Яке діагностичне значення має визначення адреналіну в рідинах організму?

Тема 5. Вуглеводи

Лабораторна робота 14

ВИЯВЛЕННЯ ВУГЛЕВОДІВ У ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ

Вуглеводи – це найпоширеніші у природі органічні сполуки. Вміст вуглеводів у тканинах становить від 2 % у тварин до 80 % сухої маси рослин.

Відповідно до кількості мономерних (структурних) ланок вуглеводи поділяють на три основні групи: моносахариди, олігосахариди та полісахариди.

Моносахариди (монози) – це похідні багатоатомних спиртів, які містять карбонільну групу – альдегідну або кетонну. За кількістю атомів Карбону в молекулі моносахариди поділяються на тріози, тетрози, пентози, гексози тощо.

Хімічні властивості моносахаридів зумовлені наявністю глікозидного, карбонільного та спиртових гідроксилів. Глікозидний гідроксил здатний взаємодіяти з гідроксигрупами інших моноз із утворенням глікозидного зв'язку, за участю якого утворюються молекули оліго- та полісахаридів.

Ідентифікація моноз ґрунтується на їх фізико-хімічних властивостях: оптичній активності та реакційній здатності карбонільної та гідроксильних груп.

Олігосахариди – вуглеводи, які містять від 2 до 10 залишків моносахаридів, з'єднаних глікозидними зв'язками. Залишки моносахаридів у молекулах дисахаридів можуть бути з'єднані або їх напівацетальними гідроксилами – *глікозидо-глікозидним зв'язком*, або *глікозидо-глюкозидним зв'язком* між напівацетальним гідроксилом одного моносахариду і одним із спиртових гідроксилів другого.

За типом зв'язку дисахариди поділяються на два типи. Дисахариди першого типу (трегалоза, сахароза), які не мають вільних глікозидних гідроксилів, існують тільки у циклічній формі і не вступають у реакції, характерні для альдегідної або кетогруп. Вони не мутаротують і не відновлюють метали

змінної валентності, тому такі дисахариди називають *невідновлювальними (нередукуючими)*.

Дисахариди другого типу (мальтоза, лактоза, целобіоза) за хімічними властивостями подібні до моносахаридів. Вони існують у двох таутомерних формах – циклічній та карбонільній, і для них характерні реакції за участю карбонільної і спиртової груп: вони окислюються до альдонових кислот, відновлюються до багатоатомних спиртів, піддаються реакціям алкілювання та ацилювання. За відновними властивостями їх називають *відновлювальними (редуючими)*.

Полісахариди (поліози) – високомолекулярні продукти поліконденсації моносахаридів, зв'язані один з одним глікозидними зв'язками та утворюють лінійні або розгалужені ланцюги. Найчастіше моносахаридною ланкою є D-глюкоза.

За моносахаридним складом полісахариди поділяють на *гомopolісахариди* (або гомоглікани), які складаються із залишків моноз одного виду, і *гетерopolісахариди* (або гетероглікани), молекули яких вміщують залишки різних моносахаридів. За характером поліглікозидного ланцюга поліози можуть бути *лінійними і розгалуженими*.

Прикладами гомopolісахаридів є рослинний полімер *крохмаль* і *глікоген* тваринного походження із загальною формулою $(C_6H_{10}O_5)_n$.

Вуглеводи їжі в травному тракті розщеплюються до мономерів за дії *глікозидаз* – амілази, мальтази, сахарази, лактази, які каталізують гідроліз глікозидних зв'язків.

При частковому гідролізі крохмалю утворюються менші полімери – декстрини, при повному – глюкоза. Молекула *глікогену* за структурою подібна до амілопектину. При гідролізі спочатку утворюються декстрини, надалі – мальтоза і глюкоза.

Матеріали дослідження та реактиви: молоко, мука, хліб, картопля, рис, кефір, мед, витяжка кукурудзяного зерна, концентрована CH_3COOH , Фелінгова рідина, 1 %-й розчин крохмалю, 1 %-на сахароза, 1 %-на глюкоза, 1 %-на фруктоза, 1 %-на галактоза, α -нафтол, 1 %-й розчин J_2 в 2 % розчині KI, 5 %-й, 10 %-й та 30 %-й NaOH, 5 %-й і 7 %-й $CuSO_4$, 2 %-й NaOH,

5 %-й NaF, 0,04 M I₂; 5 %-а HCl; 0,05 M Na₂S₂O₃; 1 %-й розчин крохмалю.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, бюретки, водяна баня.

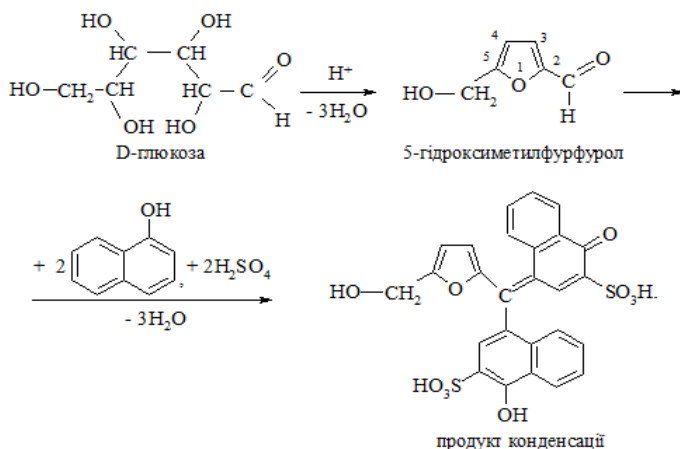
I. Якісне виявлення моносахаридів

Більшість реакцій ідентифікації гексоз ґрунтується на їх характерній здатності, як і всіх вуглеводів із вільним глікозидним гідроксилем, до відновлення деяких слабких окисників. Реакції окислення карбонільної групи моносахаридів легко відбуваються в лужному середовищі і набагато повільніше – в нейтральному та, особливо, в кислому середовищі.

Найпоширеніші реакції, за допомогою яких виявляють моносахариди, – це реакції Моліша, Тромера та Фелінґа.

1.1. Загальна реакція на моносахариди (реакція Моліша)

Специфічною реакцією на всі вуглеводи є реакція з α -нафтолом. При дії сульфатної кислоти на вуглеводи утворюються фурфурол та оксиметилфурфурол, які, конденсуючись з α -нафтолом, утворюють забарвлений продукт.



1.1.1. У три пробірки налейте по 10 крапель 1 %-х розчинів крохмалю, сахарози і глюкози.

1.1.2. Додайте по 2 краплі розчину α -нафтолу та перемішайте.

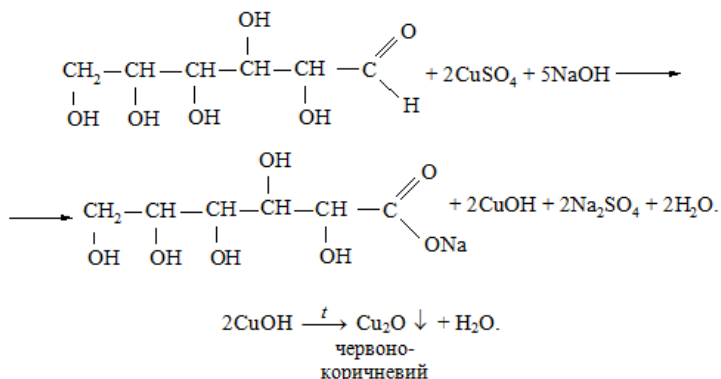
1.1.3. Обережно по стінці додайте рівний об'єм концентрованої сульфатної кислоти.

1.1.4. На межі розділу рідин з'являється забарвлене кільце.

1.2. Реакція Тромера

Розчини моносахаридів у лужному середовищі відновлюють при нагріванні гідроксид купруму (II) до геміоксиду купруму. Гексози окислюються при цьому до солей альдонових кислот.

1.2.1. У пробірку до 2 мл 1 %-го розчину глюкози, фруктози чи галактози додайте 1 мл 5 %-го розчину NaOH та 5 крапель 5 %-го CuSO_4 .



1.2.2. Випадає осад гідроксиду купруму (II), який унаслідок перемішування чи струшування пробірки розчиняється, а розчин набуває блакитного забарвлення.

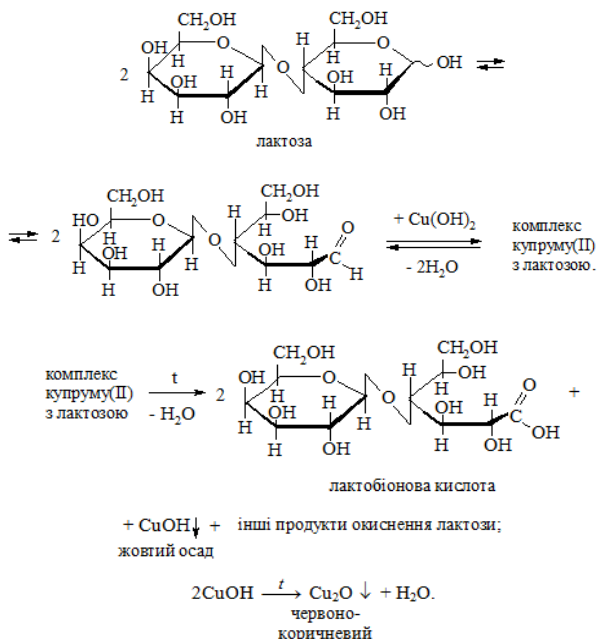
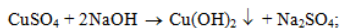
1.2.3. Пробірки обережно нагрійте до кипіння на водяній бані до утворення жовтого осаду CuOH , який з часом унаслідок перетворення CuOH на Cu_2O змінює забарвлення на червоне, що вказує на позитивну реакцію Тромера.

II. Виявлення дисахаридів

2.1. Виявлення лактози у молоці

Лактоза (лат. *lactis* – молоко) міститься в молоці та молочних продуктах. Молекула лактози складається із молекул глюкози та галактози та має відновлювальні властивості. Лактоза не бере участі в спиртовому бродінні, але під дією молочнокислих бактерій гідролізується з наступним зброджуванням утворених продуктів на молочну кислоту (молочнокисле бродіння). Лактоза має важливе значення для функціонування організму. Саме «молочний цукор» – основне середовище для появи і розмноження біфідо- і лактобактерій, які становлять основу здорової кишкової мікрофлори.

Принцип методу ґрунтується на тому, що якщо сполука є відновлювальним вуглеводом, при додаванні реактиву Фелінга з наступним нагріванням розчин набуває червоно-коричневого забарвлення внаслідок утворення осаду оксиду купруму (I).



2.1.1. Налийте в пробірку 3 мл молока, додайте 10 крапель концентрованої оцтової кислоти для денатурації білка. Відфільтуйте.

2.1.2. До фільтрату додайте 2 мл Фелінгової рідини. Вміст пробірки перемішайте і нагрійте.

2.1.3. Спостерігайте за зміною забарвлення у верхній частині розчину.

2.2. Кількісне визначення концентрації лактози в молоці

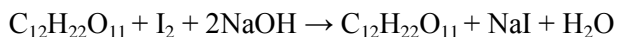
Лактоза складається із залишків D-галактози та D-глюкози, з'єднаних між собою β -(1,4)-глікозидним зв'язком. Наприклад, в людському молоці лактози близько 7 %, в молоці корови – 5 %, а в козячому – 4 %.

Лактоза відіграє важливу роль у виробництві молочних продуктів. Під дією різних мікроорганізмів, які вводяться в молоко у вигляді заквасок і їхніх ферментів, молочний цукор зброджується, утворюючи залежно від виду бактерій молочну кислоту, спирт, вуглекислоту, масляну чи лимонну кислоти тощо.

Непереносимість лактози виникає при відсутності лактази – ферменту, який гідролізує лактозу до глюкози та галактози, які мають потім адсорбуватися в тонкому кишечнику. При недостатній функції лактази лактоза залишається в кишечнику в незміненому вигляді та зв'язує воду, що супроводжується розладами шлунково-кишкового тракту.

Безпечною добовою дозою лактози вважається 40 г (окрім дітей). Визначити чутливість до засвоєння лактози можна за допомогою лактозотолерантного тесту.

Метод ґрунтується на здатності альдегідної групи лактози в лужному середовищі окислюватися молекулярним йодом:



Надлишкову кількість йоду, яка не вступила в реакцію, визначають титруванням тіосульфатом натрію, використовуючи як індикатор крохмаль.

2.2.1. У дві мірні колби внесіть по 5 мл 7 %-го розчину CuSO_4 , 5 мл розчину 2 %-го NaOH та 2,5 мл 5 %-го розчину NaF .

2.2.2. В одну з колб (дослід) додайте 5 мл молока, в іншу (контроль) – 5 мл дистилату, перемішайте, долийте дистилат до об'єму 50 мл і через 20 хв відфільтруйте.

2.2.3. Потім у конічні колби перенесіть по 5 мл фільтрату дослідів й контролю, влийте по 5 мл розчину йоду і, безперервно перемішуючи, додайте 2,5 мл 2 %-го розчину NaOH .

2.2.4. Колби ретельно закрийте, через 10 хв до їх вмісту додайте по 2,5 мл розчину 5 %-ї HCl , 3 краплі 1 %-го розчину крохмалю (попередньо збовтати!) й титруйте розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до зникнення забарвлення, яке утворилося внаслідок додавання крохмалю.

2.2.5. Масову концентрацію лактози (C , мг/мл) в молоці розрахуйте за формулою:

$$C = (A-B) \cdot f \cdot Q \cdot V_0 / V_1 \cdot V_2, \text{ де}$$

A і B – об'єм розчину натрію тіосульфату, витрачений на титрування проби та контролю;

f – коефіцієнт поправки на титр 0,05 моль/л розчину натрію тіосульфату (0,97);

Q – маса лактози (18,1 мг), еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину натрій тіосульфату;

V_0 – загальний об'єм проби;

V_1 і V_2 – об'єми фільтрату та молока, взяті для дослідження.

2.3. Виявлення сахарози в меді

У натуральному бджолиному меду кількість сахарози не повинна перевищувати 5 %. Цукровий (експресний) мед часто виробляють на пасіках для створення бджолами кормових запасів на зиму, заміни падевого меду, небезпечного для життя цих комах. За вмістом глюкози і фруктози цукровий мед майже не відрізняється від нектарного, але лікувальних властивостей він не має.

При наявності в меду до 1 % сахарози в реакції з розчином камфори утворюється оливковий колір, 3 % – блідо-оранжевий,

5 % – помаранчевий, 7 % – оранжево-червоний, 10 % – малиново-червоний, 15 % – червоний і 20 % – темно-червоний.

2.3.1. У пробірку відміряйте 0,5 мл 5 %-го розчину досліджуваного меду, додайте 0,5 мл 40 %-го розчину NaOH. Витримайте протягом 1 хв, після чого додайте 5 мл дистильованої води.

2.3.2. Закрийте пробірку пробкою і помістіть на киплячу водяну баню на 15 хв. Потім вміст охолодіть холодною водою або льодом до кімнатної температури.

2.3.3. У пробірку відміряйте 1 мл розчину меду з лугом, додайте 2 мл 1 %-го розчину камфори, розчиненої в концентрованій H_2SO_4 . Збовтайте і через 5 хв проаналізуйте отриманий результат.

III. Виявлення полісахаридів

Глікозидні зв'язки, які з'єднують залишки моноз у молекулах полісахаридів, утворюються переважно за глікозидо-глікозидним типом, унаслідок чого в молекулах поліоз майже немає вільних напівацетальних гідроксилів, і вони не проявляють відновлювальних властивостей. Тому хімічні властивості полісахаридів визначаються лише реакційною здатністю вільних спиртових гідроксилів.

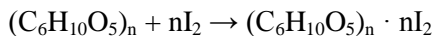
Резервні полісахариди тканин рослин і тварин крохмаль і глікоген реагують із йодом з утворенням нестійких комплексних адсорбційних сполук синього (крохмаль) або червоно-бурого (глікоген) кольору, які знебарвлюються при нагріванні і знову забарвлюють розчини при охолодженні. Знебарвлення розчинів сполук полісахаридів із йодом спостерігається також при додаванні лугу. Зникнення забарвлення внаслідок нагрівання та додавання лугу зумовлене тим, що в утворенні комплексів бере участь молекулярний йод, а не йодид-іони.

3.1. Виявлення крохмалю у хлібі, картоплі, рисі та кукурудзі

Крохмаль – суміш *лінійного* (амілози, 10–30 %) та *розгалуженого* (амілопектину, 70–90 %) гомополісахаридів. В амілозі та у лінійних ділянках амілопектину мономері глюкози сполучені α -1,4-зв'язками; в розгалуженнях амілопектину формуються міжланцюгові α -1,6-зв'язки.

Якісна реакція на крохмаль ґрунтується на тому, що молекули йоду, потрапляючи в спіралі амілози, відчувають вплив з боку прилеглих ОН-груп, що призводить до збільшення довжини зв'язку I-I. Утворюються клатрати – комплексні сполуки, де молекули йоду розташовуються в каналі спіралі амілози.

Тому реакція крохмалю з йодом якісна саме на амілозну структуру молекули крохмалю:



При взаємодії крохмалю з йодом утворюються комплексні сполуки, які мають синій колір.

Варіант 1

3.1.1. На шматочки білого хліба, сирі картоплі та рису нанесіть піпеткою 1 краплю 1 %-го розчину йоду в 2 %-му розчині КJ.

3.1.2. За появою характерного темно-синього забарвлення зробіть висновок про наявність крохмалю у досліджуваних зразках.

Варіант 2

3.2.1. В одну пробірку налийте 2 мл картопляного соку, в другу – 2 мл витяжки кукурудзяного зерна.

3.2.2. У дві пробірки додайте 1–2 краплі розчину Люголя. Вміст пробірок перемішайте та спостерігайте за утворенням синього забарвлення.

3.2.3. Перенесіть по 1 мл розчинів в інші пробірки і додайте до них по 1 мл 10 %-го розчину NaOH.

3.2.4. Спостерігайте за знебарвленням розчину. Те ж саме відбувається і при нагріванні суміші, яка залишилася у перших двох пробірках. При охолодженні розчинів забарвлення відновлюється.

3.2. Виявлення глікогену в печінці

Глікоген – полісахарид, який є основним резервом вуглеводів у тваринному організмі. Головне депо для глікогену – печінка та м'язи. Колір від винно-червоного до червоно-бурого (залежно від походження глікогену) виникає в результаті складного процесу утворення нестійкої адсорбційної сполуки глікогену з йодом.

3.2.1. 0,5 г печінки щура розітріть з 3 мл 5 %-го ТХО у фарфоровій ступці.

3.2.2. Додайте 5 мл дистильованої води, перемішайте та відфільтруйте.

3.2.3. З фільтратом проведіть реакцію Люголя. За наявності у досліджуваному матеріалі глікогену розчин набуває характерного червоно-бурого забарвлення.

3.2.4. За результатами спостережень сформулюйте висновок.

4. Виявлення етанолу в кефірі

Лактоза молока під час гідролізу утворює галактозу і глюкозу. Глюкоза під впливом ферментів дріжджів може зброджуватися – окислюватися до етилового спирту й оксиду карбону (IV):



4.1. Відфільтруйте 2 мл кефіру.

4.2. Відберіть у пробірку 5 крапель фільтрату кефіру, додайте по 5 крапель 10 %-го розчину NaOH, також кілька крапель 1 %-го розчину йоду в 2 % розчині KI.

4.3. За наявності етанолу рідина мутніє, спостерігається поява запаху йодоформу:



Контрольні запитання

1. На яких властивостях ґексоз ґрунтується більшість реакцій її ідентифікації?
2. При проведенні реакції Тромера випав червоний осад. Назвіть сполуку, яка спричинила його утворення?
3. Які зв'язки формуються між моносахаридними одиницями у складі дисахаридів?
4. Від чого залежить наявність у дисахаридів відновлювальних властивостей?
5. Які дисахариди належать до невідновлювальних?
6. У чому полягає принцип методу якісного визначення лактози в молоці?
7. На чому ґрунтується принцип кількісного визначення концентрації лактози у молоці?
8. За допомогою якої реакції можна виявити відсотковий вміст сахарози в меду?
9. За якими принципами класифікують полісахариди?
10. Чи мають полісахариди відновлювальні властивості?
11. На якому принципі базуються якісні реакції на полісахариди?
12. Які сполуки можуть утворюватися при гідролізі крохмалю?
13. За допомогою якої реакції можна виявити наявність глікогену?

Тема 6. Ліпіди

Лабораторна робота 15

ЯКІСНЕ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ХОЛЕСТЕРОЛУ

Холестерол – це вторинний циклічний спирт. Значна частина холестеролу в крові міститься у вигляді складних ефірів із вищими жирними кислотами – пальмітиною, стеариною або олеїною. Холестерол та його ефіри нерозчинні у воді, добре розчиняються в органічних розчинниках: хлороформі, ефірі, спирті тощо.

У крові холестерол утворює комплексні сполуки з білками. У мозку холестерол в нормі міститься майже виключно у вільному вигляді, а не у вигляді ефірів. У головному мозку відбувається синтез холестеролу.

Із холестеролу в організмі людини утворюються сполуки, що володіють високою фізіологічною активністю: жовчні кислоти і стероїдні гормони.

Матеріали дослідження та реактиви: сироватка крові, стандартний розчин холестеролу (1,8 г/л) в хлороформі, концентрований оцтовий ангідрид, концентрована сульфатна кислота, реактив 1 (суміш льодової оцтової кислоти, оцтового ангідриду, концентрованої сульфатної кислоти у співвідношенні 1:5:1).

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, ФЕК.

1. Якісна реакція на холестерол (реакція Лібермана-Бурхарда)

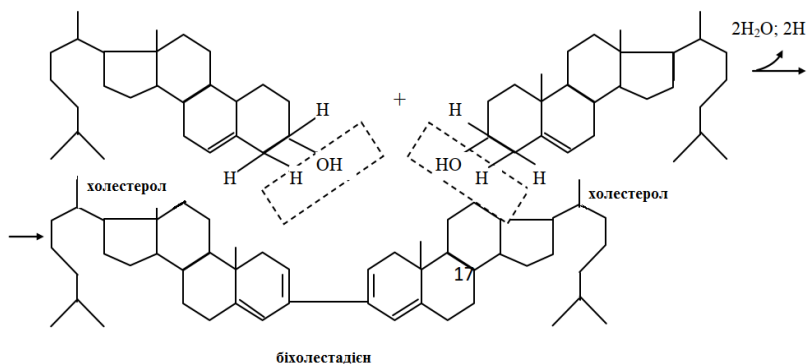
Принцип методу ґрунтується на здатності розчину холестеролу в хлороформі утворювати з концентрованим оцтовим ангідридом і концентрованою сульфатою кислотою червоне забарвлення, яке з часом переходить у синє та зелене.

1.1. До 1 мл хлороформного розчину холестеролу додайте 10 крапель концентрованого оцтового ангідриду та 2 краплі концентрованої сульфатної кислоти, добре перемішайте.

1.2. Спостерігайте за змінами забарвлення. Спочатку розвивається червоне, потім червоно-фіолетове забарвлення, яке з часом набуває інших відтінків – синього та зеленого.

2. Визначення вмісту загального холестеролу в сироватці крові методом Ілька

Метод ґрунтується на реакції Лібермана-Бурхарда (дегідратація холестеролу з подальшою конденсацією двох молекул в біхолестадиєн).



Біхолестадиєн за наявності оцтового ангідриду та сульфатної кислоти перетворюється на сульфопохідне зеленого кольору. Інтенсивність смарагдово-зеленого забарвлення пропорційна вмісту холестеролу в сироватці крові.

2.1. У пробірку № 1 налийте 0,1 мл сироватки крові, № 2 – 0,1 мл стандартного розчину холестеролу

2.2. У кожену пробірку додайте по 2 мл реактиву 1, перемішайте та залишіть у термостаті на 20 хвилин при 37 °С.

2.3. Абсорбцію забарвленої в зелений колір рідини, виміряйте на ФЕКу в кюветі затовшки 5 мм навпроти води при червоному світлофільтрі (довжина хвилі – 650–660 нм).

2.4. Концентрацію холестеролу в дослідній пробі розрахуйте за формулою:

$$C = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{досл.}}}{E_{\text{ст.}}}$$

C – вміст холестеролу в досліджуваній сироватці, (мг/100 мл);

$E_{\text{досл.}}$ – екстинкція досліджуваної проби;

$E_{\text{ст.}}$ – екстинкція стандартного розчину;

$C_{\text{ст.}}$ – концентрація холестеролу в стандартному розчині (180 мг/100мл).

Коефіцієнт перерахунку в одиниці СІ (ммоль/л) – 0,0258.

Норма холестеролу в сироватці крові людей за фізіологічних умов становить 2,97–8,79 ммоль/л (115–340 мг%).

Клініко-діагностичне значення. Збільшення вмісту холестеролу в крові (гіперхолестеролемія) спостерігають при атеросклерозі, цукровому діабеті, механічній жовтяниці, гіпотиреозі.

Зниження холестеролу в крові (гіпохолестеролемія) спостерігають при анеміях, голодуванні, туберкульозі, гіпертиреозі, раковому виснаженні, паренхіматозній жовтяниці, гарячці, при введенні інсуліну.

Контрольні запитання

1. З якими жирними кислота в крові холестерол найчастіше утворює ефіри?
2. Чи може холестерол утворює комплексні сполуки з білками у крові?
3. В якому вигляді в нормі холестерол міститься у плазмі крові?
4. Які біологічно активні сполуки синтезуються в організмі з холестеролу?
5. Охарактеризуйте принцип якісного виявлення холестеролу реакцією Лібермана-Бурхарда.
6. На чому ґрунтується принцип визначення вмісту загального холестеролу в сироватці крові методом Ілька?

РОЗДІЛ 2 ДИНАМІЧНА БЮХІМІЯ

ОБМІН РЕЧОВИН

Тема 7. Обмін вуглеводів

Лабораторна робота 16

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛЮКОЗИ В КРОВІ ТА СЕЧІ

Рівень глюкози в крові перебуває під контролем нейроендокринної системи, внаслідок чого в здоровому організмі можливі значні тимчасові коливання даного показника.

Концентрація глюкози венозної крові, взятої у здорової людини вранці натщесерце, коливається в межах від 3,3 до 6,1 ммоль/л.

Зниження концентрації глюкози в крові викликає збудження центральної нервової системи, яка стимулює розпад глікогену до глюкози. *Гіпоглікемія* – стан, за умов якого відбувається зниження рівня глюкози в крові нижче 3,3 ммоль/л. Гіпоглікемія спостерігається при захворюваннях підшлункової залози, недостатній функції щитоподібної залози, наднирників і гіпофізу. Окрім того, гіпоглікемія може бути викликана голодуванням, значним фізичним навантаженням, передозуванням інсуліну під час лікування, порушенням всмоктування вуглеводів, захворюванням нирок, яке супроводжується зниженням ниркового порога для глюкози.

Підвищення вмісту глюкози у крові називається *гіперглікемією*. Короткочасна гіперглікемія може відзначатися за фізіологічних умов і за своєю основою є пристосувальною реакцією, яка забезпечує доставку в тканини енергетичного матеріалу. Тривала гіперглікемія зі значним підвищенням концентрації глюкози зазвичай характерна при різних патологічних процесах, може мати негативні наслідки у зв'язку з можливістю ураження інсулярного апарата і супроводжується *глюкозурією*. У всіх випадках гіперглікемія – це переважання

швидкості надходження глюкози у кров над швидкістю її утилізації.

Фізіологічні гіперглікемії спостерігаються при емоційних стресах, споживанні великої кількості вуглеводів з їжею. *Патологічні* гіперглікемії найчастіше пов'язані із захворюваннями ендокринної системи, а також з важкими розладами функції печінки та ураженнями центральної нервової системи. *Транзиторна* гіперглікемія може розвинути при застосуванні з лікувальною метою нікотинової кислоти, епінефрину, тиреоїдних гормонів, глюкокортикоїдів, кофеїну, деяких видів наркозу (ефірного, хлороформного, з галогеновмісними речовинами), морфіну. Причиною гіперглікемії у цих випадках може бути посилення процесів ліполізу, глюконеогенезу та глікогенолізу.

Методи кількісного визначення глюкози в біологічних рідинах умовно можна поділити на три групи: *редуктометричні*, які ґрунтуються на реакції окислення глюкози (методи Хагедорна-Йнсена, Крицеліуса-Зейферта); методи, які базуються на *конденсації глюкози з певними речовинами* (ортотолуїдиновий) і *ферментативні* (глюкозооксидазний).

Матеріали дослідження та реактиви: сеча, сироватка крові, 10 ммоль/л розчин глюкози, буферний розчин, розчин ензимів, порошок CuSO_4 , Na_2CO_3 , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (цитрату натрію), реактив Бенедикта.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, ФЕК.

1 . Виявлення глюкози у сечі

Поява глюкози у сечі спостерігається під час підвищення в крові її концентрації понад 10 ммоль/л і називається *глюкозурією*.

Глюкозурія може бути фізіологічною (аліментарною – при стресах, у вагітних) і супроводжувати захворювання ендокринних залоз (цукровий діабет, гострий панкреатит,

гіпертиреозидизм), нирок (порушення процесу реабсорбції), отруєння морфіном, хлороформом, фосфором.

У клінічно-лабораторній діагностиці визначення глюкози в сечі проводять із реактивом Бенедикта – розчином, який містить сульфат купруму, лимонну кислоту і натрію карбонат. Реактив Бенедикта застосовують для виявлення вуглеводів із відновлювальними властивостями, які містять вільну альдегідну групу або можуть її утворювати внаслідок ізомеризації у лужному середовищі, при цьому альдегідні групи окислюються, а катіони міді відновлюються. За участю реактиву Бенедикта утворюються гідратовані оксиди, тому продукт реакції не завжди має червоне забарвлення: він може бути також жовтим або зеленим.

Унаслідок кип'ятіння сечі з реактивом Бенедикта з наявністю в ній глюкози зменшується інтенсивність блакитного забарвлення сульфату купруму, змінюється колір розчину та випадає забарвлений осад. Колір та осад розчину – індикатори рівня глюкози в сечі. Синій колір без осаду вказує на відсутність глюкози, тоді як зміна кольору – від зеленого з жовтим осадом до насиченого помаранчевого або червоного – залежить від кількості глюкози в розчині.

Синій колір означає, що глюкози немає, жовто-зелений – глюкози не більш, як 0,5 %, зелений – не більш, як 1 %, коричнево-червоний – до 2 %, інтенсивно червоний – понад 2 %.

Варіант 1

1.1. У ступці розітріть на дрібний порошок 1 г CuSO_4 , 10 г Na_2CO_3 і 17 г цитрату натрію.

1.2. На предметне скло насипте невелику кількість порошку і нанесіть 2–3 краплі сечі. Підігрійте до кипіння.

1.3. Проаналізуйте утворене забарвлення та зробіть відповідні висновки.

Варіант 2

1.1. У пробірку додайте 3 мл реактиву Бенедикта.

1.2. До внесеного реактиву додайте 5 крапель сечі. Підігрійте до кипіння.

1.3. Проаналізуйте утворене забарвлення та зробіть відповідні висновки.

2. Визначення глюкози в сечі за допомогою індикаторних смужок «Глюкотест»

Висновок про вміст глюкози роблять за зміною забарвлення барвника нанесеного на індикаторну смужку, яке порівнюють із кольоровою шкалою.

«Глюкотест» – це смужка паперу, насичена розчином ферментів (глюкозооксидазою і пероксидазою), о-толідином, цитратним буфером, желатином та жовтим барвником аураміном, який змінює забарвлення від жовтого до темно-синього залежно від вмісту глюкози в сечі.

2.1. Смужку «Глюкотесту» змочить у свіжозібраній сечі та залишіть на 2 хв для розвитку забарвлення.

2.2. Після цього проведіть візуальну оцінку порівнянням забарвлення тест-смужки з кольоровою шкалою. За відсутності глюкози в сечі колір тест-смужки не змінюється.

2.3. Поясніть результати досліду та запишіть висновок.

3. Кількісне визначення глюкози в плазмі крові глюкозооксидазним методом

Для визначення вмісту глюкози використовують дві спряжені ензиматичні реакції. Перша реакція специфічна: глюкоза за участю ферменту глюкозооксидази окислюється киснем повітря до глюконової кислоти. Продуктом неповного відновлення кисню в цій реакції є пероксид водню, який використовується для наступної реакції за участю пероксидази.

Другий етап методу неспецифічний: за дії утвореного H_2O_2 та пероксидази фенол конденсується з 4-амінофеназоном з утворенням сполуки – хіноніміну червоно-фіолетового забарвлення, інтенсивність якого вимірюють фотометрично при довжині хвилі 500–550 нм.

3.1. У пробірку № 1 налейте 0,02 мл сироватки крові (дослідна проба), в пробірку № 2 – 0,02 мл калібрувального

розчину глюкози (калібрувальна проба), в пробірку № 3 – 0,02 мл фізіологічного розчину (контрольна проба).

3.2. У три пробірки додайте по 1 мл буферного розчину і 1 мл стандартного розчину ензимів.

3.3. Уміст пробірок перемішайте і витримайте 20 хв за кімнатної температури або 12 хв за температури 37 °С.

3.4. Виміряйте екстинкцію калібрувальної ($E_{\text{кал}}$) та дослідної проб ($E_{\text{досл}}$) щодо контрольної. Забарвлення стабільне протягом 60 хв.

3.5. Розрахуйте концентрацію глюкози у сироватці крові за формулою:

$$C = E_{\text{досл.}}/E_{\text{кал.}} \cdot K \cdot 10, \text{ де}$$

C – концентрація глюкози в дослідній пробі, ммоль/л;

10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині, ммоль/л;

$E_{\text{досл.}}$ – екстинкція дослідної проби;

$E_{\text{кал.}}$ – екстинкція калібрувальної проби;

K – коефіцієнт розведення.

4. Дослідження впливу інсуліну та адреналіну на вміст глюкози в плазмі крові

Адреналін підвищує рівень глюкози в крові, оскільки активує розпад глікогену (глікогеноліз) в печінці.

Інсулін знижує вміст глюкози в крові, адже сприяє проникненню глюкози через плазматичні мембрани всередину клітин та стимулює її окислення.

Для дослідження впливу цих гормонів на вміст глюкози в крові експериментальним тваринам вводять адреналін та інсулін. Студентам пропонуються такі дослідні проби плазми крові: до та після введення адреналіну, до та після введення інсуліну.

4.1. Введення адреналіну та інсуліну в організм щурів і забір крові до і після введення гормонів

У двох щурів натще лаборант проводить забір крові. Одному зі щурів вводять адреналін (50 мг/кг маси тіла, підшкірно), а

іншому – інсулін (1,5 МО/кг маси тіла, підшкірно). Через 30 хвилин після введення гормонів повторно проводять забір крові.

4.2. Визначення глюкози в сироватці крові глюкозооксидазним методом до та після введення адреналіну та інсуліну

4.2.1. Проведіть визначення концентрації глюкози у вказаних зразках глюкозооксидазним методом та розрахуйте вміст глюкози у кожній пробі.

	До введення адреналіну	Після введення адреналіну	До введення інсуліну	Після введення інсуліну
Екстинкція				
Концентрація глюкози, ммоль				
Висновок				

4.3. Заповніть таблицю, гормони якої хімічної природи беруть участь у регуляції метаболізму вуглеводів та вкажіть місце їх синтезу.

Гормон	Місце синтезу	Хімічна природа	Вплив на обмін вуглеводів	Вплив на концентрацію глюкози у крові
Інсулін				
Адреналін				

Контрольні запитання

1. Поясніть механізми підтримання постійного рівня глюкози у крові.
2. Яке діагностичне значення має визначення вмісту глюкози в крові? Чи завжди гіперглікемія свідчить про патологію в організмі?

3. Які причини розвитку гіперглікемії? Її види.
4. Поясніть відмінності між термінами «гіпоглікемія» та «гіперглікемія».
5. Який вміст глюкози у крові відповідає фізіологічній нормі?
6. За яких умов в сечі можлива поява глюкози?
7. Які методи кількісного визначення глюкози в біологічних рідинах вам відомі?
8. Які переваги ензиматичного методу визначення глюкози?
9. Поясніть принцип глюкозооксидазного методу визначення концентрації глюкози в плазмі крові.
10. Обґрунтуйте визначення вмісту глюкози в сечі з реактивом Бенедикта.
11. Який вміст глюкози в сечі у здорових людей?
12. За яких умов можлива поява глюкози в сечі?
13. Поясніть принцип методу визначення вмісту глюкози в сечі за допомогою індикаторних смужок «Глюкотесту».

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПІРУВАТУ ТА ЛАКТАТУ В КРОВІ ТА СЕЧІ

Піровиноградна кислота (ПВК) – один із центральних метаболітів вуглеводного обміну. Вона утворюється у процесі розпаду глюкози у тканинах, при окисленні (дегідруванні) молочної кислоти, а також внаслідок перетворення низки амінокислот. При окислювальному 118ктивності118товано ПВК утворюється ацетил-КоА, який вступає в цикл Кребса.

Визначення кількості пірувату в сироватці крові та сечі широко використовується з діагностичною метою в клінічній практиці. У нормі у плазмі крові міститься 90–170 мкмоль/л пірувату, а з сечею за добу виділяється до 200 мг. Найрізкіше підвищення концентрації пірувату в крові (разом із молочною кислотою) спостерігається під час м'язової роботи та В₁-вітамінної недостатності. Під час великих фізичних навантажень кількість ПВК у крові може підвищитися до 570 мкмоль/л, виділення її з сечею також підвищується. Окрім того, це явище спостерігається при захворюваннях паренхіми печінки, цукровому діабеті, токсикозі тощо.

Усі чинники підвищення вмісту ПВК зазвичай зумовлюють паралельне зростання концентрації молочної кислоти.

Лактат утворюється в організмі внаслідок відновлення ПВК в анаеробних умовах (анаеробний гліколіз). Значна кількість молочної кислоти у людини утворюється в м'язах. Із м'язової тканини молочна кислота всмоктується у кров і надходить до печінки, де перетворюється на глюкозу. Значна частина лактату з крові поглинається міокардом і використовується ним як енергетичний матеріал. Кількість лактату значно підвищується при фізичних навантаженнях або в умовах гіпоксії, коли тканини не отримують необхідної кількості кисню. Якщо в тканинах накопичується велика кількість лактату, то відбувається зміна кислотно-основного балансу крові з розвитком *лактоацидозу*.

Підвищення концентрації молочної кислоти спостерігається при гіпоксичних станах організму, як-от: захворювання серцево-судинної і дихальної систем, крововтрати, анемії; ураження печінки (гепатити, гепатози, цироз); ниркова недостатність, злоякісні новоутворення, цукровий діабет; значні фізичні навантаження тощо.

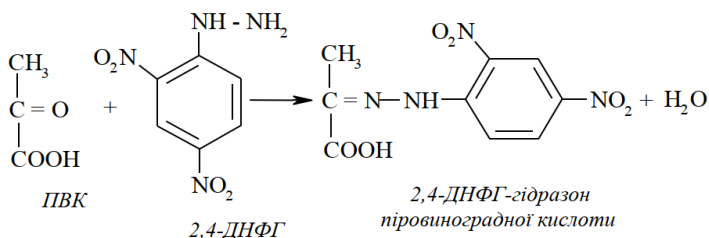
За змінами вмісту молочної кислоти у тканинах, крові та сечі визначають анаеробну частку енергетичного обміну, що є важливим критерієм у діагностиці захворювань, пов'язаних із гіпоксією (ішемія, інфаркт міокарда, міопатії).

Матеріали дослідження та реактиви: сеча, сироватка крові, стандартний розчин пірувату (6,25 мг/мл), 1 %-й 2,4-динітрофенілгідразин, 2,5 %-й спиртовий розчин КОН, 1 %-й розчин фенолу, 1 %-й розчин феруму (III) хлориду, стандартний розчин літію лактату (100 мг/мл), дистильована вода.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, ФЕК.

1. Кількісне визачення пірувату в сироватці крові та сечі методом Умбрайта

Піруват з 2,4-динітрофенілгідразином утворює забарвлену сполуку – 2,4-динітрофенілгідразонпіруват. У лужному середовищі з наявністю спиртового розчину лугу спостерігається поява коричнево-червоного забарвлення, інтенсивність якого прямо пропорційна кількості ПВК і визначається колориметрично. Даним методом можна визначати ПВК в сироватці крові або сечі.



1.1. В одну пробірку додайте 0,1 мл сечі (0,1 мл сироватки крові), у другу – 0,1 мл стандартного розчину пірвіноградної кислоти.

1.2. Потім в обидві пробірки внесіть по 0,9 мл дистильованої води.

1.3. Контрольна проба готується як дослідна, але замість сечі чи сироватки крові необхідно додати 1 мл води.

1.4. Через 1 хв до кожної пробірки додайте 1 мл 0,1 %-го розчину 2,4-динітрофенілгідразину та 1 мл 2,5 %-го спиртового розчину КОН.

1.5. Вміст всіх пробірок ретельно перемішайте та через 15 хв фотометруйте щодо контролю при довжині хвилі 400–415 нм на ФЕКУ.

1.6. Вміст ПВК *в сироватці крові* розрахуйте за формулою:

$$C = E_{\text{досл.}} / E_{\text{ст.}} \cdot 7, \text{ де}$$

C – концентрація пірвату в сироватці крові,

$E_{\text{досл.}}$ – екстинкція дослідної проби,

$E_{\text{ст.}}$ – екстинкція стандартної проби,

7 – концентрація стандарту пірвіноградної кислоти, ммоль/л.

1.7. Вміст ПВК *у сечі* розрахуйте за формулою:

$$C = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{досл.}} \cdot V}{E_{\text{ст.}} \cdot a \cdot 1000}, \text{ де}$$

C – концентрація пірвіноградної кислоти у сечі, мг/добу;

$C_{\text{ст.}}$ – концентрація стандартного розчину пірвіноградної кислоти;

$E_{\text{досл.}}$ – екстинкція дослідної проби;

$E_{\text{ст.}}$ – екстинкція стандартної проби;

V – добова кількість сечі (1500 мл);

a – 0,1 мл сечі, взятої для аналізу.

2. Визначення вмісту лактату в сироватці крові методом Уфельмана

Принцип методу ґрунтується на тому, що феруму фенолят (реактив Уфельмана) при взаємодії з молочною кислотою утворює ферум лактат жовто-зеленого кольору, інтенсивність якого пропорційна вмісту молочної кислоти і визначається колориметрично.

Вміст молочної кислоти у крові здорових людей складає 0,56 – 2,2 ммоль/л (250 Од/л).

2.1. У три пробірки внесіть по 2 мл 1 %-го розчину фенолу і по краплях 1 %-й розчин феруму (III) хлориду до утворення фіолетового забарвлення.

2.2. Після цього в першу (дослідну) пробірку додайте 1 мл сироватки крові, у другу (стандартну) – 1 мл стандартного розчину лактату, у третю (контрольну) – 1 мл води.

2.3. Визначте екстинкцію стандартної та дослідної проб на ФЕК (синій світлофільтр) щодо контролю.

2.4. Розрахунок вмісту молочної кислоти проведіть за формулою:

$$C = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{досл.}}}{E_{\text{ст.}}}, \text{ де}$$

C – вміст молочної кислоти в дослідній пробі, ммоль/л,

$C_{\text{ст.}}$ – вміст молочної кислоти у стандартній пробі (1,11 ммоль/л);

$E_{\text{досл.}}$ – екстинкція дослідної проби;

$E_{\text{ст.}}$ – екстинкція стандартної проби.

Контрольні запитання

1. Назвіть основні методи визначення метаболітів обміну вуглеводів.
2. Запишіть схему утворення пірувату з глюкози.
3. Які існують способи перетворення ПВК в організмі?

4. Поясніть принцип методу визначення вмісту пірвіноградної кислоти в біоматеріалі.
5. З якою метою в лабораторній діагностиці проводять визначення вмісту пірвату та лактату в крові та сечі?
6. Які фізіологічні норми кількості пірвату та лактату в крові людей?
7. Як називається процес перетворення глюкози на лактату? Які його особливості й енергетичний баланс і ефект?
8. Поясніть принцип методу визначення вмісту лактату.

Тема 8. Обмін білків

Лабораторна робота 19

ЯКІСНЕ ВИЯВЛЕННЯ ПРОДУКТІВ ПЕРЕТВОРЕННЯ БІЛКІВ

Білки їжі, які потрапляють в організм, підлягають низці перетворень:

- ✓ у шлунку за дії пепсину протеїни розщеплюються до високомолекулярних поліпептидів – пептонів;
- ✓ у дванадцятипалій кишці за участю трипсину та хімотрипсину (так званий триптичний гідроліз) пептони гідролізуються до амінокислот та поліпептидів з коротшим ланцюгом;
- ✓ у тонкому кишечнику під дією пептидаз (амінопептидаз, карбоксипептидаз і дипептидаз) поліпептиди розщеплюються до вільних амінокислот. Амінокислоти всмоктуються у кров, розносяться до тканин організму, де відбуваються їх біохімічні, перетворення;
- ✓ у товстому кишечнику залишки пептидів та амінокислот, які не всмокталися у кров, за дії ферментів мікрофлори дезамінуються або декарбоксілюються, перетворюючись в токсичні для організму речовини (індол, фенол тощо). Знешкодження їх відбувається в печінці.

Матеріали дослідження та реактиви: сеча, пепсин, 10 %-й NaNO_3 , 10 %-а HCl , 5 %-й нітропрусид натрію, 10 %-й NaOH , 50 %-а оцтова кислота, насичений розчин Ca(OH)_2 , 1 %-й спиртовий розчин I_2 , 10 %-й оцтовокислий цинк у 96 %-му спирті, 15 %-й BaCl_2 , 25 %-а ТХО, 10 %-й FeCl_3 , насичений розчин CuSO_4 , хлороформ, концентрована HCl , HNO_3 , H_2SO_4 , 2 %-й KMnO_4 .

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки.

1. Розщеплення харчового білка пепсином

Пепсин – протеолітичний ензим, який секретується головними клітинами слизової оболонки шлунку у вигляді пепсиногену. Хлоридна кислота сприяє перетворенню проферменту пепсиногену на активний пепсин. Оптимальне рН дії пепсину перебуває в межах 1,5–2,5, що відповідає кислотності шлункового соку в процесі травлення. Даний ензим каталізує розщеплення пептидних зв'язків у молекулі білка, утворених аміногрупами ароматичних чи дикарбонових амінокислот.

Біуретова реакція позитивна з білками і пептидами, які мають не менш як два пептидні зв'язки. Так, фіолетове забарвлення утворюють розчини білків, а продукти їх неповного гідролізу – червоне або рожеве забарвлення.

1.1. У дві пробірки внесіть по 1 мл 10 %-го розчину яєчного білка.

1.2. У контрольну пробірку внесіть 1 мл дистильованої води, у дослідну – 1 мл ферментного препарату. Пробірки поставте на 20 хв на водяну баню при 38 °С.

1.3. Після інкубації із вмістом пробірок проведіть біуретову реакцію.

1.4. За результатами спостережень сформулюйте висновки.

2. Проба Розіна на жовчеві пігменти в сечі

Жовчеві пігменти – білірубін, білівердин, уробілін та інші утворюються з гемоглобіну під час розпаду еритроцитів.

Спочатку в молекулі гемоглобіну розривається метеновий місток і одночасно окислюється двовалентне залізо на тривалентне. Внаслідок цього утворюється пігмент зеленого кольору **вердоглобін**, побудований із глобіну, розірваної системи 124ктивності124тов кільця та тривалентного заліза. Подальше перетворення супроводжується втратою вердоглобіном заліза і глобіну, в результаті чого порфіринове кільце розгортається у ланцюг і формується низькомолекулярний жовчевий пігмент зеленого кольору – **білівердин**. Білівердин відновлюється ферментативним

способом у червоно-жовтий пігмент жовчі – **білірубін**. Основне місце утворення білірубіну – печінка, селезінка. Утворений білірубін разом із жовчю потрапляє у жовчевий міхур. Розрізняють вільний, або *непрямий білірубін*, і *прямий білірубін*. Непрямий білірубін у печінці знешкоджується зв'язуванням із 2 залишками глюкуронової кислоти, утворюючи білірубін-диглюкуронід, добре розчинний у воді.

Подальша доля білірубіну пов'язана з його перетворенням у кишечнику за дії бактерій. Спочатку глюкуронова кислота відщеплюється від комплексу з білірубіном і вивільнений білірубін відновлюється до стеркобіліногену, який виводиться з кишечнику. Останній легко окислюється за дії світла і повітря до стеркобіліну (уробілін).

Поява жовчевих пігментів у сечі може спостерігатися під час механічного пошкодження відтоку жовчі й ураженнях печінки (гепатити, цирози), захворюваннях кишечнику (ентерити, кишкова непрохідність). *Білірубінурія* спостерігається під час паренхіматозної та обтураційної жовтяниці.

Метод базується на перетворенні білірубіну на білівердин зеленого кольору за дії йоду.

2.1. У пробірку внесіть 5 мл сечі та обережно нашаруйте 1 %-й спиртовий розчин йоду.

2.2. Спостерігайте за появою на межі двох рідин кільця зеленого кольору у разі, якщо в сечі наявний білірубін.

3. Проба Гмеліна на жовчеві пігменти в сечі

Метод ґрунтується на здатності білірубіну в сечі при взаємодії з концентрованою HNO_3 окислюватися з утворенням на межі поділу рідин (кислота – сеча) забарвлених кілець: зеленого – білівердин, синьо-фіолетового – біліціанін, від червоного до жовтого – холетеліни.

3.1. У пробірку внесіть 1 мл концентрованої нітратної кислоти й обережно по стінці нашаруйте рівний об'єм сечі.

3.2. За наявності в сечі білірубіну на межі рідин з'являється кільце яскраво-зеленого кольору. При подальшому окисленні

зелений колір кільця переходить у фіолетовий біліціанін) або жовтий (холетелін), що відповідає різним ступеням окислення білірубіну.

4. Проба Богомолова

Метод базується на здатності уробіліну утворювати з сульфатом купруму сполуку рожево-червоного кольору.

4.1. Пробу проводьте у прозорій сечі. Якщо сеча мутна, то її необхідно відфільтрувати.

4.2. У пробірку налейте 10 мл сечі та додайте 1 мл насиченого розчину сульфату міді. Якщо з'явиться помутніння, то додайте 3-4 краплі концентрованої HCl для просвітління. Залишіть на 5 хв.

4.3. Додайте 2 мл хлороформу. Вміст пробірки перемішайте і дайте відстоятись. У нижньому шарі знаходиться хлороформ, який за наявності великої кількості уробіліну забарвлюється в рожевий колір. При нормальному вмісті уробіліну в сечі проба негативна.

5. Якісна реакція на індикан (проба Яффе)

У кишечнику під впливом різних бактерій відбувається перетворення амінокислот з утворенням отруйних для організму продуктів (індол, скатол та ін.), деякі всмоктуються у кров і знешкоджуються в печінці через утворення нетоксичних речовин (сірчаних і глюкуронових кислот).

Індикан – це калієві або натрієві солі індоксилсірчаної кислоти. В нормі за добу із сечею виділяється 0,01 г індикану. Підвищення вмісту індикану спостерігається під час гниття білкових речовин у кишечнику, зниженій кислотності шлункового соку, закрепах, посиленому розпаді білків у організмі (пухлини, абсцеси).

За дії на сечу концентрованої сульфатної кислоти відбувається гідроліз індоксилсірчаної кислоти. Під час додавання хлороформу і кількох крапель розчину KmO_4 індоксил окислюється у синє індиго. Утворене синє індиго переходить у хлороформний шар і забарвлює його у синій колір.

Інтенсивність отриманого забарвлення слугує показником кількості індикану в досліджуваній сечі.

5.1. У пробірку налийте 2 мл сечі та додайте при перемішуванні рівний об'єм концентрованої сульфатної кислоти.

5.2. Додайте 1 мл хлороформу та 3 краплі 2 %-го KMnO_4 . Пробірку закрийте корком і кілька разів переверніть, не стряхуючи.

5.3. За наявності індикану хлороформ забарвлюється в блакитний, синій або рожевий колір.

Контрольні запитання

1. Яка кількість сечовини виділяється з сечею за добу в нормі?
2. Від яких факторів залежить рівень сечовини в сечі?
3. Яка кількість креатиніну виділяється в нормі за добу і від яких факторів залежить вміст креатиніну у сечі?
4. На чому базується метод виявлення креатиніну?
5. За яких умов спостерігається поява жовчєвих пігментів у сечі?
6. Що таке індикан? Опишіть можливі шляхи утворення індикану в людини.
7. Охарактеризуйте принцип методу виявлення індикану.
8. З якою метою проводять визначення продуктів обміну білків у клініці?

ЯКІСНЕ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОДУКТІВ АЗОТИСТОГО ОБМІНУ

Враховуючи те, що білки є азотовмісними сполуками, важливою характеристикою стану білкового обміну є азотистий баланс – показник, який дає уяву про відношення між вмістом азоту, який надходить до організму, та кількістю азоту, який виділяється у складі кінцевих продуктів обміну.

Сума всіх азотовмісних сполук, які виділяються зі сечею у процесі обміну, складає загальний азот сечі. Цей показник включає: азот сечовини (80–90 % загального азоту), аміаку (біля 5 % загального азоту), креатиніну (2–7 % загального азоту), сечової кислоти (1,6 % загального азоту), гіпурової кислоти (0,5 % загального азоту), індикану, парних глюкуронових кислот (1–3 % загального азоту).

За добу зі сечею виділяється 10–20 г загального азоту, основну частину якого становить азот сечовини.

Визначення вмісту загального азоту сечі та окремих його складових має важливе значення для оцінки стану білкового обміну в організмі, а також функціонування внутрішніх органів – печінки, нирок тощо.

Матеріали дослідження та реактиви: сеча, 10 %-й NaNO_3 , 10 %-а HCl , 5 %-й нітропрусид натрію, 10 %-й NaOH , 50 %-а оцтова кислота, насичений розчин Ca(OH)_2 , 0,1 %-й розчин фенолфталеїну, 0,1 н розчин натрію гідроксиду, свіжонеїтралізований 20 %-й розчин формальдегіду.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, піпетки, ФЕК.

I. Якісне виявлення продуктів азотистого обміну

1. Якісна реакція на сечовину

Сечовина утворюється в печінці внаслідок знешкодження аміаку й екскретується з організму нирками. За добу із сечею

дорослої людини виділяється 25–30 мг сечовини, що становить 85–93 % загальної кількості азоту сечі.

Кількість сечовини залежить від вмісту білків у їжі, інтенсивності їх розпаду в організмі. Під час захворювань печінки, нирок, а також під час білкового голодування кількість сечовини у сечі знижується.

При посиленому білковому харчуванні, а також при інтенсифікації розпаду білків у тканинах, кількість сечовини у сечі зростає.

Метод ґрунтується на утворенні вуглекислого натрію та азоту за дії нітрату натрію із виділенням дрібних бульбашок.

1.1. До 2 мл сечі додайте таку ж кількість 10 %-го розчину NaNO_3 і 2–3 краплі 10 %-го розчину HCl .

1.2. Спостерігайте за виділенням вуглекислого натрію та азоту.

2. Якісна реакція на креатинін у сечі (реакція Вейля)

Креатинін – кінцевий продукт азотистого обміну і є постійною складовою сечі.

За добу із сечею виділяється в середньому 0,5–2 г креатиніну. Ця кількість пропорційна ступеню розвитку скелетних м'язів і вмісту в них фосфокреатиніну, а також кількості креатиніну в м'ясній їжі.

Підвищення виділення креатиніну спостерігається під час інтенсивної м'язової діяльності, ниркової недостатності, кишкової непрохідності, закупорки сечових шляхів, гіперфункції надниркових залоз тощо.

Зниження виділення креатиніну з сечею спостерігається під час голодування, паралічу, анемії, лейкозу, хронічних захворюваннях нирок та ін.

Принцип методу базується на тому, що креатинін з нітропрусидом натрію за наявності лугу утворює ізонітрозокреатинін червоного кольору, але сполука нестійка – червоне забарвлення швидко переходить у жовте.

2.1. До 10 крапель сечі додайте 2 краплі 5 %-го свіжоприготовленого розчину нітропрусиду натрію і 4 краплі 10 %-го розчину NaOH.

2.2. Спостерігайте за появою червоного забарвлення, яке при підкисленні оцтовою кислотою переходить у жовте.

3. Виявлення амонійних солей

Аміак, який утворюється в клітинах різних органів і тканин у вільному стані не може переноситися кров'ю до печінки або до нирок, зважаючи на його високу токсичність. Він транспортується переважно у вигляді глутаміну та аспарагіну. У вигляді глутаміну аміак переноситься в печінку або нирки, де розщеплюється до аміаку та глутамату за дії глутамінази.

Основний орган, де відбувається знешкодження аміаку, – печінка. У гепатоцитах до 90 % утвореного аміаку перетворюється на сечовину, яка з током крові надходить із печінки в нирки, а потім виводиться зі сечею.

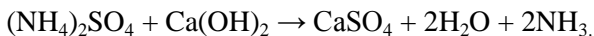
Незначна кількість аміаку в організмі (близько 1 г на добу) виводиться нирками зі сечею у вигляді амонійних солей у концентрації 30–60 ммоль/добу. Під час ацидозу кількість амонійних солей у сечі збільшується, а при алкалозі – знижується.

Принцип методу ґрунтується на утворенні вільного аміаку при додаванні до сечі насиченого розчину кальцію гідроксиду, наявність аміаку можна виявити за допомогою лакмусового папірця.

3.1. До 2 мл сечі додайте 1 мл насиченого розчину гідроксиду кальцію. Вміст пробірки перемішайте.

3.2. До отвору пробірки піднесіть смужку індикаторного паперу, попередньо змочену водою.

3.3. Спостерігайте посиніння індикаторного паперу внаслідок виділення аміаку згідно з реакцією:



II. Кількісне визначення продуктів азотистого обміну

4. Визначення вмісту азоту аміаку в сечі

У добовій сечі здорової людини міститься 0,5–1 г аміаку або його екскреція зі сечею дорівнює 30–60 ммоль/добу.

Принцип методу ґрунтується на тому, що при взаємодії амонійних солей із формальдегідом утворюється гексаметилентетраамін (уротропін) та звільняється еквівалентна кількість відповідних кислот, які відтитровують лугом.

4.1. У конічну колбу внесіть 10 мл сечі, додайте 1–2 краплі фенолфталеїну та нейтралізуйте 0,1 н розчином натрію гідроксиду до появи рожевого забарвлення.

4.2. Після цього додайте рівний об'єм свіжонейтралізованого розчину формальдегіду (реакція середовища змінюється і червоний колір індикатора зникає).

4.3. Вміст колби відтитруйте 0,1 н розчином натрію гідроксиду до появи стійкого рожевого забарвлення.

4.4. За кількістю натрію гідроксиду, використаного на титрування, визначають кількість аміаку в 10 мл сечі, враховуючи те, що 1 мл 0,1 н NaOH еквівалентний вмісту 1,7 мг аміаку. Після цього обчислюють яка кількість аміаку виділяється зі сечею за добу (добовий діурез – 1500 мл).

4.5. Проведіть розрахунки та зробіть відповідні висновки.

5. Визначення концентрації сечовини у біологічних рідинах уреазним методом

Сечовина піддається уреазному гідролізу з утворенням аміаку та вуглекислого газу. Аміак, який виділився, реагує з гіпохлоритом і саліциловою кислотою з утворенням розчину зеленого кольору. Збільшення екстинкції реакційного розчину при 560–580 нм прямо пропорційно концентрації сечовини в зразку.

Уміст сечовини у сечі за фізіологічних умов, визначеної уреазним методом, становить до 330–580 ммоль/л.

5.1. Перед початком роботи сечу розведіть в 100 разів дистильованою водою.

5.2. Візьміть три пробірки: в одну (дослідну) внесіть 0,01 мл сечі, у другу (калібрувальну) – 0,01 мл стандартного розчину сечовини, у третю (контрольну) – 0,01 мл дистильованої води.

5.3. В кожну пробірку додайте по 1 мл ензимного реагенту та ретельно перемішайте.

5.4. Пробірки на 5 хв помістіть на водяну баню при температурі 38 °С.

5.5. Після інкубації до вмісту всіх пробірок додайте по 1 мл гіпохлоритного реагенту.

5.6. Усі пробірки знову інкубуйте протягом 5 хв при температурі 38 °С. Виміряйте екстинкцію дослідної ($E_{\text{досл}}$) і калібрувальної проб ($E_{\text{кал}}$) відносно холостої проби.

5.7. Розрахунок кількості сечовини в сечі проведіть за формулою:

$$C = E_{\text{досл}} / E_{\text{кал}} \times 1000, \text{ де}$$

C – концентрація сечовини в сечі, ммоль/л,

$E_{\text{досл}}$ – екстинкція дослідної проби,

$E_{\text{кал}}$ – екстинкція калібрувальної проби,

1000 – коефіцієнт перерахунку кількості сечовини в ммоль/л.

6. Визначення вмісту креатиніну в сечі за реакцією Яффе

Принцип методу ґрунтується на тому, що креатинін при взаємодії з пікриновою кислотою в лужному середовищі утворює креатиніну пікрат оранжевого кольору.

6.1. Підготуйте три конічні колби на 100 мл.

6.2. У першу (дослідну) колбу внесіть 0,5 мл сечі, у другу (стандартну) – 0,5 мл основного стандартного розчину креатиніну.

6.3. У кожну колбу додайте по 3 мл насиченого розчину пікринової кислоти, ретельно перемішайте, додайте по 0,2 мл 10 %-го розчину натрію гідроксиду і знову перемішайте.

6.4. У третю (контрольну) колбу внесіть 3 мл насиченого розчину пікринової кислоти та 0,2 мл 10 %-го розчину натрію гідроксиду.

6.5. Через 10 хв загальний об'єм у колбах доведіть дистильованою водою до позначки. Визначте екстинкцію стандартної і дослідної проб на ФЕКу (зелений світлофільтр, 500–560 нм) відносно контролю.

6.6. Розрахунок вмісту креатиніну в сечі проведіть за формулою:

$$C = \frac{C_{\text{ст.}} \cdot E_{\text{досл.}} \cdot D}{E_{\text{ст.}} \cdot a \cdot 1000} \quad , \text{ де}$$

C – вміст креатиніну в добовому об'ємі сечі;

C_{ст.} – вміст креатиніну у стандартній пробі (100 мг% або 8,8 ммоль/л);

E_{досл.} – екстинкція дослідної проби;

E_{ст.} – екстинкція стандартної проби;

D – добовий об'єм сечі, мл;

a – об'єм сечі, взятої для аналізу (0,5 мл);

1000 – коефіцієнт перерахунку міліграмів у грами.

Контрольні запитання

1. Яка кількість сечовини виділяється зі сечею за добу в нормі?
2. Від яких факторів залежить рівень сечовини в сечі?
3. Яка кількість креатиніну виділяється в нормі за добу і від яких факторів залежить вміст креатиніну у сечі?
4. На чому базується метод виявлення креатиніну?
5. З якою метою визначають продукти обміну білків у клініці?
6. Охарактеризуйте принцип кількісного визначення сечовини уреазним методом.
7. Яка біологічна роль креатиніну?
8. Охарактеризуйте принцип методу кількісного визначення вмісту креатиніну в сечі?
9. Як відбувається обмінна реакція між креатином та АТФ?
10. Яке діагностичне значення має визначення концентрації сечовини та креатиніну в сечі?

Тема 9. Обмін ліпідів

Лабораторна робота 20

ЕНЗИМАТИЧНИЙ ГІДРОЛІЗ ЛІПІДІВ

Травлення ліпідів відбувається в основному в кишечнику за дії панкреатичної ліпази, оскільки в шлунку ліпаза малоактивна і діє лише на емульговані ліпіди. Основний емульгатор ліпідів жовч. Оскільки жовч емульгує жири, при додаванні жовчі ліпаза активується, внаслідок чого гідроліз ліпідів відбувається з більшою швидкістю.

Матеріали дослідження та реактиви: молоко, суспензія лецитину, 5 %-й розчин панкреатину, 0,5 %-й фенолфталеїн, 0,05 н NaOH, молібденовий реактив.

Посуд і обладнання: пробірки, штативи, бюретки, водяна баня.

1. Дослідження активності панкреатичної ліпази

Гідроліз ліпідів найзручніше спостерігати на прикладі витяжки з підшлункової залози (джерело ліпази) і молока як субстрату, ліпіди якого перебувають в емульгованому стані та швидко розщеплюються на гліцерол і жирні кислоти. Якщо в пробу додати жовч, то ліпаза активується і гідроліз жиру відбувається швидше.

Активність ліпази у окремих порціях молока визначається за кількістю жирних кислот, які утворюються при гідролізі жиру молока за певний період часу. Кількість жирних кислот визначають титруванням лугом за наявності фенолфталеїну.

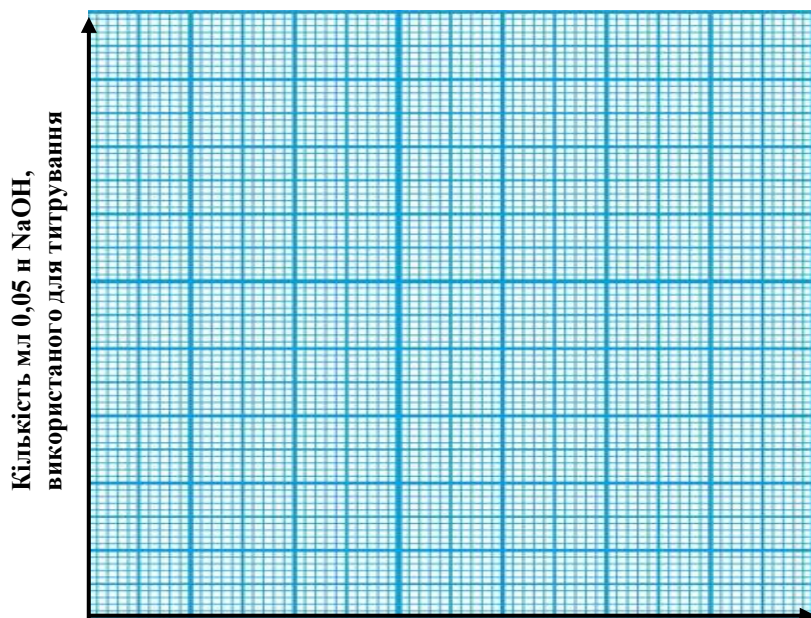
1.1. У дві пробірки внесіть по 5 мл молока і по 1 мл 5 %-го розчину панкреатину.

1.2. У одну пробірку додайте 1 мл води, а у другу – 1 мл жовчі. Вміст пробірок ретельно перемішайте.

1.3. З кожної пробірки відберіть по 1 мл суміші у колбу, додайте 1–2 краплі 0,5 %-го розчину фенолфталеїну та титруйте 0,05 н NaOH до появи слабкорозового забарвлення, стійкого протягом 30 с.

1.4. Обидві пробірки поставте на водяну баню при 38 °С. Через кожні 10 хв з пробірок відбирайте по 1 мл суміші та титруйте 0,05 н NaOH за наявності фенолфталеїну до появи рожевого забарвлення. Проведіть 7 визначень.

1.5. На основі отриманих даних побудуйте дві криві, які відобразатимуть процес гідролізу жиру за дії панкреатичної ліпази у часі та залежно від наявності чи відсутності жовчі.



Сформулюйте висновки про умови роботи ліпази.

ХВ

2. Розщеплення лецитину фосфоліпазами підшлункової залози

Лецитини – це група складних ліпідів (фосфогліцеролів), до складу молекули яких входять гліцерол, два залишки вищих

жирних кислот та фосфатидилхолін. Гідроліз лецитину в організмі відбувається за дії фосфоліпаз. Є кілька видів фосфоліпази (A₁, A₂, C, D), які каталізують розщеплення певного певного складноефірного зв'язку в молекулі лецитину.

Принцип методу ґрунтується на тому, що неорганічний фосфат, який утворюється при гідролізі лецитину за участю фосфоліпаз, визначають за кольоровою реакцією з амонію молібдатом.

2.1. У дві пробірки внесіть по 2 мл 1 %-ї водної суспензії лецитину.

2.2. У першу (контрольну) додайте 1 мл дистильованої води, у другу (дослідну) – 1 мл 5 % розчину панкреатину.

2.3. Пробірки поставте в термостат на 30 хв при 38 °С. Після цього в кожен пробірку додайте по 2 мл молібденового реактиву і нагрійте до кипіння.

2.4. У дослідній пробірці з'являється жовтий осад, що зумовлено відщепленням залишку фосфорної кислоти.

2.3. Зробіть висновок за отриманими результатами.

Контрольні запитання

1. За дії якого ензиму відбувається травлення ліпідів у кишечнику?
2. Що виступає основним емульгатором ліпідів?
3. Охарактеризуйте принцип дослідження активності панкреатичної ліпази?
4. Пригадайте будову та функції лецитинів.
5. За участю якого ензиму в організмі відбувається гідроліз лецитинів?
6. Яка сполука утворюється під впливом фосфоліпази A₂? Запишіть її структурну формулу.
7. Чому отрути змії і скорпіонів виявляють гемолітичну дію?
8. Обґрунтуйте принцип методу розщеплення лецитину фосфоліпазами підшлункової залози.

ВИЯВЛЕННЯ КЕТОНОВИХ ТІЛ

Під терміном «кетоніві (ацетонові) тіла» розуміють ацетооцтову кислоту (ацетоацетат) $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2\text{-COOH}$, β -оксималярну кислоту (β -оксидутират або D-3-гидроксиутират) $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-COOH}$ і ацетон $\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$.

Кетоніві тіла відіграють роль у підтримці енергетичного балансу. Утворення кетонівих тіл – це один із багатьох шляхів перерозподілу енергетичних субстратів між периферійними тканинами. З печінки вони переходять у кров, транспортуються до скелетних м'язів, серця та інших тканин, де, окислюючись у циклі Кребса, використовуються як джерело енергії.

Печінка – виняток, вона не використовує кетоніві тіла як енергетичний матеріал, тоді як у серці вони забезпечують до 30 % енергетичних потреб.

У крові здорової людини кетоніві тіла містяться в незначних концентраціях (у сироватці крові 0,03–0,2 ммоль/л). Концентрація кетонівих тіл збільшується, коли швидкість їх утворення перевищує швидкість їх утилізації периферійними тканинами. Так, при патологічних станах (при голодуванні, у тварин з експериментальним гострим діабетом) концентрація кетонівих тіл у сироватці крові збільшується й може сягати 16–20 ммоль/л. Такий стан називається *кетонемією*. Супроводжується він *ацидозом* – закисненням внутрішнього середовища організму.

При збільшенні швидкості утворення кетонівих тіл у 20–30 разів порівняно з нормою вони можуть виводитися зі сечею. Такий стан називається *кетонурія*. Поява кетонівих тіл у сечі може бути діагностичним тестом при різних захворюваннях, наприклад цукровому діабеті.

Матеріали дослідження та реактиви: сеча, ацетон, 10 %-й NaOH, 1 %-й J_2 в 2 %-му KJ, 10 %-й FeCl_3 , 10 %-й нітропрусид натрію, концентрована CH_3COOH .

Посуд і обладнання: пробірки, штативи.

1. Реакція на утворення йодоформу (проба Лібена)

При додаванні розчину йоду до підлужненої сечі, яка містить ацетон, рідина мутніє внаслідок утворення йодоформу, що має специфічний запах:



Дана реакція неспецифічна, оскільки при взаємодії йоду з ацетальдегідом та етанолом також утворюється йодоформ.

1.1. У пробірку внесіть 10 крапель ацетону, 10 крапель 10 %-го розчину NaOH і кілька крапель розчину Люголя – 1 %-го розчину I₂ в 2 %-му розчині KI.

1.2. Спостерігайте появою жовтого осаду йодоформу, який має характерний запах.

1.3. Проведіть аналогічну реакцію з 2-3 мл сечі. При наявності ацетону в сечі спостерігається помутніння.

2. Реакція на ацетооцтову кислоту (реакція Герхарда)

Проба Герхардта ґрунтується на утворенні забарвленої сполуки, що виявляється при зв'язуванні енольної форми ацетооцтової кислоти із залізом. За наявності ацетооцтової кислоти в сечі розчин набуває червоного забарвлення.

2.1. У пробірку налейте 1 мл сечі, додайте 5–8 крапель 10 %-го FeCl₃.

2.2. Спостерігайте за появою вишнево-червоного забарвлення. Поступово забарвлення світлішає внаслідок самовільного декарбоксилювання ацетооцтової кислоти.

3. Проба Легалья на ацетон і ацетооцтову кислоту

Для якісного виявлення кетонів у сечі використовують кольорову реакцію, зумовлену взаємодією ацетооцтової кислоти та ацетону з нітропрусидом натрію в лужному середовищі. Нітропрусид натрію в 10 разів чутливіший до ацетооцтової кислоти, ніж до ацетону.

Нітропрусидна реакція не є специфічною для виявлення кетонів, вона відбувається і за наявності деяких постійних

складових частин сечі (наприклад, креатиніну). Тому додавання оцтової кислоти є специфічним для виявлення забарвлення.

3.1. В одну пробірку налейте 10 крапель сечі, а в другу – 10 крапель ацетону.

3.2. Додайте 2 краплі свіжоприготовленого розчину 10 %-го нітропрусиду натрію і 4 краплі 10 %-го розчину NaOH.

3.2. Спостерігайте за появою помаранчево-червого забарвлення.

3.3. Внести у пробірку 10 крапель концентрованого ацетату і спостерігати за зміною забарвлення. Спостереження порівняти.

Контрольні запитання

1. Що таке «кетоніві тіла» та яка їх біологічна роль?
2. Чи використовує печінка кетоніві тіла як енергетичний матеріал?
3. Дайте визначення поняттям «кетонемія» та «кетонурія».
4. За допомогою яких діагностичних тестів можна виявити наявність кетонівих тіл у сечі?
5. Поясніть поняття «ацетон сечі». Яке діагностичне значення проби Лібена на ацетон? Запишіть реакцію взаємодії ацетону з йодом.
6. Чим зумовлена поява кетонівих тіл у сечі?
7. Який уміст кетонівих тіл у сечі при цукровому діабеті?
8. Який наслідок для організму може мати значне підвищення вмісту кетонівих тіл у крові?

ЛІТЕРАТУРА

1. Биохимия. Краткий курс с упражнениями и задачами / под редакцией Е. С. Северина, А. Я. Николаева. М.:ГЭОТАР Мед., 2001. 448 с.
2. Біологічна хімія: лабораторний практикум / під заг. ред. Я. І. Гонського. Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. 288 с.
3. Біологічна хімія з біохімічними методами дослідження: підруч. / О. Я. Склярів, Н. В. Фартушок, Л. Д. Сойка, І. С. Смачило. Київ: Медицина, 2009. 352 с.
4. Бондарчук Т. І., Гринчишин Н. М., Кобилінська Л. І. та ін. Біологічна хімія: тести та ситуаційні задачі: навч. посібник / за ред. О. Я. Склярів. Київ: Медицина, 2010. 360 с.
5. Боєчко Ф. Ф., Боєчко Л. О., Шмиголь І. В. Лабораторний практикум з біохімії: навч.-метод. посібник. Черкаси: ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2012. 196 с.
6. Давыдов В. В., Швец В. Н. Руководство по практическим занятиям по биологической химии. Х.: ХНУ имени Каразина, 2011. 316 с.
7. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Москва: МЕДпресс-информ, 2004. 920 с.
8. Копильчук Г. П., Волощук О. М. Робочий зошит з біохімії. Чернівці: Чернівецький нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2016. 88 с.
9. Копильчук Г. П., Волощук О. М., Марченко М. М. Біохімія: навч. посібн. 2-е вид., перероб. і доп. Чернівці: Рута, 2008. 208 с.
10. Копильчук Г. П., Николайчук І. М. Біохімія: тест. завдання з лаб. практикуму: навч.-метод. посібник. Чернівці: Чернівецький нац. ун-т ім. Ю. Федьковича, 2019. 112 с.
11. Вороніна Л.М. та ін. Лабораторні та семінарські заняття з біологічної хімії. Х.: Вид-во НфаУ; Оригінал, 2004.-384с.
12. Остапченко Л. І. Біоорганічна хімія: практикум. Київ: Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, 2017. 409 с.
13. Рогожин В. В. Практикум по биохимии: учебн. пособ.

- Санкт-Петербург: Лань, 2013. 544 с.
14. Сафонова О. А., Макеева А. В., Попова Т. Н. Большой практикум по биохимии: учебн.-метод. пособие. Издательско-полиграф. центр Воронеж. государств. у-та, 2011. 108 с.
 15. Сенчук В. В., Мохорева С. И. Биохимия. Лабораторный практикум: учеб. пособие / Минск.: БГУ, 2004. 77 с.
 16. Сорокина И. А., Вечканов Е. М. Большой лабораторный практикум по биохимии. Часть 2. Биохимия белков и пептидов: учеб.-метод. пособие для вузов. Ростов-на-Дону: КОПИЦЕНТР, 2010. 96 с.
 17. Чиркин А.А. Практикум по биохимии. Минск.: Новое знание, 2002. 512 с.

ЗМІСТ

Передмова	3
Особливості роботи в біохімічній лабораторії та інструктаж із техніки безпеки.....	4
Міжнародна система одиниць (СІ) у біохімічній лабораторній практиці.....	7
РОЗДІЛ 1 СТАТИЧНА БІОХІМІЯ	10
СТРУКТУРА ТА ВЛАСТИВОСТІ БІОМОЛЕКУЛ	10
Тема 1. Білки	10
Лабораторна робота 1. Якісні реакції на амінокислоти та білки.....	10
Лабораторна робота 2. Визначення ступеню гідролізу протеїну методом формольного титрування.....	17
Лабораторна робота 3. Вивчення властивостей білків.....	22
Лабораторна робота 4. Визначення ізоелектричної точки білка.....	31
Лабораторна робота 5. Методи висолювання й очищення білків.....	34
Лабораторна робота 6. Кількісне визначення протеїнів.....	40
Лабораторна робота 7. Якісне та кількісне визначення білка в сечі.....	49
Тема 2. Ензими – біологічні каталізатори	55
Лабораторна робота 8. Вивчення властивостей ензимів.....	47
Лабораторна робота 9. Кількісне визначення активності α -амілази в біологічних рідинах методом Вольгемута.....	64
Лабораторна робота 10. Конкурентне гальмування малоновою кислотою сукцинатдегідрогенази м'язів.....	68
Тема 3. Вітаміни	70
Лабораторна робота 11. Якісне визначення вітамінів.....	70
Лабораторна робота 12. Кількісне визначення вітаміну С.....	84
Тема 4. Гормони – регулятори обміну речовин	88
Лабораторна робота 13. Якісне та кількісне визначення гормонів.....	88
Тема 5. Вуглеводи	97
Лабораторна робота 14. Виявлення вуглеводів у продуктах харчування.....	97
Тема 6. Ліпіди	108

Лабораторна робота 15. Якісне та кількісне визначення холестеролу.....	108
РОЗДІЛ 2 ДИНАМІЧНА БІОХІМІЯ	111
ОБМІН РЕЧОВИН	111
Тема 7. Обмін вуглеводів.....	111
Лабораторна робота 16. Кількісне визначення глюкози в крові та сечі.....	111
Лабораторна робота 17. Кількісне визначення пірувату та лактату в крові та сечі.....	118
Тема 8. Обмін білків.....	123
Лабораторна робота № 18. Якісне виявлення продуктів перетворення білків.....	123
Лабораторна робота 19. Якісне та кількісне визначення продуктів азотистого обміну.....	128
Тема 9. Обмін ліпідів.....	134
Лабораторна робота 20. Ензиматичний гідроліз ліпідів.....	134
Лабораторна робота 21. Виявлення кетонових тіл.....	137
Література	140
Зміст	142

Навчально-методичне видання

Галина Петрівна **Копильчук**
Іванна Михайлівна **Николайчук**

Лабораторний практикум із біохімії

Навчально-методичний посібник

Відповідальний за випуск ***Копильчук Г.П.***

Літературний редактор ***Ряднова В.П.***

Комп'ютерний набір та верстка ***Николайчук І.М.***