

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЧЕРНІГІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Б І О Х І М І Я

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБОТ

для студентів спеціальності 227 – Фізична реабілітація

Обговорено і рекомендовано
на засіданні кафедри
харчових технологій
Протокол № 4 від 29.12.2015

Чернігів ЧНТУ 2016

Біохімія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 227 – Фізична реабілітація / Укл.: О.М. Савченко, В.М. Челябієва, О.І. Сиза – Чернігів: ЧНТУ, 2016. – 87 с.

Укладачі: САВЧЕНКО ОЛЕСЯ МИКОЛАЇВНА, кандидат технічних наук, доцент
ЧЕЛЯБІЄВА ВІКТОРІЯ МИКОЛАЇВНА, кандидат технічних наук, доцент
СИЗА ОЛЬГА ІЛЛІВНА, доктор технічних наук, професор

Відповідальний за випуск: СИЗА ОЛЬГА ІЛЛІВНА, завідувач кафедри харчових технологій, доктор технічних наук, професор

Рецензент: Буяльська Наталія Павлівна, кандидат технічних наук, доцент кафедри харчових технологій Чернігівського національного технологічного університету

Зміст

Вступ	4
Лабораторна робота № 1. Якісні кольорові реакції на функціональні групи білків та амінокислот	5
Лабораторна робота № 2. Колориметричні методи визначення кількості білка	12
Лабораторна робота № 3. Фізико-хімічні властивості білків	15
Лабораторна робота № 4. Складні білки: глікопротеїни та нуклеопро­теїни ..	24
Лабораторна робота № 5. Ферменти, їх будова, властивості та функції. Активатори та інгібітори ферментів	28
Лабораторна робота № 6. Специфічність дії ферментів	36
Лабораторна робота № 7. Кількісне визначення активності ферментів	38
Лабораторна робота № 8. Обмін речовин та енергії. Біологічне окиснення. Тканинне дихання. Окисно-відновні ферменти	40
Лабораторна робота № 9. Вуглеводи, структура та обмін	46
Лабораторна робота № 10. Фізико-хімічні властивості ліпідів	51
Лабораторна робота № 11. Вітаміни	56
Лабораторна робота № 12. Гормони	64
Лабораторна робота № 13. Біохімія м'язів	69
Лабораторна робота № 14. Дослідження біохімічних властивостей сечі	73
Лабораторна робота № 15. Біохімічне дослідження крові	78
Додатки	82
Рекомендована література	87

В с т у п

Дисципліна “Біохімія” входить до переліку обов’язкових навчальних дисциплін підготовки фахівця освітньо-кваліфікаційного рівня “бакалавр” галузі знань 22 «Охорона здоров’я» спеціальності «Фізична реабілітація». Вивчення біохімічних закономірностей фізичного розвитку і спортивного тренування дозволяє на науковій основі вирішувати питання відбору кадрів для занять спортом, вишукувати найбільш ефективні засоби і методи тренувань, вірно оцінювати результати їх використання і прогнозувати спортивні досягнення, розробки заходів з підвищення працездатності спортсменів, раціоналізації їх харчування.

В даний час від викладача фізичного виховання і тренера потрібно не тільки розуміння біохімічних процесів, що відбуваються в організмі спортсмена, але й уміння самостійно провести нескладні біохімічні аналізи й оцінити їхні результати. На практичних заняттях студенти розширюють, поглиблюють і деталізують наукові знання, отримані на лекціях та в процесі самостійної роботи. Вони набувають практичних умінь та навичок з лабораторним устаткуванням, обладнанням, вимірювальною апаратурою і ознайомлюються з методами біохімічних досліджень, які використовуються в спортивній практиці для визначення реакції організму на фізичні навантаження і міри тренуваності.

Даний практикум містить 15 лабораторних робіт із біохімії, які укладено за програмними питаннями курсу "Біохімія" для студентів спеціальності 227 – Фізична реабілітація. В методичних вказівках наведені лабораторні роботи з усіх основних розділів курсу: білки, нуклеїнові кислоти, ферменти, ліпіди, вуглеводи, вітаміни, гормони, обмін речовин. При цьому особливу увагу приділено визначенню якісного і кількісного складу метаболітів в біологічних рідинах для оцінки рівня тренуваності спортсмена, виявлення перевантажень і перенапруги.

Розділи містять інформаційний матеріал для засвоєння теми, лабораторний практикум з акцентом на якісне та кількісне визначення біологічних молекул, питання для самоконтролю. В лабораторних роботах викладено принцип метода з наведенням реакцій взаємодіючих речовин, детально описаний хід роботи та очікувані результати.

Перед тим, як приступити до виконання лабораторних робіт, кожний студент повинен ознайомитися з правилами роботи і технікою безпеки у хімічній лабораторії (Додаток А). Приготування реактивів та розчинів наведено в додатку Б.

Результати виконаних лабораторних робіт оформляються студентами у вигляді звітів, які повинні містити: назву лабораторної роботи, її мету, короткі теоретичні відомості (не більш 0,5 – 1 стор.), експериментальну частину з результатами виконаних дослідів та завершеними хімічними рівняннями. Крім того, кожна лабораторна робота повинна містити висновок (узагальнення результатів).

Лабораторна робота № 1

Якісні кольорові реакції на функціональні групи білків та амінокислот

1.1 Мета: оволодіти методикою проведення якісних реакцій на функціональні групи білків та амінокислот.

1.2 Короткі теоретичні відомості

Б і о х і м і я – наука, що вивчає склад та структуру хімічних речовин живої матерії, їх перетворення та фізико-хімічні процеси, які лежать в основі життєдіяльності.

Біохімія широко використовує хімічні, фізичні, фізико-хімічні та біологічні методи дослідження, проте має і свої, наприклад ферментативні, які в свою чергу широко використовуються в харчовій промисловості і аграрному секторі економіки, медицині і фармації.

До складу живих організмів входять білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ліпіди, продукти їх проміжного і кінцевого обміну, різні біологічно активні речовини (вітамінні, гормони, медіатори та інші), вода і неорганічні іони.

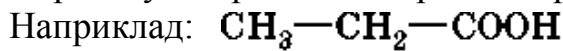
Білки – високомолекулярні нітрогеновмісні органічні сполуки, побудовані з великої кількості залишків амінокислот, з'єднаних між собою пептидними (кислотно-амідними) зв'язками в поліпептидний ланцюг (ланцюги), що мають складну структурну (просторову) організацію та виконують важливі життєві функції.

Їм належить першочергова роль у структурній організації і функціонуванні живих організмів. Білки є основними структурними компонентами живих організмів і в кількісному відношенні посідають перше місце серед усіх макромолекул, які містяться в живій клітині. В організмі тварин білків міститься від 40 до 50% і більше від сухої маси, менше у рослин – до 20–30%. У тканинах ссавців білки складають – 18–20%, тоді як нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ліпіди – 1–15%. Суха маса організму людини складається на 45–50% із білків, при цьому їх вміст досягає: у м'язах – 80%, у серці – 60%, печінці – 72%, легенях – 82%, нирках – 72%, селезінці – 84%, у кістках – 28%.

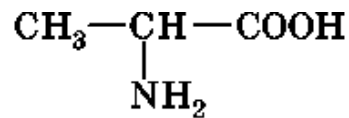
На сьогодні досягнуто значних успіхів у розкритті структури великої кількості білків, у вивченні взаємозв'язку структури і функції білків, механізму їх участі у найважливіших процесах життєдіяльності організму, у розумінні основ патогенезу багатьох хвороб. Білки мають велике народногосподарське значення. Вони є найважливішими компонентами їжі людини і сільськогосподарських тварин. Хронічна нестача білків призводить до різноманітних захворювань, зменшуючи тим самим середню тривалість життя.

У складі природних білків зустрічається близько 20 різних α, L -амінокислот. Усі амінокислоти, що входять до складу білка (протеїногенні амінокислоти), є амінопохідними карбонових кислот, в яких один атом

гідрогену в радикалі при α -карбоновому атомі заміщено на аміногрупу.



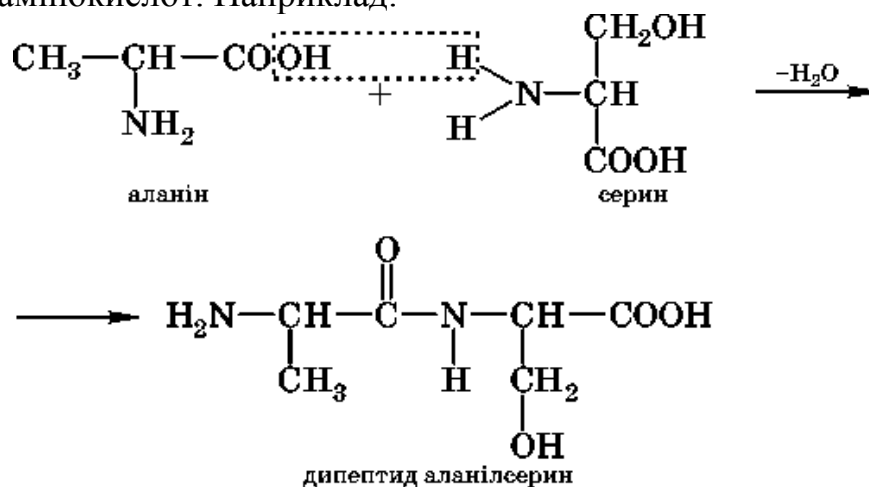
пропіонова кислота



α -амінопропіонова кислота
аланін (ала)

Залежно від природи радикалу розрізняють амінокислоти аліфатичного (жирного) і циклічного рядів, причому останні можуть бути як ароматичними, так і гетероциклічними сполуками.

Одна з найважливіших властивостей амінокислот – це їх здатність вступати в реакцію поліконденсації з виділенням молекули води і утворенням ковалентного пептидного зв'язку; в реакції беруть участь тільки функціональні групи сусідніх амінокислот. Наприклад:



Пептидний зв'язок можна розглядати як амідний, в якому один із Н-атомів є заміщеним. До дипептиду аналогічним чином можуть приєднуватися інші амінокислоти з утворенням три-, тетра-, пента- і так далі, аж до крупного поліпептиду – білка. Оскільки в складі пептидів амінокислоти перебувають у формі ацилів, то в назві пептидів вони отримують характерні для ацилів суфікси «іл» замість «ін» або «н», відповідних амінокислот, а саме: «Аланіл» замість «Аланін», «Гістидил» замість «Гістидин» і т. д. Назва С-кінцевої амінокислоти з вільною COOH -групою не змінюється.

Різноманітність біохімічних функцій білків пов'язана з особливостями їх хімічної будови, яка визначається *якістю, кількістю* амінокислотних залишків і *порядком їх чергування* в поліпептидному ланцюгу.

Білкам належить першочергова роль у структурній організації і функціонуванні живих організмів.

Існують дві різновидності кольорових реакцій:

- *універсальні* – біуретова (на всі білки) і нінгідрінова (на всі α -амінокислоти та білки);
- *специфічні* – тільки на деякі амінокислоти як в молекулі білка, так і в розчинах окремих амінокислот.

Радикали амінокислот дають різноманітні забарвлення, що зумовлює можливість виявлення більшості з них певними кольоровими реакціями.

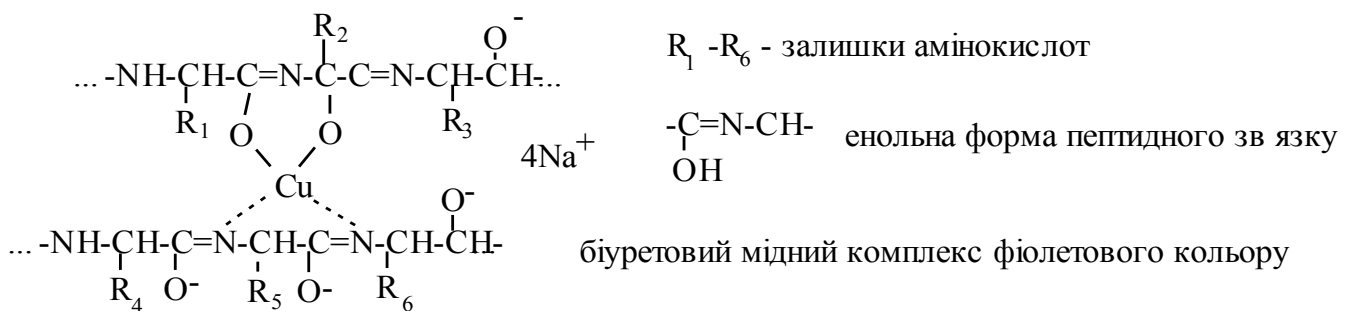
Кольорові реакції широко використовуються для виявлення білкової природи речовин, вивчення амінокислотного складу різних природних білків і пептидів, для ідентифікації індивідуальних амінокислот. Багато з них є досить чутливими та високо специфічними, що дозволяє відкривати незначні кількості білків, тієї чи іншої амінокислоти в продуктах харчування, у гідролізатах білків.

1.3 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: 1 % розчину яєчного білка; 1 % розчину желатини; 0,1 % розчину амінокислоти гліцину чи аланіну; біуретовий реактив; 0,1 % розчин α -аланіну, 0,1% розчин β -аланіну, 0,5 % водний розчин нінгідрину, водяна баня; 0,1 % розчин тирозину; 0,1% розчин гліцину; концентрована нітратна кислота; 20 % розчин натрію гідроксиду; концентрована оцтова кислота; 0,04 моль/л купруму (II) сульфату; 5 % розчин плюмбум ацетату; 0,1 % розчин цистеїну гідрохлориду; 0,1 % розчин метіоніну; 5 % розчин натрію нітропрусиду.

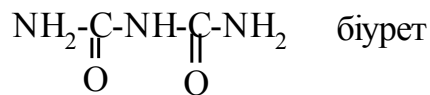
1.3.1 Біуретова реакція на пептидну групу (реакція Піотровського).

Біуретова реакція зумовлена наявністю в молекулах білків пептидних зв'язків. У лужному середовищі в присутності йонів двовалентного купруму розчини білків і пептидів набувають фіолетового забарвлення з червоним або синім відтінком залежно від кількості пептидних зв'язків. У сильно лужному середовищі пептидні групи поліпептидних ланцюгів переходять в енольну форму, яка взаємодіє з йонами Cu^{2+} і утворює забарвлений біуретовий комплекс:



Таку реакцію дають усі білки, а також пептиди, що містять не менше двох пептидних зв'язків. З ди- та трипептидами забарвлення нестійке. Біуретову реакцію дають також біурет, деякі амінокислоти (гістидин, серин, треонін, аспарагін) та інші сполуки при досить значній концентрації в розчині. Деякі кислоти, у яких пептидні зв'язки виникають за рахунок карбоксильної та амінної груп (аспарагін) дають біуретову реакцію.

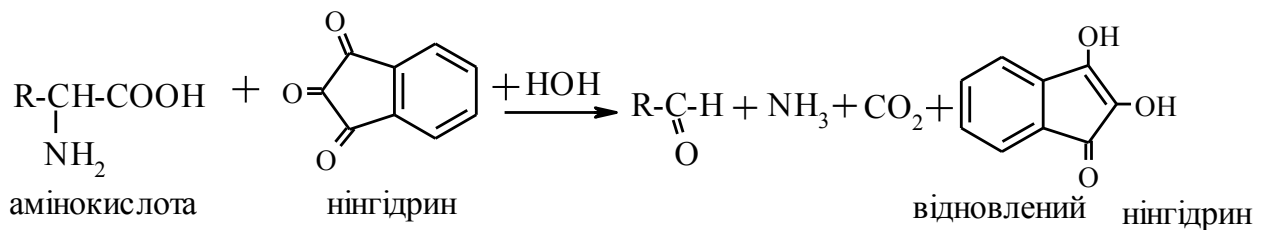
Біурет, що дав назву цій реакції, утворюється при сплавленні двох молекул сечовини:



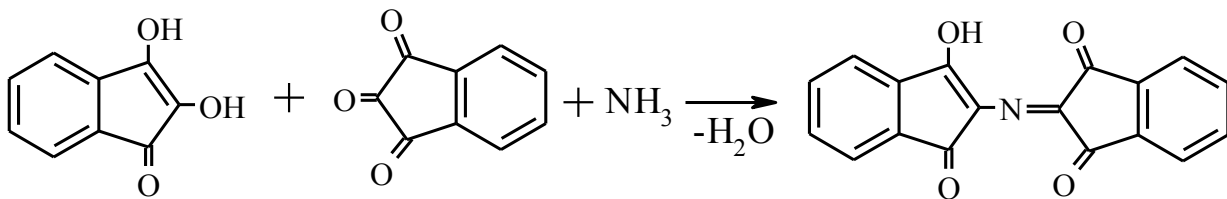
У три пронумеровані пробірки вносять по 1 мл: 1 % розчину яєчного білка; 1 % розчину желатини; 0,1 % розчину амінокислоти гліцину чи аланіну. Добавляють в кожну пробірку по 1 мл біуретового реактиву, ледь збовтують. Спостерігають, чи утворюватиметься синьо-фіолетове забарвлення, дають пояснення (по кожній пробірці) і роблять висновки.

1.3.2 Нінгідрінова реакція на α -аміногрупу

Білки, пептиди, вільні α -амінокислоти дають синє або синьо-фіолетове забарвлення при взаємодії з нінгідрином (трикетогідринденгідратом). Реакція характерна для аміногруп, що знаходяться в α -положенні. α -Амінокислоти при нагріванні до 70°C з нінгідрином перетворюються на альдегіди з виділенням амоніаку і вуглекислоти. Нінгідрин при цьому відновлюється:



Відновлений нінгідрин конденсується з амоніаком та окисненим нінгідрином і утворює сполуку, яка єнолізується і переходить у забарвлену форму, що має синьо-фіолетовий колір:



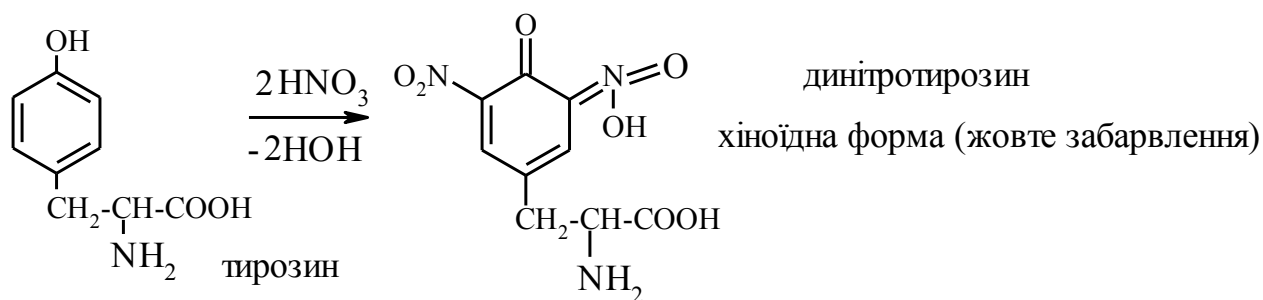
Нінгідрінова реакція з використанням спиртового (або ацетонового) розчину широко використовується в хроматографічному аналізі, а також для колориметричного кількісного визначення, амінокислот (цистеїн, метіонін, глутамінова кислота, гістидин; амінокислот у гідролізатах білків).

В одну пробірку наливають 1 мл 1 % -вого розчину яєчного білка, в другу – 1 мл 0,1 % -вого розчину α -аланіну і в третю – 1 мл 0,1% -вого розчину β -аланіну. Приливають у всі пробірки по 5-10 крапель 0,5 % -вого водного розчину нінгідрину і нагрівають на водяній бані при температурі 70°C протягом 5 хв. Спостерігають за утворенням забарвлення, порівнюють швидкість утворення забарвлення в кожній пробірці, дають пояснення та записують хімізм реакції.

1.3.3 Ксантопротеїнова реакція на ароматичне кільце циклічних амінокислот (реакція Мульдера)

При взаємодії з концентрованою нітратною кислотою білки, пептиди, що містять залишки циклічних амінокислот з ароматичними кільцями (фенілаланін, тирозин, триптофан), а також вільні вище вказані амінокислоти

нітруються з утворенням динітропохідних жовтого кольору, які при додаванні лугу перетворюються на хіноїдні структури, забарвлені в оранжевий колір:

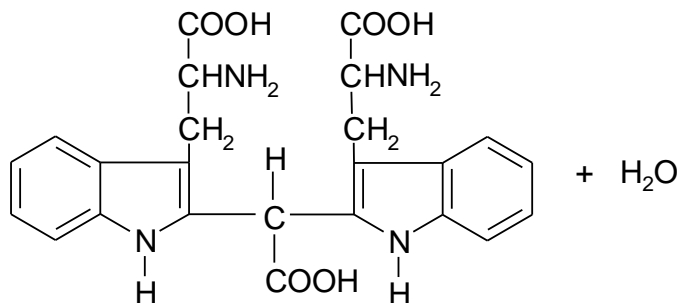
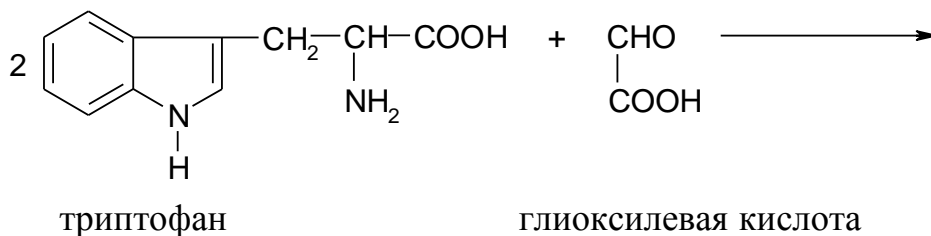


Фенілаланін нітрується важче. Білки, що не містять циклічних амінокислот, не дають ксантопротеїнової реакції.

В одну пробірку наливають 1 мл 1 % -вого розчину яєчного білка, в другу – 1 мл 0,1 % -вого розчину тирозину, в третю – 1 % -вого розчину желатини, в четверту – 1 мл 0,1% -вого розчину гліцину. Додають до всіх пробірок по 1 мл концентрованої нітратної кислоти і обережно нагрівають до появи жовтого забарвлення. Потім пробірки охолоджують під струменем водопровідної води, додають краплями 20 % розчин натрію гідроксиду, доки не почнеться зміна забарвлення. Дають пояснення результатам досліду в кожній пробірці, порівнюють забарвлення і записують хімізм реакції.

1.3.4 Реакція на триптофан (реакція Адамкевича)

Амінокислота триптофан і білки, що її містять, у кислому (лужному) середовищі реагують з гліоксиловою кислотою (альдегідами), утворюючи продукт конденсації червоно-фіолетового кольору:

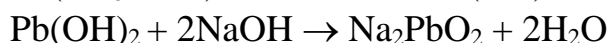
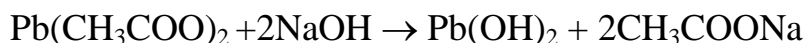
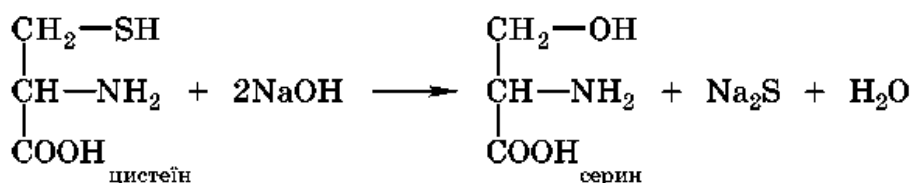


У першу пробірку наливають 1 мл нерозведеного яєчного білка, в другу – 1 мл 0,1 %- ного розчину триптофану, в третю 1 мл 0,1 %- ного розчину желатини. У кожен пробірку додають по 0,5 мл концентрованої оцтової кислоти (яка містить незначну кількість гліоксилової кислоти). Отриману суміш спочатку нагрівають до розчинення осаду, а потім охолоджують після

чого обережно, по стінкам пробірки, щоб рідини не перемішалися, додають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Через 10 хв спостерігають утворення червоно-фіолетового кільця на межі двох шарів. Спостерігають за утворенням забарвленого кільця на межі двох рідин, дають пояснення, записують хімізм реакції. Реакцію можна прискорити, поставивши пробірку в киплячу водяну баню. Чутливість реакції збільшується, якщо в реагуючу суміш додати п'ять крапель 0,04 моль/л купрум(II) сульфату.

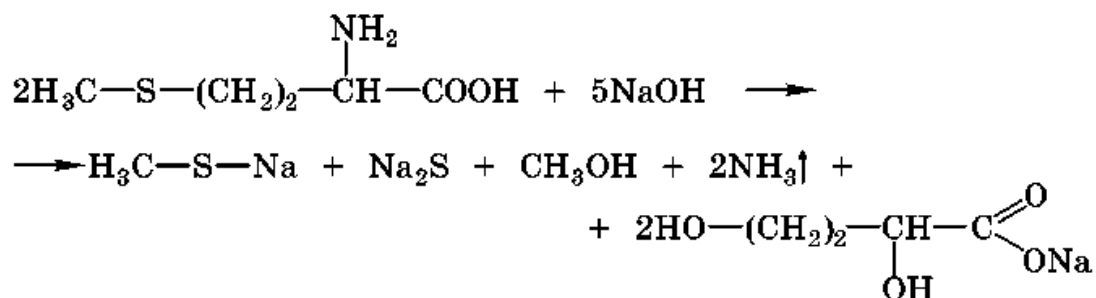
1.3.5 Реакція на амінокислоти, що містять слабозв'язаний сульфур (реакція Фоля)

Сульфгідрильні групи ($-\text{SH}$) у білку, пептиді, а також амінокислоти цистеїн і цистин в результаті лужного гідролізу при нагріванні утворюють натрію сульфід, який з натрію плюмбітом дає чорний або бурий осад плюмбуму сульфідну:



Метилтіогрупа метіоніну більш стійка, тож при слабкому гідролізі не руйнується і цієї реакції не дає. Деякі білки практично не містять сульфуровмісних амінокислот, наприклад желатин.

Для виявлення сульфуру 0,05 г метіоніну сплавляють з 30 % розчином натрію гідроксиду. Відбувається руйнування молекули метіоніну з утворенням похідних меркаптани і сульфідів:



Утворені сульфідні можна виявити кольоровою реакцією з розчином натрій плюмбіту або нітропрусиду.

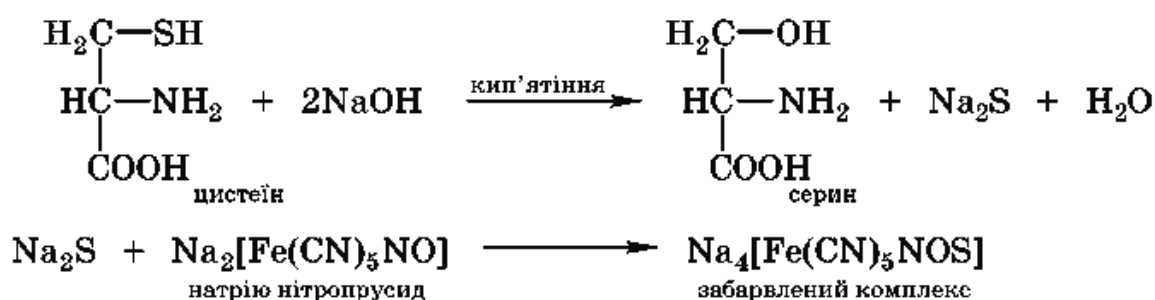
У три пронумеровані пробірки вливають по 10 крапель 5 % розчину плюмбуму ацетату і краплями додають 20 % розчин натрію гідроксиду до розчинення попередньо утвореного осаду. Потім у першу пробірку додають 1 мл 1 % розчину яєчного білка, у другу – 1 мл 1 % розчину желатини, у третю — 1 мл 0,1 % розчину цистеїну гідрохлориду, у четверту – 1 мл 0,1 % розчину

метіоніну. Суміші кип'ять. Спостерігають за перетворенням забарвлення в кожній пробірці, дають пояснення і записують рівняння хімічної реакції.

1.3.6 Нітропрусидна реакція на сульфуровмісні амінокислоти

В одну пробірку вносять 1 мл нерозведеного свіжого яєчного білка, у другу – 1 мл 0,1 % розчину цистеїну гідрохлориду, у третю – 1 мл 0,1 % розчину метіоніну. Приливають у всі пробірки по 1 мл 20 %-вого розчину натрію гідроксиду, кип'ять 3 хв, охолоджують і вносять 2–3 краплі 5 % розчину натрію нітропрусиду. Спостерігають за появою забарвлення, дають пояснення і записують хімізм реакції.

Натрію сульфід, утворений при лужному гідролізі білків і сульфуровмісних амінокислот, дає з натрію нітропрусидом комплексну сполуку червоно-фіолетового кольору:



1.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Дайте визначення білків.
 2. Чим обумовлені кольорові реакції на білки?
 3. Якщо з розчином одного білка реакції Міллона та ксантопротеїнова позитивні, а з розчином другого негативні, то що можна сказати про відмінність амінокислотного складу цих білків?
 4. Як за допомогою кольорових реакцій виявити в білку аргінін, цистеїн?
 5. Дані пептиди:
 - Асп-Фен-Мет-Гис-Цис-Ала
 - Тир-Цис-Про-Арг-Глу.
- Які кольорові реакції будуть позитивні з цими пептидами? Обґрунтуйте ваш вибір.
6. За допомогою яких кольорових реакцій можна встановити відмінність амінокислотного складу альбуміну й желатину?
 7. Дані дві пробірки з розчинами: одна з розчином білка, друга вміщує суміш амінокислот. За допомогою кольорових реакцій визначити:
 - а) в якій пробірці міститься білок?
 - б) які амінокислоти містяться в другій пробірці?
 8. Реакція на амінокислоти, що містять слабозв'язаний сульфур.

Лабораторна робота № 2

Колориметричні методи визначення кількості білка

2.1 Мета: вивчити амфотерні властивості амінокислот, оволодіти методикою виділення та кількісного визначення білків та вільних амінокислот із біологічного матеріалу.

2.2 Короткі теоретичні відомості

Для кількісного визначення білків у біологічному матеріалі найчастіше застосовують фотоколориметричні і спектрофотометричні методи, у деяких випадках використовують визначення білка за вмістом загального нітрогену (азотометрія), а також фотонейфелометричні методи.

Кількісні методи визначення білків використовують у практиці для контролю білкових препаратів, а також для визначення активності ферментних препаратів. Методи кількісного визначення білка займають значне місце в науково-дослідних експериментах.

У клініко-біохімічних лабораторіях для встановлення діагнозу багатьох захворювань проводять визначення концентрації білків в біорідинах організму (крові, сечі, спинномозковій рідині, ексудатах). У сироватці крові міститься суміш білків, різних за фізіологічним значенням, структурою і фізико-хімічними властивостями. На сьогоднішній день знайдено близько 100 різних білків плазми крові. У нормі вміст загального білка в сироватці крові дорівнює у дорослих 65 – 85 г/л (6,5 – 8,5 г %), у дітей до 6 років 56 – 85 г/л або 5,6 – 8,5 г %.

Збільшення рівня концентрації білка до 120 г/л (гіперпротеїнемія) зустрічається рідко. Це характерно для деяких хронічних запальних процесів унаслідок утворення антитіл (поліартрит, ревматизм, мієломна хвороба — плазмоцитома). Короткочасна відносна гіперпротеїнемія відзначається при згущенні крові, унаслідок значних втрат рідини, наприклад, при посиленні потовиділення, невтримному блюванні, холері, нецукровому діабеті, тяжких опіках і т. д. Пониження кількості білка (гіперпротеїнемія) має місце при недостатньому надходженні білка з їжею (голодування, порушення прохідності кишечного тракту); порушенні процесів біосинтезу білків в органах; ураженні печінки хімічними речовинами, мікроелементами, пухлинами; втраті білка організмом (кровотечі, підвищеній проникності судин, хворобах нирок, вагітності і т. д.).

Колориметричні методи визначення кількості білка

Вони базуються на так званих «кольорових» реакціях на функціональні групи білків (див. роботу 1). При визначенні білка в лікарських препаратах заздалегідь будують калібрувальний графік з використанням стандартного зразка білка (сироваткового альбуміну людини, сироваткового альбуміну бика або амінокислоти тирозину).

Спектрофотометричні методи кількості визначення білка

Спектрофотометричні методи розділяють на прямі й непрямі. Останні є більш

чутливим і точним варіантом фотоколориметричного. Як було зазначено раніше, після проведення кольорової реакції на білки проводять спектрофотометрію забарвленого розчину і за його світлопоглинанням у монохроматичному світлі розраховують вміст білка. Прямий метод полягає в вимірюванні світлопоглинання розчину білка в ультрафіолетовій ділянці при 200 – 220 нм (у цій ділянці поглинають пептидні групи білка) і при 280 нм (зона поглинання ароматичних радикалів амінокислот, в основному триптофану і тирозину). Ці методи досить зручні і не потребують попереднього утворення забарвлених комплексів.

Визначення кількості білка за вмістом білкового нітрогену

Вміст нітрогену в більшості білків практично близький і може сягати 16 %. Знайдену кількість нітрогену помножують на 6,25 (тому що $100 : 16 = 6,25$) і одержують вміст білка в пробі. У тому випадку, якщо біологічний матеріал, крім білка, містить інші речовини, до складу яких входить нітроген, білок попередньо осаджують трихлороцтовою або перхлоратною кислотою. При нагріванні білка з концентрованою сульфатною кислотою відбувається його мінералізація, нітроген переходить до амонію сульфату, і його можна визначити кількісно. Ці методи (мікрометод К'ельдаля і його модифікація) досить складні в роботі, не завжди надійні, оскільки вміст нітрогену в різних білках коливається від 14 до 19 %.

2.3 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: білок, біуретовий реактив, 6 % розчин натрію гідроксиду, реактив Бенедикта, розчин бромфенолового синього.

2.3.1 Визначення кількості білка за біуретовою реакцією

Серед різних методів визначення білка особливого розповсюдження набув метод, що базується на біуретовій реакції. Він характеризується специфічністю визначення (оскільки пептидні зв'язки мають тільки білки і пептиди), точністю і доступністю. Біуретову реакцію не можна проводити в присутності солей амонію через утворення мідно-амоніачних комплексів.

Визначення проводять таким чином: 1 мл досліджуваного препарату, що містить 1–10 мг білка, поміщають у пробірку, додають 4 мл біуретового реактиву, перемішують і залишають на 30 хв при кімнатній температурі. Оптичну густину розчину вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі в діапазоні від 540 до 650 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Розчином порівняння є суміш цих же реактивів без препарату. Калібрувальний графік будують в межах концентрації від 1 до 10 мг стандартного зразка білка, вимірюючи оптичну густину розчинів при відповідній довжині хвилі.

2.3.2 Мікрометод визначення кількості білка з реактивом Бенедикта

2 мл розчину препарату, що містить 0,1-2 мг досліджуваного білка, поміщають у пробірку, додають 2 мл 6 %-вого розчину натрію гідроксиду, 0,2 мл реактиву Бенедикта, перемішують і залишають на 15 хв при кімнатній

температурі. Оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 330 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Розчином порівняння є суміш цих реактивів без препарату. Калібрувальний графік будують у межах концентрації від 0,1 до 2 мг стандартного зразка білка, вимірюючи оптичну густину розчину при довжині хвилі 330 нм.

2.3.3 Визначення кількості білка за методом Флореса

Метод ґрунтується на утворенні забарвленого в синій колір комплексу білка з барвником бромового синім: 5 мл досліджуваного препарату, що містить 0,01-0,08 мг білка, поміщають в пробірку, додають 0,3 мл розчину бромового синього, витримують при кімнатній температурі впродовж однакового часу в інтервалі від 10 хв до 8 год. Комплекс стійкий протягом 8 год. Оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 610 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовують суміш цих же реактивів без препарату. Калібрувальний графік будують у межах концентрацій від 0,01 до 0,08 мг стандартного зразка білка (майже прямолінійна залежність), вимірюючи оптичну густину розчинів при довжині хвилі 610 нм.

2.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Поясніть, чому білки лежать в основі життєдіяльності організму?
2. Від чого залежить різноманітність структури і властивостей білків?
3. Чому амінокислоти виявляють амфотерні властивості?
5. Які властивості виявляє аланін в кислому середовищі? Записати хімізм реакції.
6. Які властивості виявляє аланін в середовищі середовищі? Записати хімізм реакції.
4. Напишіть формулу тетрапептида, що утворений гліцином, аланіном, цистеїном і тирозином. Дайте йому назву.
5. Доведіть, що всі особливості будови молекули білку визначаються його первинною структурою.
6. Правила утворення пептидного зв'язку.
7. Які методи застосовують для кількісного визначення білків?
8. На яких реакціях засновано кількісне визначення білка біуретовим методом? Методом Лоурі?
8. Який метод більш чутливий: біуретовий чи метод Лоурі?

Лабораторна робота № 3

Фізико-хімічні властивості білків

3.1 Мета: дослідити фізико-хімічні властивості білків, навчитись визначати ізоелектричну точку білків, проводити розділення білкових фракцій.

3.2 Короткі теоретичні відомості

Розчинність різних білків у воді і в різних розчинниках неоднакова і залежить від природи білка й розчинника, значення рН, температури, іонної сили тощо. У кислому середовищі краще розчиняються білки, для яких характерні кислотні властивості, а в лужному - білки, з основними властивостями. Альбуміни добре розчиняються в дистильованій воді, а глобуліни розчинні у воді тільки в присутності електролітів. Білки опорних тканин (кератини, колаген, еластин та ін.) не розчиняються у воді й сольових розчинах, у воді вони лише набрякають. Розчинність білків у воді зростає за невеликих концентрацій нейтральних солей (Na_2SO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ та ін.). Цей ефект називають сольовим розчиненням. Нейтральні солі в малих концентраціях збільшують ступінь дисоціації іонізованих груп білка, екранують заряджені групи білкових молекул і цим зменшують білок-білкові взаємодії. Високі концентрації нейтральних солей, навпаки, осаджують (висолюють) білки з водних розчинів; найактивніше це відбувається у ІЕТ білка. При цьому солі відтягують до себе від заряджених груп білка поляризовані молекули води і тим самим частково позбавляють білок гідратної оболонки, ко-тра запобігає його осадженню з розчину.

Різна розчинність білків використовується для їх одержання і очистки, у науково-експериментальній роботі.

Білки – амфотерні поліелектроліти, у водних розчинах мають властивості слабких кислот або слабких лугів, залежно від переваги в молекулі білка залишків моноамінодикарбонових (глутамінової і аспарагінової) кислот або залишків діаміномонокарбонових кислот. Білки кислотного характеру (альбуміни, глобуліни) у водному розчині несуть негативний заряд, білки лужного характеру (протаміни, гістони) – позитивний заряд. Наявність заряду на макромолекулі білка стабілізує його в розчині, оскільки заважає злипанню білкових частинок і випаданню їх в осад. Зміною концентрації протонів у середовищі (додаванням кислот або лугів) можна зменшити дисоціацію білкових частинок і перетворити їх на електронейтральні амфіони, тобто досягнути ізоелектричного стану білка. *Концентрація йонів гідрогену, при якій білок знаходиться в ізоелектричному стані (сумарні кількості негативних і позитивних зарядів однакові), називається ізоелектричною точкою (ІЕТ) білка.* ІЕТ характеризує хімічну природу білка. Для кожного білка існує своя ІЕТ. При рН, близькому до ІЕТ, розчинність, набухання, в'язкість білка стають найменшими, а осадження, аглютинація та комплексоутворення – найлегшими.

Висолювання білків (розділення білкових фракцій).

У водному розчині більшість білків та їх частинок заряджені і гідратовані. При додаванні великих кількостей солей лужних і лужноземельних металів (натрію сульфату, магнію сульфату, натрію хлориду та інших), а також нейтральних солей, наприклад, амонію сульфату, відбувається руйнування гідратної оболонки (дегідратація) білка. Крім цього, електричний заряд білкової молекули знижується йонами солі, що на ній адсорбуються, частинки білка злипаються одна з одною і випадають в осад. Таке явище називають «висолюванням» білка. При висолюванні білок не втрачає притаманних йому фізико-хімічних і біологічних властивостей. Він знову розчиняється у воді і проявляє майже з тією активністю ферментативні, антигенні, імунні та інші біологічні властивості, тобто залишається нативним (натуральним).

Осадження білка методом висолювання використовують для розділення білкових фракцій при отриманні очищених білків, у тому числі ферментних і гормональних препаратів, а також для одержання білків в кристалічному стані. Його використовують у клініко-біохімічних лабораторіях для розділення альбумінів і глобулінів і визначенні їх співвідношення в сироватці крові. Осажену фракцію білка відділяють центрифугуванням, розчиняють і кількісно визначають за допомогою різних методів. У нормі альбуміно-глобулінове співвідношення (А/Г – коефіцієнт) дорівнює 1,5-2,3 і може змінюватися при патології, наприклад при хронічних дифузних ураженнях печінки (гепатит і цироз), інфекційних захворюваннях, лихоманці, пневмонії, туберкульозі, ендокардиті, злоякісних процесах, амілоїдозі, при збільшенні вмісту глобулінів.

Діаліз білків. Діалізом називається особливий вид розділення речовин за допомогою мембран, які не здатні пропускати через свої пори високомолекулярні колоїдні частинки. Тому діаліз є зручним методом очищення білка від низькомолекулярних органічних і неорганічних домішок.

Діалізом користуються в біохімічних дослідженнях для очищення високомолекулярних сполук (білків, нуклеїнових кислот, полісахаридів та інших) від низькомолекулярних і при отриманні лікарських засобів, у тому числі і білкових. Метод діалізу використовується в практичній медицині для очищення крові від природних низькомолекулярних «шлаків» і токсичних сполук при захворюванні нирок і деяких отруєннях (апарат «штучна нирка»).

Денатурація білків. Білки під впливом фізичних (температури, ультразвуку, йонізуючої радіації та інших), хімічних (мінеральних і органічних кислот, лугів, органічних розчинників, важких металів, алкалоїдів тощо) та біологічних факторів зазнають глибоких змін, пов'язаних з порушенням четвертинної, третинної і вторинної структури, що призводить до зміни фізико-хімічних і біологічних властивостей білка, тобто до *денатурації* (втрати нативності). При денатурації білка відбувається розрив «цементуючих» білкову молекулу вторинних зв'язків (водневих, дисульфідних, електростатичних, ефірних, вандервальсових та ін.). Це призводить до зміни просторової структури і зменшує його гідрофільні властивості. Білок стає більш гідрофобним, втрачає здатність розчинятись у звичайних для нього

розчинниках і втрачає свої біологічні функції. Глибока денатурація є незворотною на відміну від взаємно-зворотної, при якій зміни структури білка бувають неглибокими і білок за деяких умов може знову набувати своїх нативних властивостей. Наприклад, при осадженні білків органічними розчинниками – спиртом або ацетоном (при низькій температурі), з подальшим видаленням осаджувача.

Процес денатурації білків широко використовується для осадження білка в біологічному матеріалі з метою подальшого визначення в ньому небілкових і низькомолекулярних сполук, для виявлення присутності білка і його кількісного визначення; для знезараження шкіри, слизових покривів і відходів в санітарній практиці; для зв'язування солей важких металів білком при лікуванні отруєнь солями ртуті, кадмію, купруму та іншими, або їх профілактики на виробництві. Після отруєння негайно приймають білки молока або збитих яєць, доки ці солі знаходяться в шлунку і не всмокталися. Після приймання білка у потерпілого викликають блювання, щоб видалити отруту з організму. Процеси денатурації білків спостерігають також при прийманні таніну чаю і танальбіну, що зумовлює їх в'язучу і протизапальну дію. В'язучі властивості таніну пов'язані з його здатністю осаджувати білки з утворенням густих альбумінатів, які захищають від подразнення чутливі нервові закінчення. При цьому зменшується безпосереднє потовщення клітинних мембран, що призводить до зменшення запальної реакції та послаблення болісних відчуттів. Препарат танальбін – продукт взаємодії таніну з білком казеїном, на відміну від таніну, не викликає в'язучої дії на слизові оболонки рота і шлунка. При надходженні до кишечника, розщеплюється з виділенням вільного таніну. Використовується як в'язучий засіб при гострих і хронічних захворюваннях кишечника, особливо у дітей. У фармацевтичній практиці знайомство з процесом денатурації білка дозволяє контролювати якість білкових препаратів, наприклад в ампулах.

Кислотний гідроліз простого білка. Гідроліз пептидних зв'язків (міцний ковалентний зв'язок) йде достатньо важко. У живих організмах він відбувається групою ферментів – гідролаз, які називаються пептидазами (пептидгідролазами). Розрізняють ендопептидази (здійснюють гідроліз пептидних зв'язків, що знаходяться у середині молекули білка), екзопептидази (здійснює відщеплення кінцевих амінокислотних залишків або руйнування пептидних зв'язків, що знаходяться недалеко від кінця молекули).

Хімічний гідроліз білка можна здійснити, дією на розчин білка концентрованими кислотами при високій температурі протягом тривалого часу.

3.2 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: яєчний білок, 5% розчин натрію хлориду, 0,1 моль/л CH_3COOH , 1 моль/л CH_3COOH , 0,1 моль/л CH_3COONa , 1% розчин желатина, 96% етилового спирту, 0,1%-вого розчину казеїну, 2 моль/л CH_3COOH , 0,2 моль/л CH_3COONa , 10% розчин амоній сульфату,

концентрована оцтова кислота, біуретовий реактив, 5% розчин барію хлориду, 10 % розчин трихлороцтової кислоти, 10 % розчин сульфосаліцилової кислоти, 5% розчин купруму сульфату, 1% розчин аргентуму нітрату, 1% розчин плюмбум ацетату.

3.2.1 Розчинність білків

В одну пробірку вносять 1 мл нерозведеного яєчного білка, 10 мл дистильованої води, вміст перемішують. При цьому яєчний альбумін розчиняється, а яєчний глобулін випадає у вигляді невеликого осаду. У другу пробірку вносять 1 мл яєчного білка і 10 мл 5%-вого розчину натрію хлориду. У слабкому розчині солі розчиняються і глобуліни, і альбуміни. У дві інші пробірки поміщають невеликі кількості кератину (волосся). В одну вносять 10 мл дистильованої води, у другу – 10 мл 5%-вого розчину натрію хлориду. Указані білки не розчиняються ні у воді, ні в розчині солі.

3.2.2 Визначення ізоелектричної точки білків

В ІЕТ білок нестабільний і легко випадає в осад, особливо в присутності водовіднімаючих речовин (спирту, ацетону та ін.). Знаючи ІЕТ індивідуальних білків, можна підібрати сприятливі умови для осадження їх із біологічних рідин, тканинних екстрактів, що містять суміш різних білків, а також для одержання і очистки білкових препаратів.

3.2.2.1 Визначення ізоелектричної точки желатину

У 6 пробірок відповідно до таблиці 3.1 відміряють відповідний об'єм в мл розчинів оцтової кислоти, натрію ацетату, дистильованої води і желатину. Вміст кожної пробірки перемішують. Потім в кожну повільно по стінкам доливають по 2 мл 96% етилового спирту (або ацетону 95%). Через 30 хвилин визначають ізоелектричну точку. Вона буде відповідати рН пробірки із максимальним ступенем помутніння.

Таблиця 3.1 – Співвідношення компонентів реакційної суміші (мл) для визначення рН при визначенні ізоелектричної точки желатину

Вода	0,1 моль/л CH ₃ COOH	1 моль/л CH ₃ COOH	0,1 моль/л CH ₃ COONa	1% розчин желатина	рН
3,8	0,8	-	2,0	2,0	5,6
3,5	0,5	-	2,0	2,0	5,3
3,0	1,0	-	2,0	2,0	5,0
2,0	2,0	-	2,0	2,0	4,7
-	4,0	-	2,0	2,0	4,4
3,2	-	0,8	2,0	2,0	4,1

3.2.2.2 Визначення ізоелектричної точки казеїну

У шістьох пронумерованих пробірках готують буферні суміші з різним значенням рН. Вміст пробірок збовтують і в кожну додають по 0,5 мл 0,1%-вого розчину казеїну. Після цього суміш у пробірках знову збовтують і

відзначають величину помутніння розчину (див. нижче). Потім у кожну пробірку додають по 2 мл 95%-вого етилового спирту, збовтують і оцінюють ступінь мутності знаками «плюс» або «мінус»: відсутність осаду (–), наявність його (+), значне помутніння — декількома плюсами (не більше чотирьох). Ізоелектричну точку казеїну визначають за максимальним ступенем помутніння. У висновках слід визначити ІЕТ казеїну і можливість її практичного використання для виділення цього білка із молока (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2 – Хід визначення ІЕТ казеїну

№	Склад буферної суміші		рН суміші	Ступінь мутності	
	0,2 моль/л CH ₃ COOH, мл	0,2 моль/л CH ₃ COONa, мл		до додавання спирту	після додавання спирту
1	1,9	0,1	3,4		
2	1,8	0,2	3,8		
3	1,4	0,6	4,4		
4	1,0	1,0	4,7		
5	0,6	1,4	5,1		
6	0,2	1,8	5,7		

3.2.3 Висолювання білків

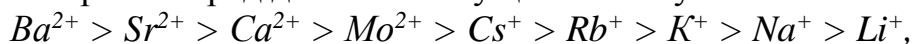
Водна оболонка утворює захисний шар для білкових частинок, не дозволяє їм збільшуватися й коагулювати. Важливим фактором стійкості білкових розчинів є однойменний електричний заряд частинок, що сприяє їх відштовхуванню.

Якщо до розчинів білків додавати солі лужних і лужноземельних металів, їхні іони адсорбуються молекулами білків, знімають з них електричні заряди й перетворюють їх на електронейтральні. Надалі колоїдні частинки укрупнюються, що зумовлює утворення осаду. Крім того, солі лужних металів, розчиняючись, зв'язують велику кількість води, що призводить до дегідратації білкової молекули. Втративши електричний заряд і гідратну оболонку, білки випадають в осад (седиментація).

Ступінь осадження білків солями лужних і лужноземельних металів залежить від радіуса іонів та від їх властивостей гідратуватися. Так, іони можуть бути розташовані рядами, які називаються ліотропними рядами катіонів і аніонів (рядами Гофмейстера). Для аніонів у більш лужному середовищі порівняно з ізоелектричною точкою білка (ІЕТ) це буде такий ряд:



Ліотропний ряд для катіонів у цих самих умовах має такий вигляд:



Осадження, або седиментація, білків методом висолювання в разі різного насичення та різних рН розчину залежить від різниці молекулярної маси, міри

дисперсності, іонної сили осаджувача й використовується для фракціонування білків, їх кристалізації, отримання очищених ферментних препаратів.

Так, глобуліни, маючи більшу молекулярну масу порівняно з і альбумінами, легше випадають в осад, Концентрованими розчинами амоній сульфату висолюються майже всі білки: глобуліни – у разі напівнасичення, альбуміни – повного насичення. Натрій і калій хлоридами, магній сульфатом осаджуються глобуліни в разі повного насичення, а в разі слабого підкиснення (в ізоелектричній точці) цими солями осаджуються й альбуміни.

3.2.3.1 Висолування білків сульфатом амонію

В центрифужну пробірку вносять 3 мл 10 % яєчного білка, 3 мл насиченого розчину амоній сульфату та перемішують. Через 5 хв суміш центрифугують протягом 3-5 хв за 3000 g. Центрифугат, що містить альбуміни, зливають у пробірку, а осад, до складу якого входять глобуліни, розчиняють у 2 мл 5 % NaCl. Цей розчин використовують для визначення глобулінів за допомогою біуретової реакції.

До центрифугату додають, помішуючи, кристалічний сульфат амонію до повного насичення розчину, тобто до появи на дні пробірки кристалів сульфату амонію. За цих умов у осад випадають альбуміни. Осад альбумінів відокремлюють центрифугуванням (3-5 хв за 3000 g). Вміст білка в фільтраті визначають за допомогою біуретової реакції. Негативна біуретова реакція свідчить про відсутність білка, тобто про повне осадження білків із розчину. Заповніть таблицю 3.3.

Таблиця 3.3 – Вплив амонію сульфату на осадження білка

Реактив, що застосовують для висолування	Ступінь насичення розчину амонію сульфатом	Фракція білків, що осаджується

3.2.3.1 Висолування білків натрій хлоридом

У пробірку наливають 3 мл 10 % розчину яєчного білка й додають порошок натрій хлориду до повного насичення розчину (поки нова порція порошку не залишиться нерозчинною). Через кілька хвилин з'являється осад глобулінів.

Вміст пробірки профільтрувати, у фільтраті залишаються альбуміни, які в нейтральних розчинах не випадають в осад навіть у разі додавання натрій хлориду до повного насичення.

До фільтрату додають 1 мл 1% розчину ацетату або 1 мл концентрованої оцтової кислоти, суміш нагрівають на водяній бані до кипіння. У слабкокислому середовищі альбуміни випадають в осад.

Через 2 хв альбуміни відфільтровують й перевіряють фільтрат на відсутність білка за допомогою кип'ятіння та біуретової реакції. Для цього у дві пробірки додають по 1 мл фільтрату. Пробірку № 1 ставлять на киплячу баню, а в пробірку № 2 додають біуретовий реактив. Через 3 хв проводять

спостереження. Негативна реакція (№ 1 – прозорий, № 2 – блакитний) в обох випадках вказує на відсутність білка. Заповніть таблицю 3.4.

Таблиця 3.4 – Вплив хлориду натрію на осадження білка

Реактив, що застосовують для висолювання	Ступень насичення розчину хлоридом натрію	Фракція білків, що осаджується

3.2.4 Діаліз білків

Діаліз – особливий вид розділення речовин за допомогою мембран, які не здатні пропускати через свої пори високомолекулярні колоїдні частинки. Молекули білків не проходять через напівпроникні мембрани (наприклад: целофан, пергамент, висушені плівки колодію та ін.). Тому діаліз є зручним методом очищення білка від низькомолекулярних органічних і неорганічних домішок.

Беруть невеликий квадратний аркуш целофану, замочують його в дистильованій воді і роблять з нього мішечок, закріплюючи між 2 скляними паличками за допомогою надітих на них гумових кілець. Дивись рисунок 3.1.

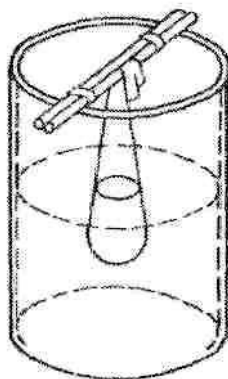


Рисунок 3.1 – Найпростіший діалізатор

Піпеткою в мішечок обережно вносять 5 мл 1%-вого розчину яєчного білка і 1 мл 10%-вого розчину амонію сульфату. Мішечок занурюють у склянку з дистильованою водою, поклавши палички на край склянки. Рівень рідини в мішечку не має бути вище від рівня рідини в склянці. Через годину після початку діалізу беруть дві проби (по 10 крапель) зовнішньої рідини (діалізат) і проводять з однією із них біуретову реакцію (див. роботу 1) на білок, а з другою – реакцію на сульфати, додаючи 2-3 краплі 5%-вого розчину барію хлориду. Потім проводять ці ж проби з рідиною, що знаходилась у середині мішечка. Роблять висновок, де описують які компоненти знаходяться в середині рідини мішечка і в діалізаті (зовнішня рідина) і пояснюють, з чим це пов'язано.

3.2.5 Денатурація білка

3.2.5.1 Денатурація білка органічними розчинниками

Органічні розчинники (спирт, ацетон та інші) зневоднюють колоїдні частинки білка, порушують гідрофобні взаємодії всередині білкової молекули і викликають її денатурацію, що призводить до зниження розчинності і осадження денатурованого білка. Короткочасна дія органічних розчинників при низькій температурі від 0 до 10°C зберігає білок в нативному стані.

У дві пронумеровані пробірки вносять 1 мл 10 % розчину яєчного білка і додають рівні об'єми органічних розчинників: у першу – 95% етиловий спирт, у другу – ацетон. Перемішують вміст пробірок, спостерігають помутніння розчинів. Якщо до них додати по 1 мл насиченого розчину натрію хлориду, через деякий час білок випадає в осад.

3.2.5.2 Денатурація білка органічними кислотами

Органічні кислоти здатні нейтралізувати заряд білка і руйнувати його просторову структуру, що призводить до денатурації і осадження білка. Реакції осадження білка трихлороцтовою (ТХО) та сульфосаліциловою кислотами знайшли широке практичне використання. Так, ТХО застосовують у кількісних аналізах для одержання безбілкових фільтратів, сульфосаліцилова кислота використовується в клінічних лабораторіях для виявлення білка в сечі, ексудатах та інших біологічних рідинах (чутливість 0,0015%).

У дві пробірки вносять 1 мл 10 % розчину яєчного білка і додають в одну з них 2 краплі 10 % розчину ТХО, а в другу – 2 краплі 10 % розчину сульфосаліцилової кислоти. В обох випадках спостерігається утворення осаду білка.

3.2.5.3 Денатурація білка концентрованими мінеральними кислотами

Кислоти, крім ортофосфорної, викликають дегідратацію білкових часток і їх нейтралізацію. Порушення просторової структури білка призводить до утворення осаду, у вигляді комплексних солей білка з кислотами.

У три пробірки вносять по 1 мл нітратної, хлоридної та сульфатної концентрованих кислот і обережно, тримаючи пробірку під кутом 45°, нашаровують на кислоту 0,5 мл 10 %-вого яєчного білка. На межі розподілу двох рідин з'являється осад у вигляді білкового кільця. Обережно струшують кожну з пробірок та роблять висновок, зазначаючи ефект реакції.

Реакцію осадження білків нітратною кислотою використовують у клінічних дослідженнях сечі (проба Геллера). Ця якісна реакція лежить в основі кількісного і якісного визначення білка в сечі по методу Робертса-Стольникова-Брандберга.

3.2.5.4 Денатурація білка важкими металами

Білки при взаємодії з солями важких металів (купруму, плюмбуму, меркурію, цинку, аргентуму та інш.) утворюють нерозчинні у воді комплексні сполуки. Ці йони зв'язуються з функціональними групами білкових радикалів амінокислот у молекулі білка, у результаті чого руйнується його просторова структура і відбувається осадження денатурованого білка. При додаванні надлишку солей важких металів, крім аргентуму нітрату і меркурію (II)

хлориду, відзначають розчинення первісно утвореного осаду через адсорбцію йонів металу на поверхні денатурованого білка і виникнення позитивного заряду на частинках білка (адсорбційна пептизація). При цьому білок у розчині залишається денатурованим.

У три пробірки вносять по 1 мл 1 %-вого розчину яєчного білка. У першу додають 1-2 краплі 5%-вого розчину купруму сульфату, у другу – 1-2 краплі 1% розчину аргентуму нітрату, а в третю – 1-2 краплі 1%-вого розчину плюмбуму ацетату. Спостерігають за появою осаду. Потім додають у кожну з пробірок надлишок відповідного осаджувача і спостерігають за змінами в осаді. Внаслідок додавання надлишку купрум (II) сульфату та плюмбум ацетату осад, що утворився, розчиняється.

Результати заносять у таблицю 3.5 і роблять висновок.

Таблиця 3.5 – Вплив йонів важких металів на осадження білка

Реактив осаджувач	Ефект при додаванні білку	Надлишок реактиву
CuSO_4		
$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$		

3.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Чим обумовлений заряд білків у водному розчині? Назвіть білки основного та кислотного характеру.
2. Що таке ІЕТ білка?
3. Чому в ізоелектричній точці білки випадають в осад?
4. Які основні фактори забезпечують стабільність молекул білка в розчині?
5. Що таке денатурація білків?
6. Що таке висолювання білків?
7. Чим відрізняється денатурація від висолювання?
8. Фактори, що викликають денатурацію білків?
9. Що таке діаліз?
10. Якими методами можна вивільнити розчин білку від низькомолекулярних речовин?
11. Дано 3 пробірки з розчинами різних білків:
 - А) розчин альбуміну
 - Б) суміш альбуміну і глобуліну
 - С) розчин глобуліну.
12. Використовуючи метод висолювання амонію сульфатом, визначити, які білки містяться в кожній пробірці.
13. Значення реакції осадження білків у харчовій промисловості.
14. Чи відбувається гідроліз білків у живій клітині? Відповідь обґрунтуйте.
15. Які умови хімічного гідролізу білка?
16. Як можна впевнитися, що гідроліз відбувся?

Лабораторна робота № 4

Складні білки: глікопротеїни та нуклеопро­теїни

4.1 Мета: виділити і дослідити будову, властивості глікопротеїнів та нуклеопро­теїнів.

4.2 Короткі теоретичні відомості

Складні білки (гемопро­теїни, фосфопро­теїни, глікопро­теїни, нуклео­про­теїни) можна розглядати як комплекси, що складаються з простого білка і різноманітних небілкових компонентів. Тому виявити і провести кількісне визначення їх в біологічному матеріалі можливо, якщо аналізувати як білкову так і небілкову частину складної молекули.

Глікопро­теїни. Молекули глікопро­теїнів при гідролізі розщеплюються на простий білок і вуглеводну простетичну групу, яка зазвичай складається з гіалуронової і хондроїтин­сірчаної кислот, гепарина, деяких глікополісахаридів. При гідролізі простетичної групи утворюються гексози маноза, галактоза, глюкоза, гексозаміни глюкозамін, галактозамін і кислоти глюкуронова, оцтова, сірчана. Зв'язок у молекулі глікопро­теїду між білковою частиною і простетичною групою міцний і розривається тільки після тривалого кислотного або ферментативного гідролізу. Він зазвичай формується за рахунок взаємодії вуглеводного компоненту з COOH-групою залишку аспарагінової кислоти. Найбільш поширені в організмах муцини і мукоїди. Мукоїди – глікопро­теїни хрящової хондромукоїди і кісткової остеомукоїди тканин, яєчного білка овомукоїд, синовії, склоподібного тіла ока, зв'язок і сухожиль і т.д. Значення їх різноманітне і визначається функцією органу і тканини.

До глікопро­теїнів відносяться деякі гормони передньої частини гіпофіза – тиреотропін і фолікуло­стимулюючий, речовини які визначають групу крові, імуноглобуліни, деякі білки крові і тканин протромбін, ферменти та ін.

Для якісного та кількісного визначення використовують реакції на вуглеводні компоненти. Якісні реакції на вуглеводні компоненти глікопро­теїнів використовуються для виявлення та кількісного визначення їх в різних біологічних матеріалах і лікарських засобах (хонсурид, склоподібне тіло, гонадотропіни та ін.).

Нуклеопро­теїни – комплекс нуклеїнових кислот з білками. Нуклео­про­теїни поділяють на дезоксирибонуклеопро­теїни (ДНП) та рибонуклео­про­теїни (РНП), в яких ДНК або РНК електростатично зв'язані з білками за участю фосфатних груп. ДНП добре розчиняються в лужних та сольових розчинах і осаджуються після нейтралізації або розведення розчинів. РНП також розчиняються в лужних розчинах і можуть осаджуватись в ІЕТ шляхом додавання органічних кислот, наприклад оцтової. При нетривалому гідролізі нуклеопро­теїни розпадаються на білок і нуклеїнові кислоти, а при тривалому гідролізі білки розпадаються до пептидів і амінокислот, а нуклеїнові кислоти – до своїх основних компонентів: нуклеїнових основ (аденін, гуанін, цитозин, урацил, тимін), рибози або дезоксирибози та фосфатної кислоти. ДНК і РНК

схожі за будовою, але певним чином відрізняються за складовими компонентами: ДНК містить тимін, а РНК – урацил; у ДНК вуглеводна частина представлена дезоксирибозою, а в РНК – рибозою. Тому за специфічними кольоровими реакціями на ці пентози можна виявляти відповідні нуклеїнові кислоти й нуклеотиди: наприклад, дифеніламінова проба виявляє дезоксирибозу, даючи синє забарвлення, а з рибозою – зелене; орцинова реакція відкриває рибозу, даючи зелене забарвлення.

В експериментальній біохімії використовують методи виділення і очистки нуклеопротейнів і нуклеїнових кислот, застосовуючи різні умови для їх осадження із біологічної сировини. В основу якісного і кількісного їх визначення в біологічному матеріалі покладено кольорові реакції на нуклеїнові основи і на пентози, наприклад, орцинова проба на рибозу і дифеніламінова на дезоксирибозу. У клінічній цитології дифеніламінову пробу на пентози використовують при нативному забарвлюванні нуклеїнових кислот, наприклад у мазках клітин крові.

4.3 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: концентрована оцтова кислота, 10 % NaOH, 5 % CuSO_4 , 1 % спиртовий розчин α -нафтолу, концентрована сульфатна кислота, 1,5 г селезінки (або іншої тканини: зобної залози, молока риб), 100 мг скляного порошку, 5 % розчин натрію хлориду, що містить 0,04 % тризаміщеного натрію цитрату, 0,2 % розчин натрію гідроксиду, 5% розчин сульфатної кислоти, сухі дріжджі, 0,4 % розчин натрію гідроксиду, 5 % розчин оцтової кислоти, 0,02 моль/л натрію гідроксиду, 10 % розчин сульфатної кислоти, біуретовий реактив, 30% розчину натрію гідроксиду, 5 % розчин купруму (II) сульфату, 2% амоніачного розчину аргентум нітрату, розчин амонію молібдату.

4.3.1 Виділення муцину із слини і відкриття в ньому вуглеводного компонента

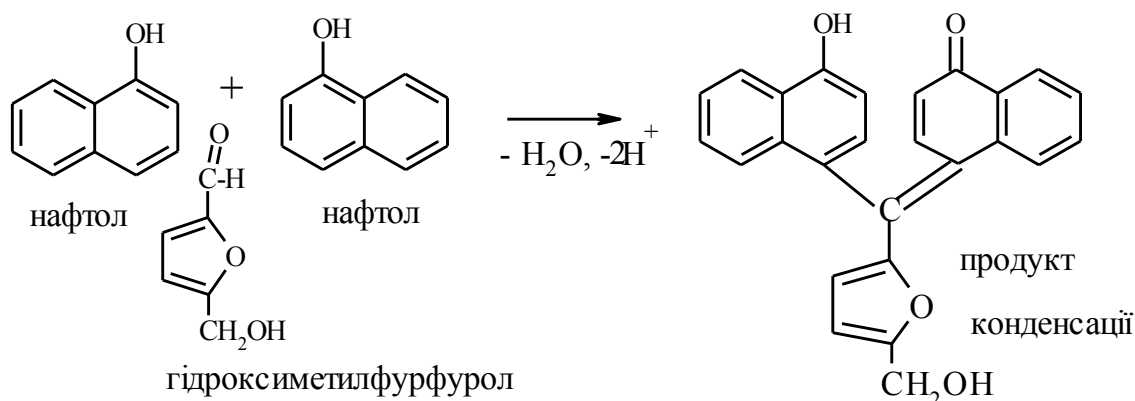
Муцини – глікопротеїди, слизові виділення епітеліальних покривів слизових оболонок харчового каналу, дихальних і сечостатеєвих шляхів, слинних залоз. Виконують захисну функцію, оберігаючи оболонки від механічних і хімічних пошкоджень. Стійкі до гідролізу.

4.3.1.1 Виділення муцину із слини. У пробірку збирають 1-2 мл слини і краплями (10-20 крапель) приливають концентровану оцтову кислоту, помішуючи вміст пробірки скляною паличкою. Випадає осад муцину. Згусток притискають до стінки пробірки скляною паличкою і промивають водою.

4.3.1.2 Визначення пептидів у муцині. Згустки муцину кладуть у пробірку і проводять біуретову реакцію: додають 1-2 мл 10 % NaOH і одну краплю 5 % CuSO_4 . Спостерігають зміну забарвлення.

4.3.1.3 Виявлення вуглеводів у муцині – реакція Подобєдова.

Із гексоз, що входять до складу глікопротеїнів, у присутності концентрованої сульфатної кислоти утворюється гідроксиметилфурфурол, який з α -нафтолом дає продукт конденсації червоно-фіолетового кольору:



До муцину додають 10-20 крапель 1 % спиртового розчину α -нафтолу і по стінці пробірки, нахиливши її, обережно нашаровують 20 крапель концентрованої сульфатної кислоти. При стоянні утворюється червоно-фіолетове кільце.

4.3.2 Виділення, якісні реакції нуклеопроїдів

4.3.2.1 Одержання дезоксирибонуклеопроїдів (ДНП)

Ці комплекси у великій кількості містяться в селезінці, зобній залозі, печінці та інших органах і тканинах, багатих на ядра. ДНП добре розчиняються в лугах та солевих розчинах і випадають в осад при нейтралізації або розведенні розчинів солей.

1,5 г селезінки (або іншої тканини: зобної залози, молоки риб) подрібнюють у ступці зі 100 мг скляного порошку та з 35 мл 5 % розчину натрію хлориду, що містить 0,04 % тризаміщеного натрію цитрату, протягом 15 хв. Суміш переносять в центрифужні пробірки та центрифугують 15 хв при швидкості 3000 об/хв. До шестикратного об'єму відносно до фільтрату (210 мл), при помішуванні скляною паличкою, повільно, тонкою цівкою вливають центрифугат. Нерозчинені у воді ДНП випадають в осад у вигляді ниток. Нитки збирають на паличку або, якщо утворюється осад, фільтрують, і частину їх розчиняють в 0,2 % розчині натрію гідроксиду.

4.3.2.2 Гідроліз дезоксирибонуклеопроїдів

В колбу для гідролізу поміщають частину осаду ДНП додають 30-40 мл 5% розчину сульфатної кислоти, закривають колбу пробкою із скляною трубкою (як холодильник) і обережно кип'ятять на азбестовій сітці або піщаній бані протягом 30-40 хв.

Отриманий гідролізат охолоджують та використовують для відкриття складових компонентів ДНК у наступній роботі.

4.3.2.2 Одержання лужного розчину рибонуклеопроїдів (РНП)

10 г сухих дріжджів ретельно розтирають в ступці протягом 15 хв, із 50 мл 0,4 % розчину натрію гідроксиду, який додають невеликими порціями і

центрифугують 10 хв при швидкості 3000 об/хв. До центрифугату доливають при помішуванні 15-20 мл 5 % розчину оцтової кислоти, випадає осад, його відділяють центрифугуванням. Осад розчиняють у 15 мл розчину 0,02 моль/л натрію гідроксиду.

4.3.2.2 Одержання гідролізату рибонуклеопротейідів

У колбу з круглим дном для гідролізу вміщують 2,5 г пекарських дріжджів, доливають 20 мл 10 % розчину сульфатної кислоти та 20 мл дистильованої води, колбу закривають пробкою зі зворотним холодильником, кип'ятять під тягою протягом 1 години на пісчаній бані при слабкому нагріванні. Після закінчення гідролізу рідину охолоджують, додають води до одержання початкового об'єму й фільтрують.

Одержаний розчин РНП використовують для проведення якісних реакцій.

4.3.3 Якісні реакції на компоненти нуклеїнових кислот

У біохімічних дослідженнях кольорові реакції на складові частини нуклеїнових кислот та їх похідні застосовують для ідентифікації і кількісного визначення. Нуклеопротейіди вступають у специфічні кольорові реакції з рядом речовин; це дає змогу визначити їх складові компоненти.

4.3.3.1 Відкриття білків у складі нуклеопротейінів

У дві пробірки вносять по 0,5 мл гідролізату ДНП та РНП, нейтралізують (за лакмусом) 10 % розчином натрію гідроксиду, потім додають 5 крапель біуретового реактиву або 2 краплі 1 % розчину купрум (II) сульфату. Спостерігають за появою червоно-фіолетового забарвлення, що свідчить про наявність у пробі поліпептидів, які утворюються внаслідок гідролізу білкової частини нуклеопротейідів.

4.3.3.2 Відкриття пентоз у складі нуклеопротейідів

А. Проба Троммера на рибозу і дезоксирибозу

До 0,5 мл гідролізату ДНП та РНП додають 1 мл 30% розчину натрію гідроксиду та 1-3 краплі 5 % розчину купрум (II) сульфату до утворення купрум (II) гідроксиду (уникати надлишку), перемішати. Нагрівають до кипіння. У випадку присутності моносахаридів (пентоз) утворюється червоний осад купрум (I) оксиду. Написати рівняння реакції.

Б. Реакція рибози з орцином

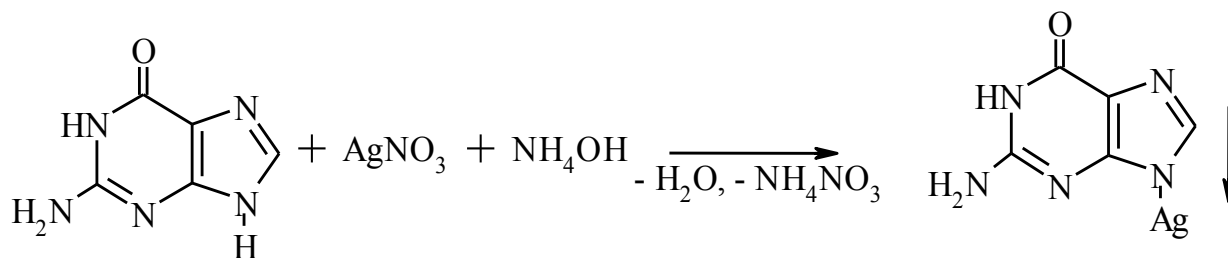
Нуклеопротейіди, що містять рибозу дають з орциновим реактивом синьо-зелене забарвлення. До 1 мл лужного розчину РНП додають рівний об'єм орцинового реактиву, перемішують і кип'ятять на водяній бані впродовж 20 хв. Суміш охолоджують та розводять водою до загального об'єму 4 мл. Відзначають появу забарвлення.

В. Реакції дезоксирибози і рибози з дифеніламіном

У пробірку вносять 1 мл лужного розчину ДНП, додають рівний об'єм дифеніламінового реактиву. Суміш нагрівають на водяній бані 15 хв, Під час нагрівання дезоксирибонуклеопротейіди гідролізуються, а звільнена дезоксирибоза реагує з дифеніламіном і утворює синє забарвлення. У другій пробірці нагрівають лужний розчин РНП з дифеніламіновим реактивом. Суміш забарвлюється в зелений колір, що свідчить про наявність рибози.

4.3.3.3 Відкриття пуринових основ (аденіну та гуаніну)

Пуринові основи з амоніачним розчином аргентум нітрату утворюють пухкий світло-коричневий осад:



У дві пробірки вносять по 1 мл гідролізату, відповідно ДНП або РНП і приливають краплями концентрований розчин амоніаку до лужної реакції на лакмус. Потім додають 1 мл 2 % амоніачного розчину аргентуму нітрату. При стоянні утворюються світло-коричневі осадки сполук аргентуму та пуринових основ.

4.3.3.4 Відкриття ортофосфатної кислоти

Ортофосфатну кислоту визначають за реакцією з амонієм молібдатом.

У дві пробірки вносять по 1 мл гідролізату ДНП та РНП, додають 1 мл розчину амонію молібдату та кип'ячать. Рідина забарвлюється в лимонно-жовтий колір, а внаслідок охолодження випадає кристалічний осад жовтого кольору, який зумовлений фосфорномолібденовокислим амонієм:



4.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. В чому відмінність складних білків від простих?
2. Дайте визначення терміну “нуклеїнові кислоти”. Їх біологічна роль.
3. Що називають первинною та вторинною структурою нуклеїнових кислот?
4. Чим зумовлені в ДНК стійкість спадкової інформації і пластичність її передачі?
5. Дайте визначення нуклеотидів і нуклеозидів. Яка роль вільних нуклеотидів у клітині?
6. Напишіть схему повного розпаду РНК-протеїнів та ДНК-протеїнів. Назвіть ферменти, які прискорюють ці процеси.
7. Назвіть якісні реакції на складові компоненти нуклеїнових кислот.

Лабораторна робота № 5

Ферменти, їх будова, властивості та функції. Активатори та інгібітори ферментів

5.1 Мета: оволодіти методикою визначення властивостей та функцій ферментів.

5.2 Короткі теоретичні відомості

Ферменти (ензими)- це біологічні каталізатори білкової природи. Вони можуть бути прості (складаються тільки з білка) і складні, які містять крім білку активну групу небілкової природи (кофактор). Кофактори ферментів поділяють на коферменти, простетичні групи та активатори. У тривимірній структурі ферменту (простого чи складного білка) розрізняють ряд ділянок, що виконують певну функцію. **Активний центр** – це місце в просторовій структурі ферменту, яке забезпечує приєднання субстрату до ферменту і його хімічні перетворення. Активний центр простого ферменту складається із сукупності залишків радикалів амінокислот. Наприклад, фермент ацетилхолін-естераза (АХЕ) має у своєму активному центрі радикали чотирьох амінокислот: серину, гістидину, тирозину і глутамінової кислоти.

В активному центрі можна виділити дві функціональні частини:

а) *посадочна*, або субстратна (якорна), що відповідає за приєднання субстрату;

б) *каталітична* – сукупність хімічних угруповань, що забезпечують хімічні перетворення субстрату або субстратів.

Активний центр визначає специфічність і каталітичну активність ферменту.

Багато ферментів, особливо четвертинної структури (олігомерні ферменти), мають ще й регуляторні центри, які одержали назву **алостеричних**. Аlostеричний центр являє собою ділянку, яка в молекулі ферменту просторово віддалена від активного центру (з грецьк. *allos* – інший, чужий). До аlostеричного центру можуть приєднуватися різні хімічні речовини, що отримали назву аlostеричних ефекторів, або модуляторів; при цьому вони змінюють просторову конформацію ферменту (третинну, четвертинну структуру), переводячи фермент в активну або неактивну форму, тобто сприяють або перешкоджають утворенню активного центру. Модуляторами можуть бути гормони, продукти їх обміну, медіатори, проміжні і кінцеві продукти реакцій (метаболіти) та ін. Ферменти, активність яких контролюється станом активного та аlostеричного центрів називаються **алостеричними ферментами**.

В організмі людини знайдено понад 2000 різних ферментів, що каталізують перетворення безлічі субстратів. Усі ферменти розподілені на шість *класів* залежно від типу хімічних реакцій, які вони каталізують:

1. **О к с и д о р е д у к т а з и** каталізують окисно-відновні процеси.
2. **Т р а н с ф е р а з и** каталізують перенос певних хімічних груп від одного субстрату на інший.
3. **Г і д р о л а з и** каталізують реакції гідролізу, тобто розщеплення субстрату, що супроводжується приєднанням молекул води.
4. **Л і а з и** каталізують розпад органічних сполук негідролітичним шляхом, що супроводжується утворенням подвійного зв'язку, або, навпаки, приєднанням груп до місця подвійного зв'язку.
5. **І з о м е р а з и** прискорюють реакції ізомеризації.

6. Л і г а з и каталізують реакції синтезу складних органічних речовин із простих з використанням енергії розщеплення АТФ.

У кожному класі є *підкласи*, що характеризують функціональні групи субстрату, на який діє даний фермент. Підкласи діляться на *підпідкласи*, які деталізують тип реакцій у кожному підкласі і визначаються акцепторами або типом сполук, на які діє фермент.

Кожний фермент має свій *шифр* із чотиризначного числа, де перша цифра означає клас, друга – підклас, третя – підпідклас, а четверта цифра — порядковий номер ферменту в цьому підпідкласі. Наприклад, пепсин має класифікаційний номер – КФ 3.4.4.1, де 3 – клас: «гідролази»; 4 – підклас: «реакції гідролізу пептидного зв'язку білка»; 4 – підпідклас: «розрив пептидного зв'язку, утвореного ароматичними амінокислотами»; 1 – порядковий номер ферменту в цьому підпідкласі.

Ензими містяться в усіх тканинах, клітинах і біологічних рідинах організму. Ферменти мають величезне значення для життєдіяльності організму. Без них хімічні реакції йшли б повільно, а це не сумісне з тим рівнем обміну речовин, що властивий живій матерії. При цьому фермент не викликає ніяких надприродних реакцій, термодинамічно вони можливі і без ферменту, але швидкість їх може бути незначною, і реакції затягуються на години, місяці, роки. Ферменти, завдяки вмісту різних функціональних груп білків і кофакторів, здатні здійснювати хімічні реакції на суттєво зниженому ергетичному рівні порівняно з іншими небіологічними каталізаторами. Завдяки ферментам хімічні реакції проходять не хаотично, а взаємопов'язано та взаємообумовлено.

Вивчення ферментів має не лише фундаментальне, але й практичне значення для багатьох галузей хімічної, харчової, біотехнологічної та фармацевтичної індустрії, що займаються виготовленням каталізаторів, антибіотиків, гормонів, вітамінів і багатьох інших біологічно активних речовин, які використовуються в народному господарстві та медицині.

Надзвичайно висока ефективність ферментів як прискорювачів хімічних процесів, тонка їх специфічність і регуляторна функція обумовлені білковою природою ферментів, їх структурно-макромолекулярною організацією в організмі і залежить від умов середовища, в якому перебігають біокаталітичні реакції.

Розробка методів виділення та очищення ферментів надала можливість одержувати їх в чистому кристалічному вигляді, а також дозволила вивчити структуру ферментів, активні та регуляторні центри їх молекул, механізм дії, а також умови максимального прояву їх активності.

Ферменти відрізняються від небіологічних каталізаторів (кислот, лугів, металів та інших) наявністю високої ефективності каталізу, специфічністю дії, урегульованістю, здатністю діяти в м'яких умовах. Саме ці особливості дозволяють ферментам виконувати їх унікальні функції та забезпечувати життєдіяльність клітин.

Речовини, що змінюють активність ферментів, поділяються на активатори та інгібітори. Вони стимулюють або пригнічують активність ферменту, впливаючи на його активний чи алостеричний центри. Активатори деяких ферментів: для амілази слини – натрію хлорид, для пепсину – йони H^+ (хлоридної кислоти), для ліпази – жовчні кислоти, для АТФаз – Mg^{2+} та Mn^{2+} . Інгібіторами часто є продукти проміжних або кінцевих реакцій певного біохімічного процесу (метаболітне інгібування). Деякі природні і синтетичні речовини вибірково гальмують дію ферментів і застосовуються як лікарські засоби. У великих дозах подібні речовини можуть бути отрутами. Модифікуюча дія різних сполук на активність ферменту визначається шляхом кінетичних дослідів. Інгібітори різних ферментів широко використовуються в біохімічних дослідженнях, у практичній медицині і в сільському господарстві, харчовій промисловості.

У сільському господарстві деякі інгібітори ферментів використовуються як високоефективні інсектициди (хлорофос, тіофос та ін.). Вибіркове інгібування ферментів деякими природними і синтетичними сполуками (так званими *антиметаболітами*) у даний час служить основою для розробки цілеспрямованих ефективних методів синтезу хіміотерапевтичних препаратів. Прикладом антиметаболітного (різновид конкурентного) інгібування активності ферментів є сульфаніламідні препарати.

Метаболіти – природні субстрати, що входять у нормі до складу живих організмів (білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи, ліпіди, вітаміни, гормони та інші, а також продукти їх тканинного перетворення та ін.).

Антиметаболіти – це сполуки, що, як правило, мають структурну схожість з метаболітами і конкурують з ними за фермент. При цьому утворюються комплекси ферменту з антиметаболітами. Але нормальна ферментативна реакція не відбувається.

Сульфаніламідні препарати є антиметаболітами парааміно-бензойної кислоти (ПАБК), яка є метаболітом, що синтезується мікроорганізмами.

Конкурентне інгібування активності ферментів спостерігається в тому випадку, коли інгібітор має схожу до субстрату будову і може зв'язуватися з посадочною ділянкою активного центру ферменту, тим самим перешкоджає утворенню фермент-субстратного комплексу. Фермент стає неактивним. При конкурентному інгібуванні інгібітор і субстрат конкурують за активний центр ферменту: з активним центром зв'язується та сполука, концентрація якої більша. Конкурентне інгібування – це процес зворотний, надлишок субстрату витісняє інгібітор з активних центрів молекул ферменту, тим самим повертає їм здатність до каталізу.

Неконкурентне інгібування має місце, коли інгібітор зв'язується безпосередньо з каталітичними групами активного центра ферменту або з ферментом поза активним центром, змінюючи конформацію активного центра, що заважає взаємодії ферменту із субстратом. Неконкурентне гальмування є важкооборотним. Зняти дію неконкурентного інгібітора надлишком субстрату не-можливо, а можливо лише речовинами (реактиваторами), що зв'язують

інгібітор, звільняючи при цьому активний центр ферменту. Неконкурентні інгібітори застосовуються як лікарські засоби і як отруйні речовини для боротьби з шкідниками сільського господарства.

Актуальні і перспективні напрямки є розробка біологічно активних добавок до їжі, що чинять направлений вплив на ферментативні процеси в організмі, корегують ферментативну активність в організмі людини, які містять рослинні ферменти та інгібітори травних ферментів.

5.3 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: 0,5 % розчину свіжоприготовленого крохмалю, 0,1 % розчин йоду, реактив Фелінга, 10 % розчин хлоридної кислоти, пивні дріжджі, скляний пісок, розчин сахарози, 0,01 % розчин уреазу, 5 % розчин сечовини, спиртовий розчин фенолфталеїну, 1 % розчин натрію хлориду, 1 % розчин купруму сульфату, 1 % розчин крохмалю, 1 % розчин натрію азиду (NaN_3), 3 % розчин гідроген пероксиду.

5.3.1 Дія α -амілази (α -1,4-глюкан-4-глюканогідролази) на крохмаль

Фермент амілаза каталізує гідроліз крохмалю до декстринів і мальтози. Такий процес відбувається, наприклад, у ротовій порожнині при вживанні з їжею продуктів, що містять крохмаль: картоплі, хліба, макаронних виробів. Джерелом амілази може бути слина, що містить α -амілазу, яка діє на внутрішні α -1,4-глікозидні зв'язки крохмалю і глікогену їжі. Цей фермент знаходиться і в інших відділах травного тракту, а також у печінці та інших тканинах. Різні типи амілаз використовуються в харчовій промисловості, наприклад, у пивоварній, де їх джерелом є рослини (ячмінь). Дію амілази розпізнають за зникненням синього забарвлення, яке утворюється при додаванні йоду.

Гідроліз крохмалю α -амілазою проходить через ряд стадій. Нерозщеплений крохмаль з йодом дає синє забарвлення. Декстрини, залежно від розміру їх молекули: амілодекстрини – фіолетове; еритродекстрини – червоне; ахродекстрини та мальтоза – не мають забарвлення (жовте забарвлення, пов'язане з забарвленням самого розчину йоду). Кінцевий продукт ферментативного гідролізу крохмалю – мальтозу – можна визначити відновленням у лужному середовищі двовалентного купруму (при проведенні реакції Фелінга).

У пробірку збирають приблизно 1 мл слини і додають 9 мл води. Цю суміш використовують і в інших дослідах. У пробірку вносять 5 мл 0,5 % розчину свіжоприготовленого крохмалю і 10 крапель розведеної в 10 раз слини, добре перемішують. На предметне скло скляною паличкою швидко наносять 1-2 краплі суміші з пробірки і 1 краплю 0,1 % розчину йоду. З'являється синє забарвлення. Потім пробірку поміщають на водяну баню при 38 °C і через кожні 30-60 с (за секундоміром) перевіряють вміст пробірки реакцією з йодом, використовуючи скляну пластинку, доки не змінить жовтого кольору розчин йоду. Після проведення гідролізу відкривають мальтозу. Для цього в окрему

пробірку вносять 2-3 мл гідролізату, 1 мл реактиву Фелінга і нагрівають верхній шар до кипіння. Визначають утворення червоного (Cu_2O) або жовтого (CuOH) осаду.

5.3.2 Порівняльна дія α -амілази слини та небіологічного каталізатора хлоридної кислоти на гідроліз крохмалю

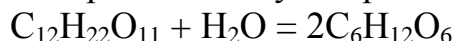
Метод ґрунтується на порівнянні швидкості гідролізу крохмалю в присутності ферменту та небіологічного каталізатора хлоридної кислоти.

Нумерують три пробірки, у першу з них вносять 1 мл води, у другу – 1 мл 10 % розчину хлоридної кислоти, у третю – 1 мл розбавленої в 10 раз слини. В усі пробірки приливають 5 мл 0,5 % розчину крохмалю, перемішують їх вміст скляною паличкою і ставлять першу та третю пробірки на водяну баню при 38°C , а другу – у киплячу баню. Через 15 хв пробірки охолоджують. Із кожної пробірки відбирають по 1 мл в інші пробірки, додають 1–2 краплі розчину йоду, порівнюють забарвлення проб і дають пояснення.

Для визначення мальтози відбирають по 3 мл рідини із кожної пробірки, додають по 1 мл реактиву Фелінга і нагрівають верхній шар суміші до кипіння. Відзначають появу в пробах осаду купруму (I) оксиду і дають пояснення.

5.3.3 Дія сахарози

Сахароза каталізує гідроліз сахарози до глюкози та фруктози:



Моносахариди, які утворюються, визначають реакцією Фелінга. Сахароза не містить вільної альдегідної групи й тому не має відновних властивостей.

Приготувати препарат сахарози: 5 г пивних дріжджів розтирають у фарфоровій ступці з 2-3 мл дистильованої води та невеликою кількістю скляного піску, додають 8-10 мл води та фільтрують через вату.

У дві пробірки наливають по 1 мл препарату ферменту. Вміст однієї з них (контроль) кип'ятять протягом 3 хв для руйнування сахарози, після чого в обидві пробірки додають (охої лоджені) по 3 мл розчину сахарози, добре перемішують і ставлять і у термостат за температури 38°C . Через 15 хв у пробірки вносять по 2 мл реактиву Фелінга, перемішують і нагрівають до кипіння! У контрольній пробірці осаду немає, а в пробірці з активним ферментом утворюється червоний осад купрум геміоксиду.

5.3.3 Вивчення кінетичних властивостей ферменту на прикладі α -амілази

Цей розділ ензимології вивчає залежність швидкості ферментативної реакції від хімічної природи реагуючих речовин (субстратів і ферментів), від умов їх взаємодії: концентрації компонентів, рН середовища, температури, складу середовища, наявності кофакторів, активаторів та інгібіторів тощо. Кінетичні властивості ферментів зумовлені перш за все їх білковою природою.

Вивчення кінетичних властивостей ферментів необхідне для підбору оптимальних умов дії ферментів при визначенні їх активності в наукових та практичних дослідженнях, а також для проведення аналізу ферментативних препаратів, їх стандартизації.

5.3.3.1 Залежність ферментативної реакції від кількості ферменту

Метод ґрунтується на визначенні швидкості гідролізу крохмалю в залежності від кількості α -амілази (залишок крохмалю визначається за реакцією з йодом).

Нумерують чотири пробірки і вносять у кожен по 1 мл різного ступеня розведення розчину слини (в 20, 40, 80 і 160 раз), тобто, наприклад, до 1 мл слини додають 19 мл води і т. д. У кожен пробірку додають по 5 мл 0,5 % розчину крохмалю, пробірки швидко перемішують, поміщають їх на водяну баню при 38 °С і засікають час початку реакції. Кожні 1-2 хв на скляну пластинку (предметне скло) відбирають по 1-2 краплі рідини з кожної пробірки, до неї додають 1 краплю 0,1 %-вого розчину йоду. Спочатку проби дають синє, фіолетове, червоно-фіолетове, а наприкінці – червоне забарвлення (еритродекстрини). Відмічають час від початку досліду і до появи в кожній із чотирьох пробірок червоного забарвлення. Дають пояснення. Результати досліду можна показати графічно, відкладаючи на осі абсцис відносну концентрацію α -амілази (розведення) і на осі ординат – час утворення еритродекстринів в хвилинах.

5.3.3.2 Залежність швидкості ферментативної реакції від температури

При підвищенні температури швидкість ферментативних реакцій збільшується, як і швидкість більшості хімічних реакцій (з підвищенням температури на 10 °С швидкість реакції збільшується у 2-3 рази). На відміну від неферментативних процесів збільшення швидкості ферментативних реакцій спостерігається у вузькому інтервалі температур. Температура, при якій спостерігається максимальна швидкість реакції, називається *оптимальною*. Найчастіше вона дорівнює 37-40 °С; після досягнення 40-50 °С швидкість більшості ферментативних процесів починає падати. Це пояснюється тепловою денатурацією білкової молекули ферменту і втратою ним каталітичної активності (порушується активний центр ферменту). При низьких температурах ферменти добре зберігаються, але швидкість ферментативного каталізу різко знижується. На цьому засноване зберігання харчових продуктів та фармпрепаратів, а також лікарських форм, що швидко псуються.

Дослідження термолабільності амілази слини.

У пробірку вливають 2 мл розведеної слини і кип'ятять на відкритому вогні протягом 2 хв. Вміст пробірки охолоджують.

У три інші пробірки вносять по 5 мл 0,5% розчину крохмалю. У пробірку № 1 додають кип'ячену слину, а в пробірки № 2 і № 3 по 2 мл розведеної некип'яченої слини. Пробірку № 2 ставлять на 10 хв на водяну баню за температури 37 °С. Пробірку № 3 поміщають на 10 хв у холодну воду з льодом. Після інкубації вміст кожної пробірки розподіляють порівну. До відібраних проб додають по 3-5 крапель розчину йоду в калій йодиді і спостерігають за зміною забарвлення. З пробами, що залишилися, проводять реакцію з реактивом Фелінга. Пояснити отримані результати, зробити висновок, результати записати в робочий зошит.

Вплив температури на активність уреаз

За різних значень температури уреаз неоднаково гідролізує сечовину, внаслідок чого утворюється різна кількість NH_3 , що зумовлює, неоднакову інтенсивність забарвлення його розчинів за наявності фенолфталеїну.

У три пробірки наливають по 3 мл препарату або 0,01 % розчин уреаз. Розчин у першій пробірці кип'ятять 5 хв. Потім у всі пробірки додають по 1 мл 5 % розчину сечовини й по п'ять краплин спиртового розчину фенолфталеїну. Другу пробірку швидко ставлять у лід, а третю пробірку – в термостат за температури 20-25 °С.

У другій і третій пробірках внаслідок утворення аміаку розчин за наявності фенолфталеїну набуває рожевого забарвлення. Інтенсивність і час появи забарвлення залежить від температури. Швидше з'явиться й буде інтенсивнішим забарвлення в третій пробірці, що інкубувалася за оптимальної температури, пізніше – в другій пробірці, й зовсім не забарвиться розчин у першій пробірці, де фермент інактивований.

5.3.4 Активатори та інгібітори α -амілази

В організмі дія ферментів регулюється різноманітними механізмами: інтенсивністю синтезу каталітичних білків генетичним апаратом, їх руйнуванням продуктами реакції каталізу, гормонами й іними факторами. Важливу роль відіграють активатори та інгібітори ферментів, які впливають на їхні різні ділянки або беруть участь в утворенні тимчасових комплексів із субстратами. Активатори та інгібітори дії ферментів використовуються для регуляції відповідних технологічних процесів, наприклад, замішування тіста, а також, у медичній практиці, для припинення життєдіяльності мікроорганізмів або підвищення недостатньої активності ензимів у тканинах, наприклад, у підшлунковому соку.

Метод ґрунтується на порівнянні швидкості гідролізу крохмалю α -амілазою в присутності води, Cl^- , Cu^{2+} .

У три пронумеровані пробірки вносять по 5 крапель: у першу – дистильованої води, у другу – 1 %-вого розчину натрію хлориду, у третю – 1 % розчину купруму сульфату. В усі пробірки додають по 1 мл 1 % розчину крохмалю і по 5 крапель розведеної слини. Вміст пробірок добре перемішують, поміщають їх у водяну баню при 38 °С. Через 3-5 хв пробірки виймають і додають 1 краплю 0,1 % розчину йоду. Відзначають забарвлення і роблять висновки.

5.3.5 Неконкурентне інгібування каталази (H_2O_2 : H_2O_2 -оксидоредуктаза) крові

Неконкурентними інгібіторами гемінових ферментів, у тому числі і каталази, є ціаніди і азиди, які взаємодіють з ферумом гему, що входить в активний центр, і пригнічують таким чином каталітичну активність цих ферментів. Метод ґрунтується на візуальному порівнянні і інтенсивності виділення кисню при розкладенні гідрогену пероксиду каталазою крові в умовах наявності натрію азиду – інгібітора каталази і без нього.

У дві пробірки вносять по 2 краплі крові, розведеної водою в 10 раз, і додають в одну з них 2 краплі води, а в другу – 2 краплі 1 %-вого розчину натрію азиду (NaN_3). Проби перемішують і через 2 хв приливають в обидві пробірки по 2 мл 3 % розчину гідроген пероксиду і порівнюють інтенсивність виділення бульбашок газу і роблять висновки.

5.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Загальні властивості ферментів та локалізація їх у клітині.
2. Дайте визначення поняттям: кофактор, простетична група, активатор.
3. Що таке активний центр ферментів?
4. Дайте характеристику алостеричного центру ферментів.
5. Які принципи номенклатури та класифікації ферментів?
6. Що таке шифр ферментів? Поясніть це на прикладах.
7. Які особливості дії ферментів порівняно з дією неорганічних каталізаторів?
8. Вплив різних факторів на активність ферментів.
9. До яких сполук гідролізується крохмаль і під дією якого ферменту?
10. Як діє α -амілаза на такий субстрат як сахароза? Активатори та інгібітори ферментів.
11. Механізм дії інгібіторів.
13. Активатори та інгібітори

Лабораторна робота № 6

Специфічність дії ферментів

6.1 Мета: оволодіти методикою визначення властивостей та функцій ферментів.

6.2 Короткі теоретичні відомості

Ферменти відрізняються від небіологічних каталізаторів високою специфічністю, оскільки здатні каталізувати тільки певні хімічні реакції.

Специфічність – одна із визначальних властивостей ферментів, що забезпечує можливість координації внутрішньоклітинних процесів. Однак усі ферменти відрізняються ступенем специфічності, що дає можливість клітинам живих організмів пристосовуватись до змін навколишнього середовища.

Специфічність дії ферментів буває *абсолютною* та *відотною*, *груповою*. Крайнім випадком абсолютної специфічності є *стереохімічна*.

Ферменти специфічні як стосовно типу реакцій, які каталізують, так і субстратів, на які вони діють. Деякі ферменти мають абсолютну специфічність, каталізуючи перетворення тільки певного субстрату.

α -Амілаза слини прискорює гідроліз полісахаридів. Мальтаза прискорює гідроліз дисахариду мальтози, яка утворюється при гідролізі крохмалю, але не проявляє ніякої дії на інший дисахарид – сахарозу. Уреаза розщеплює тільки сечовину, але не діє на близьку за структурою тіосечовину.

Ферменти, що мають абсолютну субстратну специфічність, використовуються як аналітичні реагенти для визначення речовин, що є їх субстратами. Наприклад, уреаза використовується для визначення сечовини в біологічному матеріалі і лікарських препаратах; глюкозооксидаза – для визначення кількості глюкози в крові та сечі.

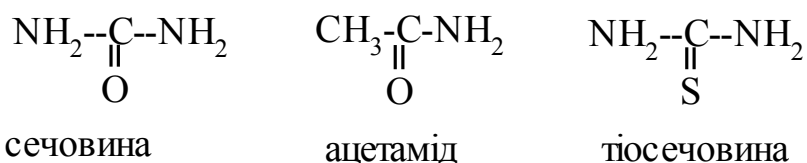
Ферменти з абсолютною і відносною груповою субстратною специфічністю мають меншу вибірковість дії на субстрати, беруть участь, як правило, у гідролізі поживних речовин або в перетворенні чужорідних сполук. Наприклад, α -амілаза і сахараза проявляють специфічність не до структури субстрату в цілому, а до типу глікозидних зв'язків, що мають місце у відповідних вуглеводах.

6.3 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: 1 % розчин сечовини, 1 % розчин тіосечовини, 1% розчин ацетаміду, 0,5 % спиртовий розчин фенолфталеїну, 1 % розчин крохмалю, 2 % розчин сахарози, 1 % розчин йоду, реактив Фелінга.

6.3.1 Визначення абсолютної субстратної специфічності уреаз (карбамідгідролази)

Незначні зміни в структурі субстрату призводять до того, що фермент не впливає на цей субстрат. Так, субстратом для уреаз є сечовина, а тіосечовина, яка відрізняється від сечовини наявністю атома сірки, уреазою не розщеплюється:



Метод ґрунтується на визначенні амоніаку, що утворюється в результаті дії уреаз соєвого борошна на сечовину:

В одну пробірку вносять 1 мл 1 % розчину сечовини, в іншу – 1 мл 1 % розчину тіосечовини, у третю – 1 мл 1 % розчину ацетаміду. У кожену пробірку додають приблизно 100 мг соєвого борошна (містить уреазу) та 2 краплі 0,5 %-вого спиртового розчину фенолфталеїну, ретельно перемішують скляною паличкою і закривають пробками з підвішеними смужками червоного лакмусового паперу, змоченого водою, та залишають стояти при кімнатній температурі. Слідкують за появою рожевого забарвлення вмісту пробірок. Виділення амоніаку визначають за запахом і за зміною червоного кольору лакмусового паперу на синій.

6.3.2 Специфічність дії амілази і сахарази

Метод ґрунтується на порівняльному вивченні гідролізу α -амілазою і сахаразою різних субстратів, що містять глікозидні зв'язки: крохмалю і сахарози. Гідроліз крохмалю і сахарози оцінюють пробою Фелінга на відновлювальні цукри (мальтозу і глюкозу).

Ферменти каталізують реакцію за схемою:

крохмаль + nH₂O α-амілаза → декстрин + мальтоза

сахароза + H₂O сахараза → глюкоза + фруктоза

У дві пробірки вносять по 1 мл 1 % розчину крохмалю та додають у першу пробірку 5 крапель розведеної в 10 раз слини (амілази), у другу – 5 крапель екстракту сахарази з дріжджів і перемішують. У дві інші пробірки вносять по 10 крапель 2 % розчину сахарози; і в першу з них додають 5 крапель екстракту сахарази, у другу – 5 крапель слини і перемішують. Усі пробірки ставлять у термостат при 38 °С. Через 10 хв до пробірок з крохмалем додають 1 краплю 1 % розчину йоду і спостерігають за забарвленням. У пробірки із сахарозою вносять по 1 мл реактиву Фелінга, перемішують і нагрівають верхній шар суміші. Спостерігають за появою жовтого чи червоного осаду. Записують хімізм реакції і роблять висновки, заповнюють таблицю 6.1:

Таблицю 6.1 – Специфічність дії амілази і сахарази

Фермент	Субстрат	Реакція з йодом	Реакція Фелінга	Висновки
<i>Амілаза</i>	<i>Крохмаль</i>			
<i>Сахараза</i>	<i>Крохмаль</i>			
<i>Амілаза</i>	<i>Сахароза</i>			
<i>Сахараза</i>	<i>Сахароза</i>			

6.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. У 2 пробірки (у першій - крохмаль, у другій - сахароза) внесли фермент. Після 10-хвилинної інкубації суміш у першій пробірці дає позитивну реакцію Фелінга, у другій – негативну. Який внесено фермент?
2. Що таке специфічність дії ферментів і як вона визначається?
3. Види специфічності та їх характеристика.
4. За якими ознакам можна стверджувати про дію ферментів?

Лабораторна робота № 7

Кількісне визначення активності ферментів

7.1 Мета: оволодіти методикою визначення активності ферментів.

7.2 Короткі теоретичні відомості

Кількісне визначення використовується для контролю за якістю ферментативних препаратів. Про активність ферменту роблять висновки за кількістю перетвореного субстрату або утвореного продукту за певний проміжок часу. Для правильного визначення активності ферменту необхідно проводити дослід за стандартних умов, які визначаються для кожного ферменту в попередніх кінетичних дослідах.

Користуючись сучасними методами (спектрофотометричними, колориметричними, полярографічними, флуориметричними, хроматографічними та іншими), визначають активність ферментів або після зупинки ферментативної

реакції через певний час, або реєструючи безперервно в ході реакції. Останній спосіб зручніший. Він можливий, якщо субстрат або продукт реакції поглинає світло в певній ділянці спектру або флуоресцює і т. д. Оскільки в ряді випадків кількість ферментів не може бути визначена в абсолютних величинах (в міліграмах), його доводиться подавати в умовних одиницях.

За міжнародну одиницю активності ферменту E приймають таку його кількість, яка може перетворити 1 мкмоль субстрату за 1 хв (при 37 °С за інших оптимальних умов: рН, концентрації субстрату та ін.).

Питома активність ферменту – відношення його концентрації до концентрації білка в 1 мл ферментного препарату:

E/C_b , (E/мг), де E – концентрація ферменту; C_b – концентрація білка в 1 мл ферментного препарату в міліграмах.

Рекомендована також нова одиниця каталітичної активності — *катал* (символ – кат), яка є кількістю ферменту, що може перетворити 1 моль субстрату за 1 с в стандартних умовах.

7.3 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: 0,1 % розчину крохмалю, 0,1 % розчин йоду, термостат.

Кількісне визначення активності α -амілази слини за Вольгемутом

Метод ґрунтується на визначенні найменшої кількості амілази (при максимальному розведенні слини), яка повністю розщеплює весь доданий крохмаль. Амілазна активність слини виражається кількістю 0,1 % розчину крохмалю (в мілілітрах), що розщеплюється 1 мл розведеної слини при температурі 38 °С протягом 30 хв. У нормі цей показник дорівнює 160-320 мл. Амілазна активність позначається A (38°/30 хв.) Цей метод широко використовується для визначення амілазної активності крові та сечі, в пивоварінні – солоду.

У 10 пробірок наливають по 1 мл води і в першу з них додають 1 мл розведеної в 10 раз слини (до 1 мл слини додають 9 мл води). Вміст цієї пробірки перемішують, декілька разів втягуючи і випускаючи рідину із піпетки. Набирають у піпетку 1 мл суміші і переносять до другої пробірки. Вміст цієї пробірки перемішують і 1 мл суміші переносять до третьої пробірки і так далі до 10-ї пробірки. Із десятої пробірки відбирають 1 мл суміші і виливають.

Таким чином, у кожній наступній пробірці вміст ферменту удвічі менший, ніж у попередній і розведення слини в пробірках становитиме: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1: 2560, 1:5120, 1:10240.

У всі пробірки додають по 1 мл води і по 2 мл 0,1 % розчину крохмалю, перемішують, струшують і поміщають у термостат при 38 °С на 30 хв. Після інкубації пробірки охолоджують водопровідною водою, додають по 1 краплі 0,1 % розчину йоду і перемішують. При реакції з йодом рідина забарвлюється в жовтуватий, червоний і фіолетовий колір. Відмічають пробірку з жовтуватим

забарвленням, де гідроліз крохмалю пройшов повністю, і роблять розрахунок. Отримані дані записують у вигляді таблиці 7.1.

Таблиця 7.1 – Хід визначення активності α -амілази

	Розведення слини										
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
	Пробірки										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Забарвлення розчину з йодом											
Висновки											

Наприклад, повний гідроліз крохмалю пройшов у четвертій пробірці. Вона містить слину в розведенні 1:160. Складають пропорцію:

1/160 мл слини розщеплює 2 мл 0,1 % розчину крохмалю;

1 мл слини розщепив X мл 0,1 % розчину крохмалю;

$$\frac{2 \cdot 1}{1}$$

тоді $X = \frac{1}{160} = 320$ мл, 0,1 % розчину крохмалю, тобто розщеплюється 320 мл 0,1 % -вого розчину крохмалю.

Амілолітичну активність записують так:

$A (38^\circ/30 \text{ хв}) = 320$ мл 0,1 % розчину крохмалю. При захворюваннях підшлункової залози амілолітична активність амілази крові і сечі різко збільшується (в 10-30 разів). Гіпоамілаземія відмічається при нестачі зовнішньосекреторної функції підшлункової залози, захворюваннях печінки (гепатит, цироз, інтоксикація, цукровий діабет і т. д.).

7.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Види активності ферментів.
2. В яких одиницях виражають активність ферментів?
3. Чим характеризується активність ферментів?
4. Як впливає захворювання підшлункової залози на активність ферментів?

Лабораторна робота № 8

Обмін речовин та енергії. Біологічне окиснення. Тканинне дихання. Окислювальне фосфорилування.

Окисно-відновні ферменти

8.1 Мета: оволодіти методикою дослідження окисно-відновних ферментів.

8.2 Короткі теоретичні відомості

Обмін речовин (метаболізм), який є характерною особливістю живих систем, включає різноманітні високо впорядковані перетворення біомолекул, головною метою яких є підтримання структурно-функціональної цілісності організму за різних умов. Ці процеси, які включають етапи накопичення енергії в доступній для використання формі, та етапи вивільнення цієї енергії, яка супроводжується виконанням роботи або синтезом життєво важливих сполук, потребують як надходження речовин до організму ззовні, так і виведення кінцевих продуктів до навколишнього середовища.

Біомолекули, необхідні для життєдіяльності, можуть синтезуватися з простіших попередників самим організмом (якщо організм здатен синтезувати всі необхідні сполуки, він називається *автотрофним*) або повинні бути попередньо синтезованими іншими організмами (якщо організм використовує готові органічні сполуки біогенного походження, він називається *гетеротрофним*). Автотрофні організми для синтезу біомолекул використовують зовнішні джерела енергії і променеву енергію сонця (*фототрофні* організми) або енергію розпаду неорганічних сполук (*хемотрофні*). При цьому енергія, що надходить до автотрофних систем, перетворюється в них на енергію хімічних зв'язків. Гетеротрофні організми не здатні здійснювати таке перетворення, вони мусять одержувати готову енергію хімічних зв'язків. Проте обидві ці групи організмів здатні вивільняти хімічну енергію в окисно-відновних реакціях і використовувати її в процесах життєдіяльності.

Головним посередником — джерелом хімічної енергії в клітині — є аденозинтрифосфат (АТФ), який містить *макроергічні зв'язки*. Це ангідридні (пірофосфатні) зв'язки між фосфатними залишками, в яких зосереджена велика кількість енергії. Більшість молекул АТФ в організмі людини і тварин синтезується в мітохондріях в реакціях, пов'язаних з транспортом електронів та протонів так званим дихальним ланцюгом. Нуклеотидтрифосфати - це речовини, в яких стикаються пластична та енергетична складові метаболізму. Ці дві складові є необхідними для життєдіяльності й доповнюють одна одну. Процеси розпаду (найчастіше з окисненням), що супроводжуються вивільненням енергії, називаються *катаболізмом*, а процеси біосинтезу, які звичайно потребують енергії, — *анаболізмом*. Загалом, саме катаболізм у сполученні з анаболізмом і складають метаболізм.

Біологічне окиснення — це процеси віддачі електронів (та протонів) різними речовинами в клітині в процесі її життєдіяльності.

Основною функцією біологічного окиснення є забезпечення організму енергією в доступній для використання формі (перш за все у формі АТФ) і перетворення поживних речовин на компоненти клітини.

Принциповою особливістю біологічного окиснення є те, що воно проходить поступово, через численні проміжні ферментативні стадії, тобто проходить багаторазова передача протонів і електронів (або тільки електронів) від однієї сполуки — донора, до другої — акцептора, при цьому протони транспортуються лише частиною проміжних переносників. Деякі організми,

зокрема бактерії або клітини багатоклітинного організму, можуть вивільняти енергію і без ланцюга транспорту електронів. Таким організмам та клітинам для життєдіяльності не потрібен кисень, і тому їх називають анаеробними. В аеробних організмів (тобто тих, для існування яких необхідний кисень) кінцевим акцептором електронів і протонів є кисень. Переміщення електронів від початкових речовин до кисню супроводжується виділенням надлишку енергії. При цьому 40 – 50 % її виділяється у вигляді тепла, а 50 – 60 % акумулюється у макроергічних зв'язках АТФ. За рахунок цієї енергії здійснюються життєві процеси клітини. Отже, тканинне дихання – це основний процес, що забезпечує аеробний організм енергією.

Система переносників електронів, що здійснює клітинне дихання, знаходиться у внутрішній мембрані мітохондрій і називається *дихальним ланцюгом*.

Повний дихальний ланцюг містить високоорганізовані комплекси ферментів — переносників: дегідрогеназну систему (піридин- і флавінпротеїди), FeS-білок з негеміновим ферумом, органічні сполуки небілкової природи (убіхінон), гемінові ферменти, цитохромну систему (b, c₁, c) й цитохромоксидазу (aa₃) – єдину з усіх цитохромів, що здатна відновлювати кисень. У процесі переносу електронів виникає електричний мембранний потенціал, який дозволяє викидати протони через непроникну для них внутрішню мембрану мітохондрій до міжмембранного простору з подальшим поверненням їх до матриксу за градієнтом концентрації, у чому бере участь АТФ-синтетаза. При цьому із АДФ та фосфату в присутності кисню утворюється АТФ і вода (окисне фосфорилування).

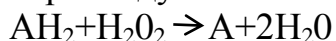
Клас оксидоредуктаз містить ферменти, що беруть участь в окисненні та відновленні різних речовин. Окиснення може здійснюватися кількома шляхами:

1. $AO + 1/2 O_2 \rightarrow AO_2$ (приєднання Оксигену).
2. $AH_2 + B \rightarrow A + BH_2$ (відщеплення Гідрогену).
3. $A^{2+} \rightarrow A^{3+} + e$ (відщеплення електрона).

Ферменти цього класу відіграють важливу роль у диханні та бродінні. До оксидоредуктаз належать, зокрема, оксидази, дегідрогенази і пероксидази.

Дегідрогенази. Дегідрогенази каталізують окиснення субстрату шляхом відщеплення в нього Гідрогену, тобто перенесення Гідрогену від донора (здатного до окиснення субстрату) на відповідний акцептор. Акцептором може бути кисень або будь-яка речовина, що міститься в тканинах організму. У дослідах використовують штучний акцептор – метиленову синьку (МС). Дегідрогеназа відбирає Гідроген: у субстрату і віддає його МС, яка відновлюється і перетворюється на безбарвну сполуку (МСН₂). Отже, обезбарвлення розчину може свідчити про дію дегідрогенази. Лейкоформа (МСН₂) легко окиснюється киснем повітря, тому досліди проводять за відсутності повітря (у пробірках Тунберга або звичайних пробірках під шаром рослинної олії).

Пероксидаза каталізує окиснення субстрату за участі Оксигену гідроген пероксиду за схемою:



У харчовій промисловості для перевірки ефективності високотемпературної пастеризації молока використовують пероксидазну пробу. Фермент пероксидаза, який міститься в молоці інактивується при температурі пастеризації не нижче 80°C з витримкою 20-30 с. У лабораторіях широко використовують метод визначення активності пероксидази, в основу якого покладене окиснення пірогалолу за наявності H₂O₂ до пурпурогаліну, що утворює в розчині червоно-бурий осад.

Оксидази – ферменти, які каталізують окиснення органічних речовин киснем повітря. За хімічною природою оксидази є металопротеїнами. До складу їх простетичних груп входять атоми купруму або феруму. До цієї групи ферментів належать поліфенолоксидаза і тирозиназа, аскорбатоксидаза. Вони широко розповсюджені в рослинних клітинах. Тирозиназа також знаходиться в окремих тканинах та органах людей і тварин. Тирозиназа бере участь в окисненні амінокислоти тирозину до темного пігменту меланіну (від грец. melanos -чорний).

8.3 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: хрон, 0,05 % розчину натрій карбонату, 2 % водний розчин пірогалолу, 1% розчин гідроген пероксиду, сире молоко, крохмальний розчин (3 г KI та 3 г крохмалю у 100 мл води), 0,5 % розчин гідроген пероксиду, 0,4 % розчин формальдегіду, 0,01 % розчин метиленового синього, олія, яблуко, сухі речовини NaCl, NaI, KClO₃, 1% розчин H₂O₂, кров, водяна баня.

8.3.1 Окиснення пірогалолу гідроген пероксидом в присутності пероксидази

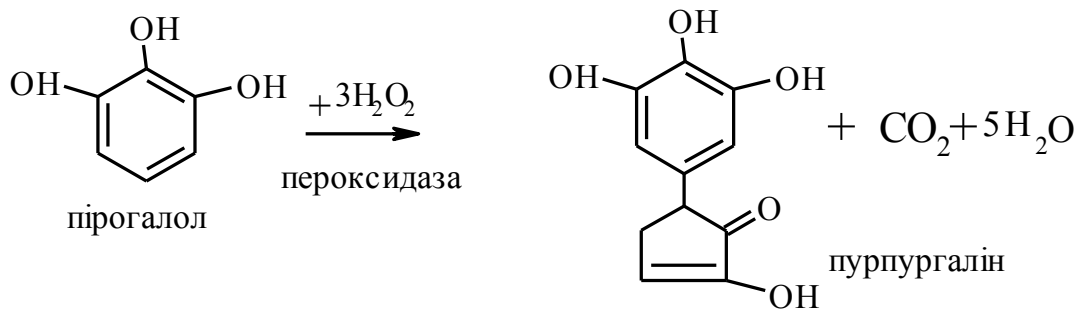
Пероксидазами називають ферменти, які каталізують окиснення деяких фенолів, поліфенолів і ароматичних амінів гідроген пероксидом або органічними пероксидами. Гідроген пероксид, що бере участь у реакції, утворюється в організмі в результаті дії аеробних дегідрогеназ. Органічні пероксиди виникають при окисненні киснем повітря речовин, наприклад терпенів, каротиноїдів і ненасичених жирних кислот, що легко окиснюються.

Реакцію окиснення поліфенолу гідроген пероксидом можна зобразити у вигляді такого рівняння:



Пероксидази широко розповсюджені в рослинних і тваринних тканинах.

При додаванні до розчину пірогалолу розчин пероксиду і витяжки з хрону, що містить фермент пероксидазу, при стоянні утворюється червоний осад:



У пробірку наливають 2 мл витяжки з хрону (100 г натертого хрону заливають 100 мл 0,05 % розчину натрій карбонату, настоюють протягом 4 год і фільтрують), кип'ятять і охолоджують. У чотири пронумеровані пробірки наливають по 20 крапель 2 % -вого водного розчину пірогалолу і додають: у першу і четверту – 20 крапель свіжої витяжки з хрону, у другу – 20 крапель провареної і охолодженої витяжки, у третю – 20 крапель води. Потім у першу, другу і третю пробірки додають по 2 краплі 1% розчину гідрогену пероксиду, збовтують і спостерігають за утворенням червоного осаду – пурпургаліну і роблять висновки. Осад є лише в першій пробірці, що містить обидва субстрати реакції (пірогалол і гідроген пероксид) та активний фермент (пероксидазу)

8.3.2 Визначення активності пероксидази молока

У харчовій промисловості для перевірки ефективності високотемпературної пастеризації використовують пероксидазну пробу. Фермент пероксидаза, який міститься в молоці інактивується при температурі пастеризації не нижче 80°C з витримкою 20-30 с. Ця проба дає можливість виявити не тільки порушення температурного режиму пастеризації, а й домішки сирого молока від 5 до 10 %.

Для визначення ефективності пастеризації молока використовують пероксид водню, який розкладається ферментом пероксидазою. Звільнений при цьому кисень окислює калій йодид до вільного йоду, який з крохалем дає синє забарвлення.

У три пробірки наливають по 0,5 мл стерилізованого, пастеризованого, пастеризованого з домішками сирого, та сирого молока і додають 3 краплі крохмального розчину (3 г KI та 3 г крохмалу у 100 мл води) та 1 краплю 0,5 % гідроген пероксиду. Поява інтенсивного забарвлення свідчить про наявність активної пероксидази (сирого молока). Поява блідо синього забарвлення свідчить про часткове руйнування ферменту при температурі від 65-70°C.(недостатня пастеризація). Відсутність будь якого забарвлення одразу після додавання всіх реактивів вказує на пастеризацію молока при температурі вище 80 °C. Заповніть таблицю та зробіть висновки.

8.3.3 Окиснення формальдегіду дегідрогеназою молока

У молоці, містяться дегідрогенази, що надходять із молочної залози та з мікрофлори молока. Альдегіддегідрогеназа окиснює формальдегід до мурашиної кислоти.

В одну пробірку вливають 3 мл кип'яченого молока, в іншу – 3 мл свіжого. В обидві пробірки додають 1 мл 0,4 % розчину формальдегіду та 1 мл

0,01 % розчину метиленового синього. Вміст струшують, вносять по 0,5 мл олії, щоб запобігти надходженню кисню повітря. Всі пробірки занурюють у водяну баню (40 °С). Фіксують час, необхідний для знебарвлення МС. Активність дегідрогенази виражають у хвиликах, необхідних для знебарвлення МС. Одержані результати записують і роблять висновок.

В дослідах з дегідрогеназами використовують ТХОК або високу температуру для інактивації ферменту. Ці фактори незворотно денатурують ферментний білок, тому при подальшій інкубації в оптимальних умовах активність ферментів не виявляється.

8.3.4 Іон хлору – інгібітор поліфенолоксидази

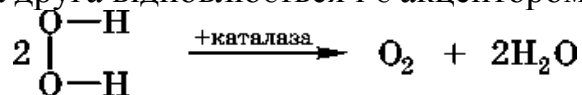
Дією поліфенолоксидази пояснюється потемніння поверхні розрізаного яблука або картоплини. Цей фермент окиснює полі- і монофеноли, дубильні речовини та інші органічні сполуки з утворенням темнозбарвлених продуктів.

Два яблука розрізають навпіл. Першу половину залишають для контролю, другу посипають NaCl, третю – NaI, четверту – KClO₃. Усі половинки залишають на повітрі на 30 хвилин. Звичайно, перша, третя, четверта половинки яблук темніють, а друга залишається без зміни. Отже, можна зробити висновок, що іон Cl⁻ інгібує поліфенолоксидазу. NaI використовують для того, щоб довести, що ефект інгібування в складі NaCl має Cl⁻, а не Na⁺. Використання KClO₃ показує, що хлор гальмує дію ферменту тільки у вигляді іона Cl⁻.

8.3.5 Розкладання гідрогену пероксиду каталазою крові

Каталаза прискорює реакцію розщеплення пероксиду водню на молекулярний кисень і воду.

У цій реакції одна молекула пероксиду водню окислюється і служить донором електронів, а друга відновлюється і є акцептором електронів:



За хімічною природою пероксидаза та каталаза є геміновими ферментами і відрізняється одна від одної та від цитохромів своїми білковими компонентами.

У пробірку наливають 10-20 крапель 1% розчину H₂O₂ і додають одну краплю крові. Рідина піниться за рахунок бурхливого виділення кисню.

Активність каталази знижується при анемії, туберкульозі, ракових захворюваннях; підвищується за умов токсичного гепатиту, дії іонізуючого випромінювання, солей металів.

8.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Чому обмін речовин і енергії живої системи з зовнішнім середовищем є обов'язковою умовою підтримки життя клітини, джерелом її росту і розвитку?
2. Що таке основний, проміжний і внутріклітинний обмін, метаболізм і метаболіти?

3. Відмінність організмів за типом живлення і джерел енергії. Автотрофи та гетеротрофи.
4. У чому різниця обміну речовин і енергії у живій і неживій природі?
5. Виконайте аналіз: асиміляції і дисиміляції; дихання і горіння; дихання і фотосинтез.
6. Перерахуйте етапи вивільнення енергії хімічних зв'язків органічних сполук.
7. В чому суть біологічного окиснення в організмі? Окисно-відновні ферменти.
8. В чому відмінність дегідрогеназ від оксидаз?
9. Що таке окиснювальне фосфорилування?
10. Зазначте основні шляхи використання АТФ для життєдіяльності організму. Наведіть приклади взаємоперетворень різних видів енергії в організмі.
11. Що таке вільне окиснення?
12. Який взаємозв'язок між процесами окиснювального фосфорилування та вільним окисненням?

Лабораторна робота № 9

Вуглеводи, структура та обмін

9.1 Мета: дослідити фізичні та хімічні властивості вуглеводів, овоїти методику ряду якісних та кількісних реакцій.

9.2 Короткі теоретичні відомості

Вуглеводи, нарівні з білками, – найбільш розповсюджені біогенні сполуки, що беруть участь у структурній організації клітини і використовуються в процесі її життєдіяльності. Вуглеводами називають полігидроксикарбонільні сполуки, що містять альдегідну чи кетонну групу або утворюють їх при гідролізі. Залежно від кількості моносахаридних одиниць, що утворюють молекулу, вуглеводи розподіляються на такі групи: моносахариди (монози) або прості цукри, олігосахариди, що дають при гідролізі від двох до десяти моносахаридів і полісахариди (поліози), що гідролізуються з утворенням більше десяти моносахаридів.

Вуглеводи утворюються з неорганічних речовин у процесі фотосинтезу в зелених рослинах із карбону діоксиду і води з поглинанням сонячної енергії. Людина, тварини і нефотосинтезуючі рослини одержують вуглеводи ззовні або синтезуються з неуглеводних попередників.

Вуглеводам в організмі належать різноманітні функції: енергетична, структурна, опорна, захисно-механічна, гідроосмотична, кофакторна та ін.

Обмін вуглеводів включає розщеплення їх і всмоктування в шлунково-кишковому тракті, катаболізм і анаболізм у клітинах та тканинах організму, виведення кінцевих продуктів обміну з організму.

Вуглеводи є сировиною для багатьох галузей промисловості, у тому числі харчової, фармацевтичної.

Ентеральний обмін включає розщеплення вуглеводів у шлунково-кишковому тракті до моносахаридів і їх всмоктування. Більшість гомо- і гетерополісахаридів, олігосахаридів, глюко-, мукопротеїнів рослинного і тваринного походження піддаються в шлунково-кишковому тракті ферментативному гідролітичному розщепленню до моносахаридів, які можуть всмоктуватися і потім перетворюватися на специфічні вуглеводи тканин організму.

Процес перетравлювання вуглеводів починається вже в ротовій порожнині під дією ферментів слини. Фермент α -амілаза розриває внутрішні 1,4-глікозидні зв'язки в молекулі крохмалю і глікогену з утворенням декстринів різної величини і частково мальтози. Фермент α -глюкозидаза (мальтаза) гідролізує дисахарид мальтозу на дві молекули глюкози. У зв'язку з коротким часом перебування їжі в ротовій порожнині полісахариди лише частково розщеплюються відповідними ферментами до декстринів, мальтози і глюкози. У шлунку немає спеціальних ферментів, що розщеплюють вуглеводи, і відсутні умови для дії ферментів слини. Амілаза слини проявляє свою каталітичну дію при нейтральній або слаболужній реакції (найбільш активно при $\text{pH} = 7,4 \dots 8,0$), у шлунку ж реакція середовища кисла ($\text{pH} = 1,5 \dots 2,0$). Незначне розщеплення декстринів може тривати в шлунку тільки деякий час (20 – 30 хв), доки харчова маса не набуває кислого характеру під дією HCl .

У найбільшому обсязі розщеплення вуглеводів відбувається в дванадцятипалій кишці і в порожнині тонкої кишки під впливом ферментів підшлункової залози і кишкового соку. Унаслідок дії амілаз і оліго-1,6-глюкозидази крохмаль розщеплюється до мальтози, а мальтоза під впливом α -глюкозидази розщеплюється на дві молекули глюкози.

Перетравлення вуглеводів проходить не тільки в порожнині тонкої кишки, але й на мембранах епітеліальних клітин слизової оболонки, де фіксовані ферменти (пристінкове травлення). Так, у ворсистій облямівці епітелію слизової оболонки тонкої кишки міститься мальтаза, сахараза, β -галактозидаза, які каталізують розщеплення відповідних дисахаридів. Одночасно відбувається всмоктування моносахаридів.

Процес всмоктування глюкози в тонкій кишці – це складний біохімічний процес. Глюкоза та інші компоненти їжі всмоктуються шляхом трансмембранного транспорту за допомогою білків-переносників і системи енергозабезпечення. Всмоктування пересікається з деякими ланками обміну електролітів-іонів Na^+ , тобто є Na^+ - залежним процесом. При транспорті простих вуглеводів крізь мембрану епітелію кишечника іон Na^+ проникає разом з ними всередину клітини (симпорт). Натрій-іон знову відкачується з клітини Na^+ , K^+ -АТФазою, а глюкоза залишається всередині клітини.

Отже, транспорт моносахаридів – це активний процес, в якому беруть участь ферменти – переносники, натрієвий насос і мітохондрії клітин слизової оболонки кишечника (в яких синтезується АТФ).

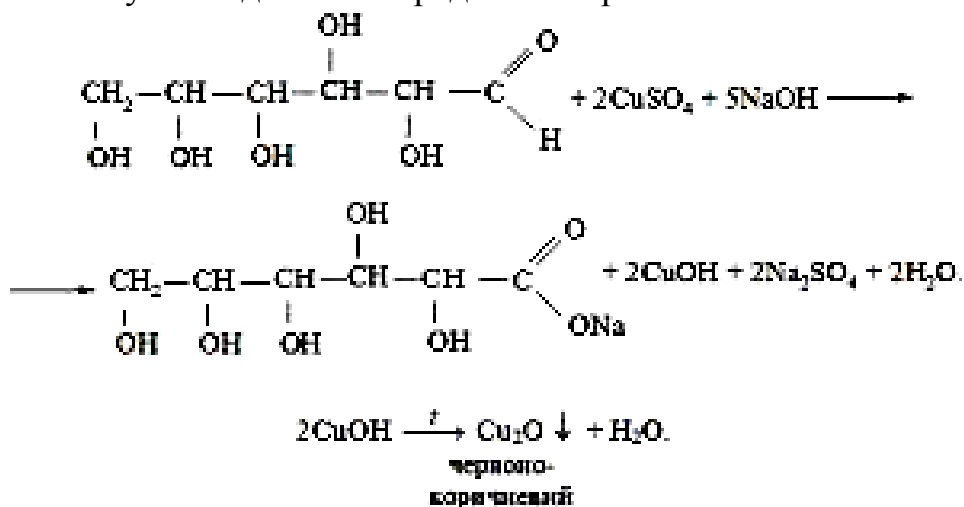
9.3 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: 5 % розчин натрій гідроксиду, 5 % розчин купруму (II) сульфату, 5 % розчин аргентум нітрату, 10 % водний розчин аміаку, 5 % розчин глюкози, 1 % глюкози, 1 % фруктози, 1 % сахарози, 1 % крохмалю, 1% розчин мальтози і лактози, 1 % спиртового розчину α -нафтолу, концентрована сульфатна кислота, 5 % розчин фруктози, концентрований розчин хлоридної кислоти, кристали резорцину, водяна баня, 3% розчин сахарози, 2% розчин кобальту нітрату, реактив Фелінга.

9.3.1 Реакція Троммера

Моносахариди, завдяки наявності вільного кетонowego чи альдегідного угруповання, можуть окислюватися до відповідних кислот, одночасно відновлюючи солі металів. Ця властивість використовується для ряду якісних та кількісних реакцій.

Розчини гексоз (наприклад, глюкози або фруктози) в лужному середовищі відновлюють під час нагрівання купрум (II) оксид у купрум геміоксид, а самі окислюються до альдонових кислот. Цю реакцію за участю глюкози в загальному вигляді можна представити рівняннями:

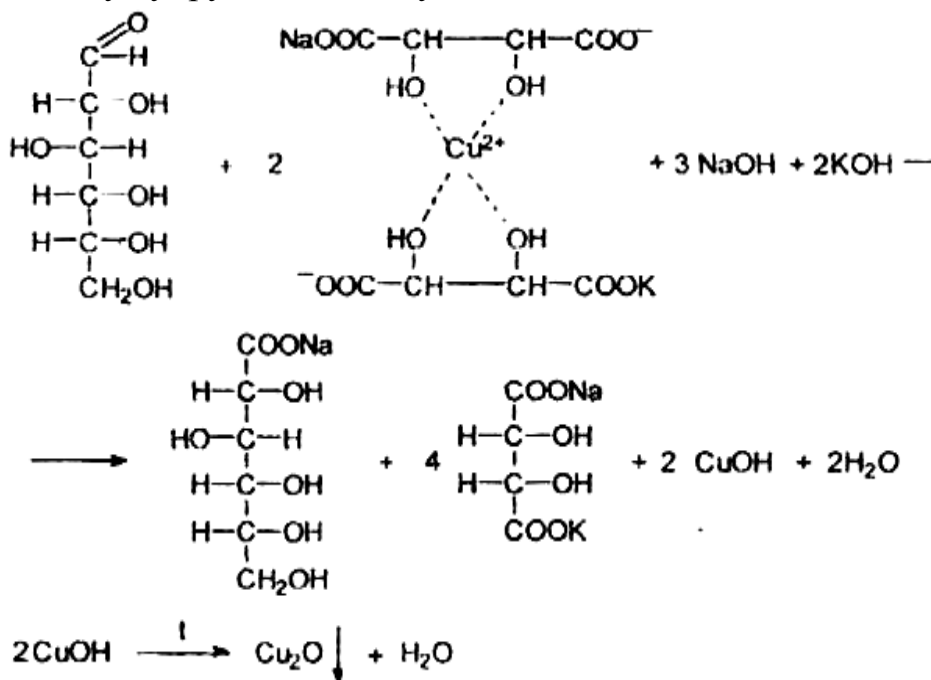


В пробірку до 3 мл розчину глюкози додають 1 мл 5 % розчину натрій гідроксиду і п'ять крапель 5 % розчину купруму (II) сульфату. Випадає осад купруму (II) гідроксиду, який внаслідок струшування пробірки розчиняється, а розчин набуває волошкового забарвлення. Під час його обережного нагрівання в полум'ї пальника до кипіння спостерігається випадіння жовтого осаду купрум (I) гідроксиду чи червоного осаду купруму геміоксиду.

9.3.2 Реакція Фелінга

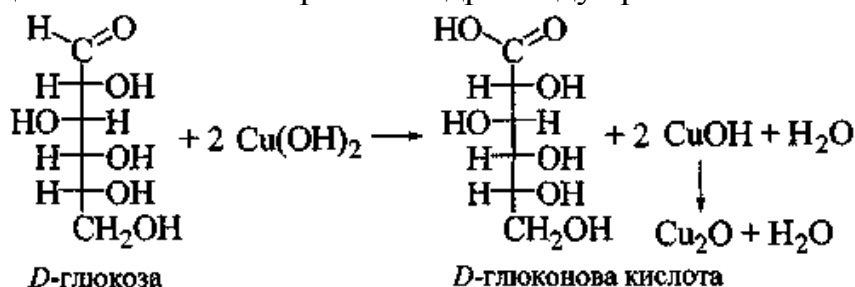
В реактиві Фелінга йони купруму (II) перебувають у вигляді комплексної сполуки з тартратами. Механізм реакції гексоз (і всіх редуруючих вуглеводів) із реактивом Фелінга такий же, як і в реакції Троммера. Перевагою реактиву Фелінга є те, що купрум у разі надлишку реактиву не випадає у вигляді купрум (II) оксиду.

В пробірку вносять 1 мл 5 % розчину глюкози та 1 мл реактиву Фелінга (суміші (по 0,5 мл) першого та другого розчинів). Вміст пробірки перемішують і нагрівають у полум'ї пальника до кипіння. Спостерігають утворення червоного осаду купрум геміоксиду:



9.3.3 Відновлення аміачного розчину аргентум гідроксиду глюкозою

Глюкоза відновлює аміачний розчин гідроксиду срібла:



В пробірку наливають 0,5 мл 5 % розчину аргентум нітрату, 0,5 мл розчину 5 % натрій гідроксиду й по краплях 10 % водний розчин аміаку до розчинення сірого осаду, що утворюється. Потім до вмісту пробірки додають 1,5 мл 5 % розчину глюкози, перемішують і обережно нагрівають на водяній бані. Спостерігають випадіння металічного срібла у вигляді чорного осаду чи його осадження на стінках пробірки у вигляді блискучого дзеркального нальоту.

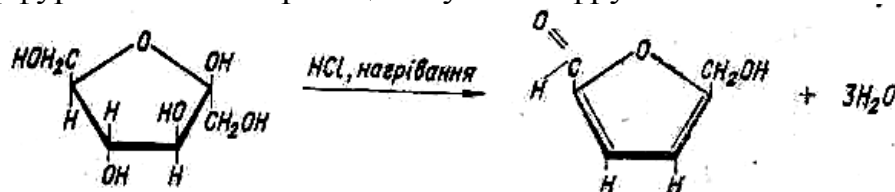
9.3.4 Реакція Подобєдова – Моліша з α -нафтолом

Внаслідок взаємодії концентрованої сульфатної чи хлоридної кислоти з вуглеводами (інтенсивніше з кетозами) відбувається дегідратація і утворення з них фурфуролу (чи оксиметилфурфуролу). Ці сполуки, вступаючи в реакцію з α -нафтолом і тимолом, утворюють продукти конденсації червоного кольору. Позитивну реакцію з α -нафтолом дають моно-, оліго- та полісахариди, тому його використовують для їх виявлення в біологічних рідинах.

В пробірки вносять по 5 мл розчину 1 % глюкози, 1 % фруктози, 1 % сахарози, 1 % крохмалю. В них додають також 2 мл 1 % спиртового розчину α -нафтолу. Потім у пробірки обережно, по стінці, додають по 1 мл концентрованої сульфатної кислоти, яка опускається на дно пробірок. На дні чи на межі розподілу рідин утворюються червоні чи фіолетово-червоні кільця.

9.3.5 Реакція Селіванова на кетози

Найважливішою кетозою є фруктоза. У природі вона існує як у вільному вигляді (у меді), так і у зв'язаному (у складі сахарози, деяких інших полісахаридів) стані. У живих організмах фруктоза перетворюється на глюкозу. Характерною реакцією на фруктозу та інші кетози є реакція Селіванова. Під час нагрівання фруктози чи інших кетоз із хлоридною кислотою утворюється оксиметилфурфурол. Рівняння реакції за участю фруктози має такий вигляд:



Оксиметилфурфурол із резорцином утворюють сполуку (продукт конденсації), забарвлену у вишнево-червоний колір. Ця реакція дає можливість визначити як вільні, так і зв'язані кетози. Швидше реакція Селіванова відбувається з фруктозою.

Альдози теж можуть утворювати оксиметилфурфурол і давати з резорцином забарвлені продукти конденсації, але з альдозами ця реакція проходить значно повільніше.

В пробірку наливають 5 мл 5 %-го розчину фруктози, 1 мл концентрованого розчину хлоридної кислоти й декілька кристалів резорцину. Суміш нагрівають на водяній бані протягом 5-10 хв за температу 80 °С до появи вишнево-червоного кольору.

9.3.6 Реакція на сахарозу

У разі додавання до розчину сахарози в лужному середовищі кобальту нітрату утворюється комплексна сполука фіолетового кольору.

У пробірки вливають 2 мл 3% розчину сахарози, 1 мл 5% натрій гідроксиду та кілька крапель розчину 2% кобальту нітрату. Спостерігають фіолетове забарвлення. Реакція належить до специфічних і є позитивною тільки із сахарозою.

9.3.7 Реакціям дисахаридів з реактивом Фелінга.

У три пробірки наливають по 1,5-2 мл 1%-них розчинів сахарози, мальтози і лактози. Потім у кожен пробірку додають рівний об'єм реактиву Фелінга, рідини перемішують і нагрівають у полум'ї пальника верхню частину до початку кипіння. Нижня частина розчинів не повинна нагріватись.

Чи у всіх пробірках з'являється червоний осад купрум (I) оксиду? Поясніть результати досліду. Напишіть рівняння реакцій з купрум (II) гідроксидом для тих дисахаридів, які дають позитивну реакцію з реактивом Фелінга.

9.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Які ферменти травного тракту діють на ди- і полісахариди і якими залозами вони виділяються?
2. Чому амілаза слини не діє в присутності шлункового соку?
3. У чому подібність і відмінність: а) гліколізу і глікогенолізу; б) гліколізу і спиртового бродіння?
4. Чому при такій низькій енергетичній ефективності анаеробний розпад вуглеводів не був витіснений природним відбором?
5. Проаналізуйте подібність і відмінність процесів аеробного і анаеробного розпаду вуглеводів. Як співвідносяться ці процеси в організмі?
6. Визначте число молекул АТФ, синтезованих:
 - а) при спиртовому бродінні двох молекул глюкози;
 - б) при повному аеробному окисненні 5 молекул глюкози.

Лабораторна робота № 10

Фізико-хімічні властивості ліпідів

10.1 Мета: дослідити фізичні та хімічні властивості ліпідів, оволодіти методиками визначення хімічних показників жирів.

10.2 Короткі теоретичні відомості

Ліпіди – це біологічно важливі органічні сполуки рослинного або тваринного походження різноманітної хімічної структури, нерозчинні у воді і розчинні в малополярних органічних розчинниках (ефірі, спирту, хлороформі, ацетоні та ін.). Ліпіди поділяють на прості і складні: прості ліпіди – це сполуки, у молекулі яких містяться залишки тільки жирних кислот і спиртів; у молекулах складних ліпідів є ще й залишки фосфатної кислоти, моно- або олігосахаридів, нітрогеновмісних сполук та ін.

У живих організмах ліпіди виконують функцію структурних компонентів клітинних мембран. Вони є формою, в якій депонуються запаси метаболічного «палива» і здійснюється його транспорт; виконують захисну роль, обволікаючи органи, судини, нерви і запобігаючи їх механічним ушкодженням. Саме неполярність, гідрофобність ліпідів дозволяє біологічним мембранам виконувати їх функції.

Ліпіди або їх похідні можуть виконувати функції біологічно активних речовин, таких як гормони, вітаміни, простагландини. Оскільки ліпіди поряд з білками відіграють важливу роль у структурній організації клітинних мембран, з ними пов'язано багато ефектів лікарської терапії.

Харчові жири – рослинні, тваринні чи гідрогенізовані жири, а також їх композиції, використовувані в смаженні, випічці та інших видах приготування їжі.

Фосфоліпіди – це група ліпідів, що містять фосфат та (найчастіше) азотисті основи. Фосфоліпіди можна розділити на дві групи: гліцерофосфо-

ліпіди та сфінгофосфоліпіди. Фосфоліпіди крові входять до складу ліпопротеїнів, обумовлюючи нарівні з білками полярні властивості цих комплексів і їх розчинність.

Нормальний вміст загальних фосфоліпідів у сироватці крові 1,52-3,62 г/л, а лецитину – 0,75-1,2 г/л. Важливим показником є індекс фосфоліпід/холестерол, який за фізіологічних умов становить 1-1,5. Цей індекс знижується при атеросклерозі, гіпертонічній хворобі, хворобах печінки. Збільшення вмісту фосфоліпідів відзначається при цукровому діабеті, гіпотиреозі, при ураженнях нирок і т. д. Рівень фосфоліпідів знижується при тяжких формах гострого гепатиту, жировому переродженні печінки, тиреотоксикозі.

Усі клітини, в яких є ядро, здатні до синтезу ліпідів, проте за умов інтенсивного метаболізму частина ліпідів має бути транспортована з печінки або стінки кишечника у формі *ліпопротеїнів крові*. Регуляція ліпідного обміну виконується нейрогуморальним шляхом. Кора головного мозку впливає на обмін ліпідів через симпатичну і парасимпатичну нервову систему, ендокринні залози. Так, наприклад, підвищена продукція α - та β -ліпотропних гормонів гіпофізу (кортикотропіну, соматотропіну), глюкагону, андреналіну, тироксину посилює ліполіз у жировій тканині. Інсулін і глюкокортикоїди, навпаки, перешкоджають надходженню жиру в печінку, сприяючи його відкладанню в жировій тканині.

Порушення обміну ліпідів спостерігається при цілому ряді захворювань, у першу чергу, при серцево-судинних. Більш ніж у 70 % усіх хворих на інфаркт міокарда і 50 % хворих на атеросклероз спостерігається збільшення рівня ліпідів у крові, що є важливим елементом патогенезу цих захворювань, а також може бути чинником ризику. Збільшення кількості ліпідів у крові виступає як симптом деяких захворювань, при яких вторинно порушується обмін ліпідів (цукровий діабет, гіпотиреоз, панкреатит, алкоголізм і т. д.).

Перетравлювання ліпідів відбувається в основному в кишечнику під дією активної панкреатичної ліпази, тому що в шлунковому соці ліпаза малоактивна і діє тільки на емульгований жир, наприклад, молока для кращого перетравлювання. Ліпіди мають бути емульговані. Головним емульгатором ліпідів є жовч, яка містить жовчні кислоти, що утворюються в печінці (10-15 г за добу). До них належать: холева, дезоксихолева, хенодезоксихолева, літохолева та інші кислоти, які виділяються з жовчю у вільному стані та у вигляді парних жовчних кислот, які зв'язані з гліцином або з таурином. Жовчні кислоти емульгують ліпіди, активують панкреатичну ліпазу, беруть активну участь у процесі всмоктування жирних кислот, утворюють міцели, стабілізують холестерол. У клітинах стінки кишечника ці міцели (комплекси) розпадаються, жовчні кислоти знову надходять до печінки, а з гліцеролу та жирних кислот в стінці кишечника утворюються специфічні для цього організму нейтральні жири і фосфоліпіди.

У клініці при дослідженні обміну ліпідів найчастіше визначають вміст ліпопротеїнів, загальних ліпідів, а також окремих їх фракцій –

триацилгліцеролів, неестерифікованих жирних кислот, вільного та естерифікованого холестеролу, фосфоліпідів.

10.3 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: рослинна олія, маргарин, спирт, ефір, хлороформ, лецитин, 1% розчин Na_2CO_3 , 1% розчин NaHCO_3 , 0,001 н розчин йоду в хлороформі, 50% розчин KOH , спиртовий розчин калій гідроксиду (30 г KOH розчиняють в 20 мл води, після охолодження перемішують з 200 мл спирту), розчин калієвого мила, концентрована хлоридна кислота, 10 % розчин NaOH , 2 % розчин купрум (II) сульфату, яєчний жовток, насичений спиртовий розчин кадмію хлориду, 10 % розчин натрію гідроксиду, концентрована сульфатна кислота.

10.3.1 Утворення масляної плями

Краплю масла наносять скляною паличкою на шматок паперу. Утворюється пляма, яка не зникає при нагріванні.

10.3.2 Розчинність ліпідів

Характерною властивістю жирів є їх гарна розчинність в багатьох органічних розчинниках (ацетон, хлороформ, діетиловий етер та інші) та нерозчинність у воді.

В 4 пробірки вміщують по 0,3 мл рослинної олії в кожену, потім в першу додають 3 мл води, в другу – 3 мл спирту, в третю – 3 мл ефіру, в четверту – 3мл хлороформу. Вміст всіх пробірок енергійно струшують і відзначають зміни, які відбулися в кожній пробірці.

10.3.3 Емульгування жирів

При змішуванні жирів з водою утворюються емульсії, стійкість яких залежить від середовища, в якому вони утворюються. Емульгуванням називають розподіл однієї нерозчинної рідини в іншій у вигляді краплин. Таке подрібнення на краплини звичайно відбувається при енергійному перемішуванні двох рідин. Щоб емульсія не розшарувалася, використовують спеціальні речовини – емульгатори або стабілізатори (мила, жовчні кислоти, карбонати). Утворення емульсії обумовлено тим, що у поверхневий водний шар, який оточує жирові краплини, надходять поверхнево-активні частки жовчних кислот, мила, карбонатів, які обволікають краплинки жиру та запобігають їх злиттю.

Стійкість одержаної емульсії значною мірою залежить від природи емульгатора. Наприклад, молочно-жирова емульсія маргарину має високу стійкість і не розшаровується при механічній і термічній дії. У вітчизняному маргариновому виробництві як емульгатори використовують суміші моно- і дигліцеридів, фосфатиди, сухе молоко. При виготовленні майонезів з цією метою використовують яєчний і гірчичний порошки.

Основними емульгаторами в шлунково-кишковому тракті є солі жовчних кислот, білки, фосфатиди, мила, гідрокарбонати лужних металів. Емульгування жирів сприяє кращому їх розщепленню та всмоктуванню в кишечнику.

У чотири пробірки наливають по 5 мл дистильованої води. До другої пробірки вносять на кінчику ножа лецитин, до третьої – 1 мл 1% розчину Na_2CO_3 , до четвертої – 1 мл 1% розчину NaHCO_3 . Потім до всіх пробірок додають по 0,2 мл олії. Пробірки енергійно струшують і залишають на 5 хвилин. У першій пробірці емульсія швидко розшаровується на воду і олію. У інших пробірках завдяки наявності жовчі, лецитину і соди утворюються стійкі емульсії.

Вміст пробірок фільтрують через паперові фільтри в інші пробірки. У першій пробірці через фільтр проходить прозорий розчин, а олія залишається на фільтрі. В інших пробірках фільтрується каламутна рідина (емульсія). Отже, стабілізатори сприяють емульгуванню жирів і значно полегшують їх проходження через мембрани.

10.3.4 Виявлення ненасиченості ліпідів

В три пробірки вносять 1 мл розчину рослинної олії в хлороформі, 1 мл вершкового масла в хлороформі, 1 мл маргарину в хлороформі. Отримані розчини титрують 0,001 н розчином йоду в хлороформі до появи розового забарвлення. Порівнюють кількості розчину йоду, необхідних для насичення різних жирів.

10.3.5 Омилення жирів

Жири під дією лугів гідролізуються з утворенням мила та гліцерола (глицерину).

А. В колбу з 1 мл рослинної олії додають 20 мл 50% розчину КОН (NaOH). Вміст колби перемішують і кип'ятять 60 хв. Після омилення розчин доводять до об'єму 20 мл дистильованою водою, таким чином отримують розчин калієвого мила. Напишіть рівняння гідролізу жиру.

Б. В широкій пробірці 2 мл олії рослинної олії змішують з 5 мл спиртового розчину калій гідроксиду (30 г КОН розчиняють в 20 мл води, після охолодження перемішують з 200 мл спирту). Пробірку закрити зворотним холодильником і нагрівають на киплячій водяній бані до повного омилення. Показник повного омилення – відсутність жирних плям на поверхні води, в яку добавлена капля гідролізату.

Гідролізат розводять 6 мл води, і отриманий розчин мила використовують для виявлення складових частин жиру: гліцерину і жирних кислот.

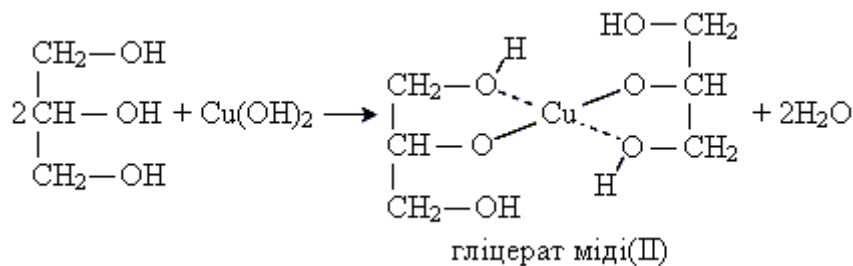
10.3.6 Утворення вільних жирних кислот

При додаванні до мила $\text{HCl}_{\text{конц}}$ утворюються вільні жирні кислоти.

В пробірку з 2 мл розчину калієвого мила додають 0,5 мл концентрованої хлоридної кислоти. Жирні кислоти, що утворилися, нерозчинні у воді та будуть знаходитись у верхній частині вмісту пробірки. Вміст пробірки фільтрують.

10.3.7 Якісна реакція на гліцерин з купруму (II) гідроксидом

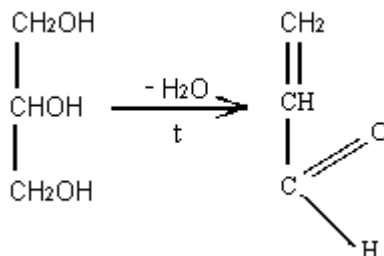
Багатоатомні спирти (наприклад, гліцерин) утворюють з купруму (II) гідроксидом комплексні сполуки темно-синього кольору:



До профільтрованого гідролізату додати 8-10 крапель 10 % розчину NaOH і 1-2 краплі 2 % розчину купрум (II) сульфату. Написати рівняння реакції. Зробити висновки.

10.3.8 Акролеїнова реакція

За допомогою проби на акролеїн визначають присутність гліцерина в жирах. Гліцерин окиснюється до акролеїну (ненасиченого альдегіду), який має різкий подразнюючий запах (пригорілого сала).



В суху пробірку вносять декілька крапель рослинної олії або шматок твердого жиру і додають небагато порошку KHSO_4 (NaHSO_4) або H_3BO_3 та обережно нагрівають. Написати рівняння реакції. Зробити висновки з дослідів.

10.3.9 Виділення лецитину з яєчного жовтка. Якісні реакції на лецитин

Яєчний жовток у кількості 0,5-1 г, що містить лецитин, поміщають у пробірку, додають 3,5 мл киплячого спирту і ретельно перемішують вміст пробірки скляною паличкою протягом 5-10 хв. Потім рідину фільтрують у суху пробірку і з фільтратом проводять реакції на лецитин.

10.3.10 Емульгуюча дія лецитину

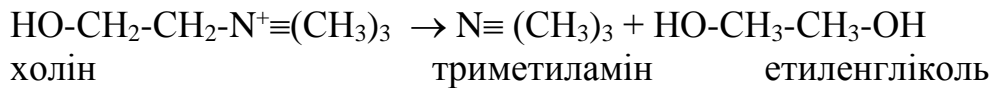
До 5 крапель спиртового розчину лецитину додають 2 мл води та 0,2 мл олії, пробірку струшують. Утворюється стійка емульсія у воді.

10.3.11 Осадження лецитину

У суху пробірку до 5 крапель спиртового розчину лецитину додають 1-2 краплі насиченого спиртового розчину кадмію хлориду. Виникає нерозчинна кадмієва сполука лецитину.

10.3.12 Гідроліз лецитину

У пробірку вносять 5-10 крапель спиртового розчину лецитину і додають подвійний об'єм 10 % розчину натрію гідроксиду і кип'ятять 3-5 хв. У результаті гідролізу лецитин розпадається на гліцерол, жирні кислоти, холін і фосфатну кислоту. Холін при гідролізі перетворюється на триметиламін і виявляється за запахом оселедцевого розсолу:



холін

триметиламін

етиленгліколь

Фосфатну кислоту можна відкрити при нагріванні з амонію молібдатом.

10.3.13 Реакція Вітбі на наявність стеринів в олії

У суху пробірку наливають 1 мл хлороформу, додають 2-3 краплі олії і легко перемішують до розчинення олії і додають по стінці пробірки 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Вміст пробірок обережно перемішують. Верхній хлороформний шар набуває вишнево-червоного забарвлення, нижній, кислотний - у червоно-коричневий із зеленою флюоресценцією.

10.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Як визначити наявність альдегідів у олії?
2. Реакція Вітбі на наявність стеринів в олії.
3. Метод виявлення ненасиченості ліпідів.
4. Причини порушення обміну ліпідів.
5. Вплив жовчі на ліпіди.

Лабораторна робота № 11

Вітамін

11.1 Мета: оволодіти методиками якісного визначення вітамінів.

11.2 Короткі теоретичні відомості

Вітамін – це життєво важливі низькомолекулярні органічні сполуки різної хімічної природи, які в організмі не синтезуються або синтезуються в обмеженій кількості. Вони необхідні людині і тваринам у незначних кількостях, але є незамінними компонентами збалансованого харчування. На відміну від інших сполук, вітамін не виконують структурних та енергетичних функцій, але, незважаючи на присутність у клітині в дуже малій кількості, беруть участь у регуляції процесів метаболізму, головним чином в утворенні кофакторів ферментів, а також виконують функцію регуляторів окремих біохімічних процесів.

Важко знайти такий розділ фізіології і біохімії, який не торкався б учення про вітамін: обмін речовин, діяльність органів чуття, функції нервової системи, явища росту і розмноження – всі ці та інші різноманітні і докорінні за своєю важливістю біологічні процеси найтіснішим чином пов'язані з вітамінами.

Джерелом вітамінів у людини є їжа і кишечні бактерії. Останні самі синтезують багато вітамінів і є важливим джерелом їх постачання в організм.

Важливого значення набувають явища гіповітамінозів, пов'язані з екстремальними та фізіологічними станами організму: різні захворювання, вагітність, годування немовляти, активний ріст.

У наш час виділено і вивчено більше 20 вітамінів. Сучасна класифікація не є досконалою: вона ґрунтується на фізико-хімічних властивостях (зокрема на розчинності: вітамін поділяють на ліпорозчинні і водорозчинні) та хімічній

будові: розрізняють вітаміни аліфатичні, аліциклічні, карбоциклічні (ароматичні) і гетероциклічні. Кожен вітамін позначають літерами, хімічною та фізіологічною назвами.

Існує умовний поділ вітамінних речовин на власне вітаміни і *вітаміноподібні речовини*. Останні за біологічними властивостями близькі до вітамінів, але необхідні організму в значно більших кількостях, ніж вітаміни.

Окремі вітаміни об'єднуються в групу близьких за хімічною структурою сполук, що відрізняються між собою силою біологічного ефекту на організм. Ці варіанти одного й того ж вітаміну отримали назву *вітамерів*.

Деякі вітаміни надходять з їжею у вигляді попередників - провітамінів, які в тканинах перетворюються на їх біологічно активні форми.

Часткову нестачу вітамінів називають *гіповітамінозом*, а різко виражений дефіцит – *авітамінозом*. Надмірна наявність у тканинах вітамінів – *гіпервітаміноз* (це характерно в основному для ліпорозчинних вітамінів А і В).

За останні роки синтезовані антивітаміни, які мають подібну до вітамінів структуру (аналоги), але ускладнюють прояв їх активності. Антивітаміни, утворюючи головним чином неактивні ферментні комплекси, призводять до зниження або втрати ферментативної активності деяких ферментів, у тому числі і в бактеріях. Більшість антивітамінів застосовуються як лікарські засоби суворо спрямованої дії на деякі біохімічні і фізіологічні процеси.

11.3 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: 1% розчин сульфанілової кислоти, 5% розчин натрію нітрату, 5% розчин тіаміну, 10% розчин Na_2CO_3 , 5% розчин вітаміну B_1 , 1% розчину $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 30% розчин NaOH , ізобутиловий спирт, 0,25% розчин вітаміну B_2 (суспензія рибофлавіну у воді), концентрована хлоридна кислота, металічний цинк, вітамін РР, 10% розчин оцтової кислоти, 5% розчин купрум (II) ацетату, 10% розчин натрій гідрокарбонату, 5% розчину натрій гідросульфїту, 1% водний розчин піридоксину, 1% розчин ферум (III) хлориду, водний розчин рутину, концентрована сульфатна кислота, 0,5% розчин хлоридної кислоти, 10% розчин гідроксиду натрію, свіжевиготований реактив Фелінга, 0,1% розчин 2,6-дихлорофеноліндофенолу, 10% розчин HCl , 0,1% розчин аскорбінової кислоти, розчин йоду в розчині калію йодиду, капуста або картопля, 2% розчин HCl , 0,5% розчин крохмалю, 0,003 н I_2 , 0,05% розчин вітаміну А або рибячого жиру в хлороформі, льодяна оцтова кислота, насичена сульфатом заліза (II), хлороформний розчин вітаміну D, аніліновий реактив – анілін із концентрованою HCl (15:1), розчин бром у хлороформі (1:60), 0,1% спиртовий розчин вітаміну С, концентрована нітратна кислота, 0,1% спиртового розчину α -токоферолу.

11.3.1 Реакції на тіамін (вітамін В₁, антинеуритний)

11.3.1.1 Реакція з діазореактивом

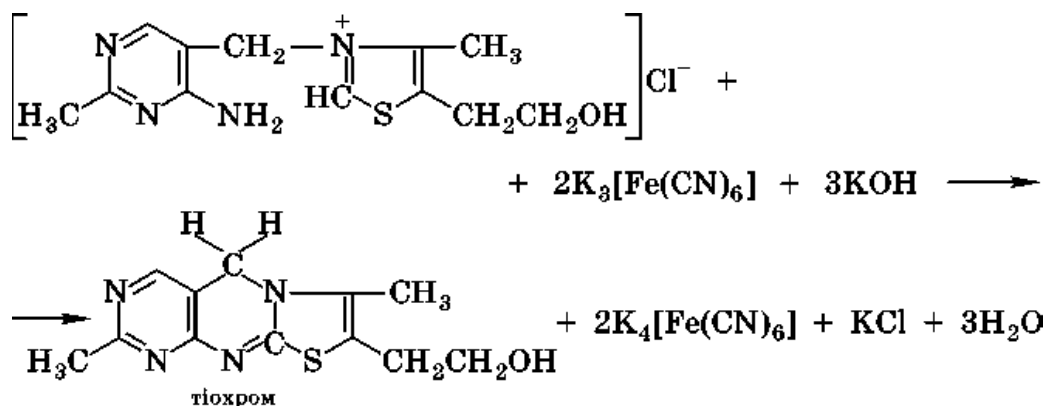
В основі реакції лежить здатність вітаміну В₁ у лужному середовищі з діазореактивом утворювати складну комплексну сполуку оранжевого або червоного кольору.

У пробірку вносять 1 мл 1% розчину сульфанілової кислоти і 1 мл 5% розчину натрію нітрату. Утворюється діазореактив. Сюди ж додають невелику кількість (на кінчику шпателя) порошка або 0,5 мл 5% розчину тіаміну і по стінці пробірки обережно додають 1 мл 10% розчину Na₂CO₃.

На межі двох рідин з'являється кільце оранжевого або червоного кольору.

11.3.1.2 Реакція окиснення тіаміна в тіохром

Вітамін В₁ у лужному середовищі під дією калій гексаціаноферрату (III) окиснюється в тіохром – пігмент жовтого кольору, який у ізобутиловому спирті дає інтенсивно синю флюоресценцію:

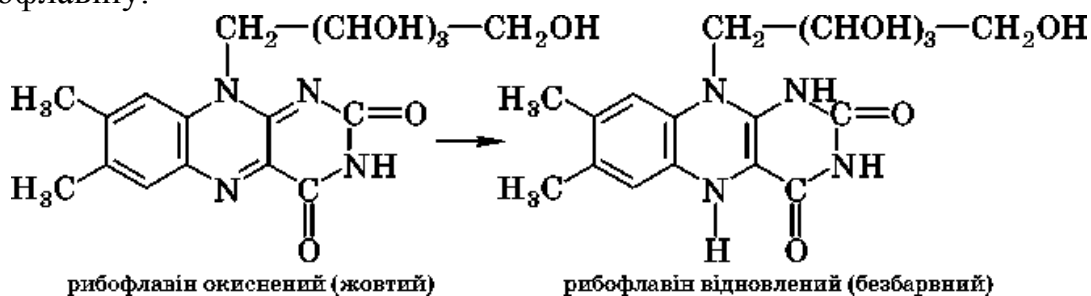


У пробірку вносять 1 мл 5 % розчину вітаміну В₁, додають 2 мл суміші, що складається з 1 мл 1% розчину K₃Fe(CN)₆ та 1мл 30% розчину NaOH, ретельно перемішують і залишають на 3 хвилини. Потім додають 5 мл ізобутилового спирту, інтенсивно струшують протягом 2 хвилин. Ізобутиловий екстракт тіохрому в ультрафіолетових променях має інтенсивну синю флюоресценцію.

11.3.2 Реакція на рибофлавін (вітамін В₂, антисеборейний)

11.3.2.1 Реакція відновлення рибофлавіну

При додаванні металічного цинку до концентрованої хлоридної кислоти утворюється водень, який відновлює жовтий рибофлавін спочатку до родофлавіну (проміжна сполука) червоного кольору, а потім до незабарвленого лейкофлавіну:

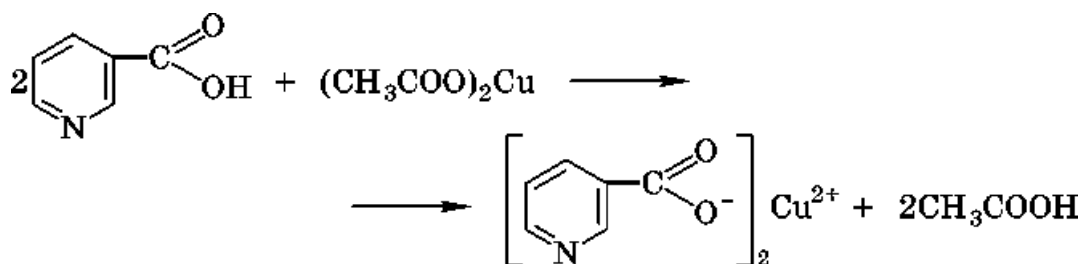


В пробірку наливають 0,5 мл 0,025% розчину вітаміну В₂ (суспензія рибофлавіну у воді), 0,5 мл концентрованої хлоридної кислоти та кидають шматочок металічного цинку. Виділяється водень, який вступає в реакцію з рибофлавіном, рідина поступово забарвлюється у рожевий колір, а потім знебарвлюється. Під час збовтування знебарвлений розчин лейкофлавіну знову окиснюється киснем повітря до рибофлавіну.

11.3.3 Реакція на вітамін РР (вітамін В₅, нікотинава кислота, антипелагричний)

11.3.3.1 Реакція з ацетатом

При нагріванні вітаміну РР з розчином купрум (II) ацетату утворюється погано розчинний осад мідної солі вітаміну РР синього кольору:



В пробірку вносять 5-10 мг вітаміну РР, додають 1-2 мл 10% розчину оцтової кислоти. Під час нагрівання пробірки вітамін РР розчиняється. До нагрітого до кипіння розчину додають такий же об'єм 5% розчину купрум (II) ацетату. Після охолодження рідина стає каламутною і набуває блакитного кольору, а через деякий час випадає синій осад мідної солі нікотинової кислоти.

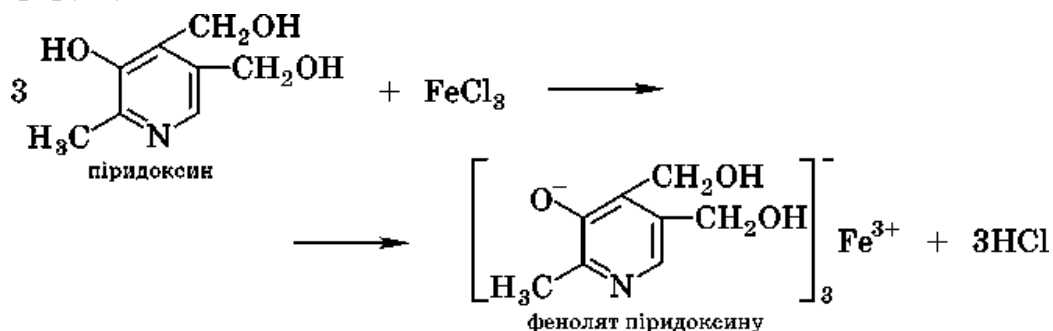
11.3.3.2 Реакція з натрій гідросульфідом

Вітамін РР відновлюється натрій гідросульфідом з утворенням сполуки жовтого кольору.

В пробірку вносять 5-10 мг вітаміну РР, додають 1,5 мл 10% розчину натрій гідрокарбонату, перемішують і вливають 1,5 мл щойно приготованого 5% розчину натрій гідросульфіду. Рідина забарвлюється в жовтий колір.

11.3.4 Реакція на піридоксин (вітамін В₆) з ферум (III) хлоридом

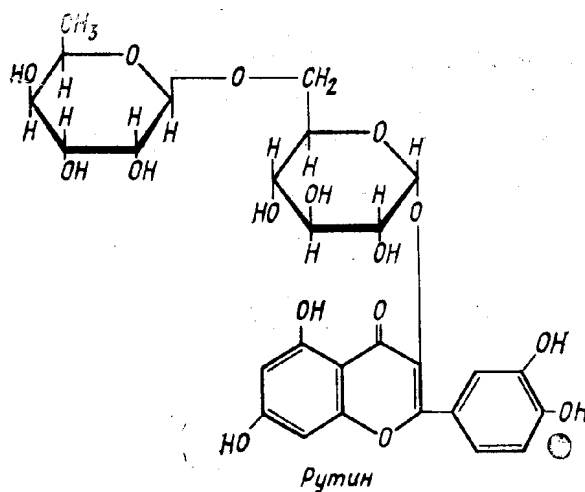
Під час взаємодії піридоксину з розчином ферум (III) хлориду рідина забарвлюється в червоний колір завдяки утворенню комплексної солі на зразок феноляту феруму:



У пробірці перемішують 1 мл 1% водного розчину піридоксину та дві краплі розчину ферум (III) хлориду. Рідина забарвлюється у червоний колір.

11.3.5 Реакції на вітамін Р (рутин, цитрин, вітамін проникності).

Препаратами вітаміну Р, що знайшли практичне застосування, є цитрин (геспередин), виділений із цедри цитрусових; препарат під назвою «вітамін Р», виділений із листя чайного дерева; рутин (глікозид кверцетину), який отримується з листя гречки:



11.3.5.1 Реакція рутину з ферум (III) хлоридом

Феруму (III) хлорид утворює з рутином комплексні сполуки, забарвлені в смарагдово-зелений колір.

До 2 мл насиченого водного розчину рутину додають кілька крапель 1% розчину $FeCl_3$. Спостерігають появу зеленого забарвлення.

11.3.5.2 Реакція рутину з концентрованою сульфатною кислотою

Концентрована сульфатна кислота утворює з флавонами та флавонолами флавілієві солі, розчини яких мають яскраво-жовте забарвлення. Під час кислотного гідролізу рутину відщеплюється молекула рутинози. Потім рутиноза розкладається на глюкозу та рамнозу, які мають відновні властивості.

До 2 мл насиченого водного розчину рутину обережно по стінці пробірки доливають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. На межі розділення двох рідин виникає кільце жовтого кольору.

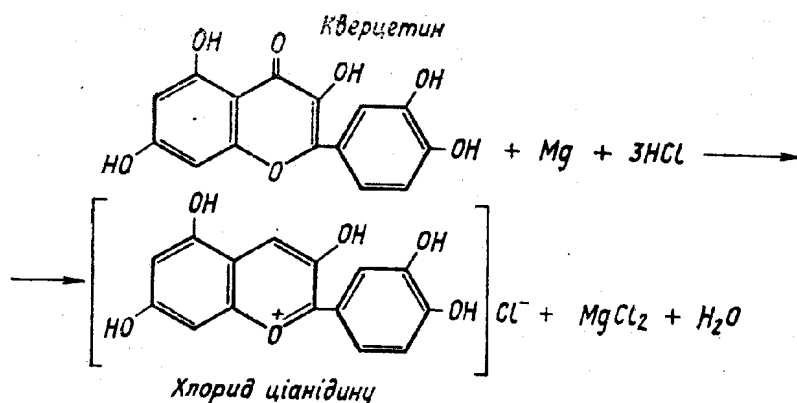
11.3.5.3 Реакція рутину з реактивом Фелінга

До 0,5 г рутину доливають 5 мл 0,5% розчину хлоридної кислоти, кип'ятять протягом 1 хв, потім фільтрують. До 5 мл фільтрату додають 3 мл 10% розчину гідроксиду натрію та 3 мл свіжевиготовленого реактиву Фелінга й знову нагрівають до кипіння. Спостерігають утворення осаду купрум геміоксиду червоного кольору.

11.3.5.4 Реакція відновлення кверцетину

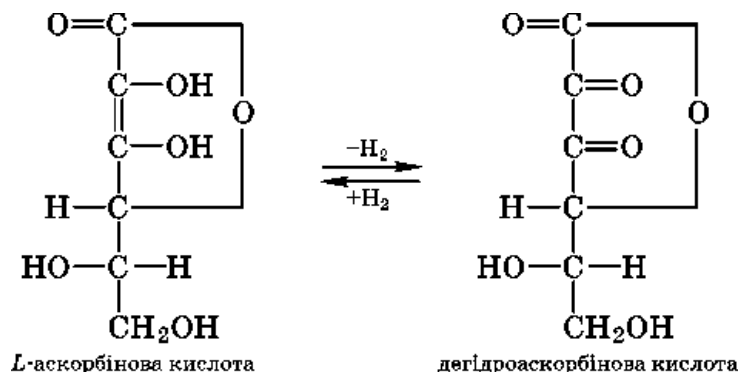
Кверцетин легко відновлюється, утворюючи ціаніди червоно-рожевого або фіолетово-червоного кольору залежно від концентрації кверцетину.

До 1 мл насиченого спиртового розчину кверцетину додають невелику кількість (на кінчику ланцета) порошка металічного магнію та три-чотири краплини концентрованої хлоридної кислоти. Рідина спочатку забарвлюється в рожевий колір, який з часом змінюється на малиновий або фіолетово-червоний:



11.3.6 Реакції на аскорбінову кислоту (вітамін С, антискорбутний)

Аскорбінова кислота може легко вступати в окисно-відновні реакції й відновлювати 2,6-дихлорофеноліндофенол, калій гексоціано-(III)-ферат, аргентум нітрат, молекулярний йод, метиленовий синій. При цьому окисна форма 2,6-дихлорофеноліндофенолу (синього кольору) та метиленовий синій відновлюються до безбарвних лейкосполук, а $K_3Fe(CN)_6$ – до $K_4Fe(CN)_6$, який з йонами III валентного заліза утворює сіль $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ синього або зеленого кольору:



11.3.6.1 Реакція з 2,6-дихлорофеноліндофенолом

У пробірку вносять 0,5 мл 0,1% розчину 2,6-дихлорофеноліндофенолу, одну-дві краплі 10% розчину HCl і по краплях 0,1% розчин аскорбінової кислоти. Розчин 2,6-дихлорофеноліндофенолу знебарвлюється.

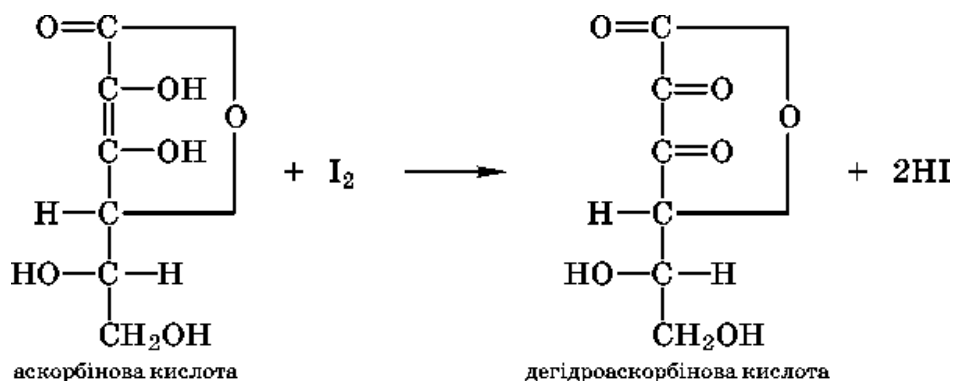
11.3.6.2 Реакція з калій гексаціаноферратом (III)

Аскорбінова кислота може легко вступати в окисно-відновні реакції й відновлювати $K_3Fe(CN)_6$ до $K_4Fe(CN)_6$, який з йонами III валентного феруму утворює сіль $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ синього або зеленого кольору.

До 1 мл 0,1 % розчину аскорбінової кислоти додають 1 мл 1% розчину $K_3Fe(CN)_6$ і 0,5 мл 1 % розчину $FeCl_3$. Спостерігають утворення синьо-зеленого забарвлення. Напишіть рівняння реакцій.

11.3.6.3 Йодна проба на аскорбінову кислоту

У дві пробірки наливають по 10 крапель води і по 1-2 краплі розчину йоду в розчині калію йодиду. В одну з пробірок додають 10 крапель витяжки з шипшини, у другу – стільки ж води. У пробірці з витяжкою з шипшини розчин йоду знебарвлюється. Поясніть побачене та напишіть рівняння реакції:



11.3.6.4 Кількісне визначення вітаміну С методом йодометричного титрування

Аскорбінова кислота є сильним відновником і може бути виявлена йодометрично при певному значенні рН розчину (наприклад, рН 7). У разі титрування йодом аскорбінова кислота окислюється, утворюючи дегідраскорбінову кислоту.

Підготувати екстракт з харчових продуктів для виявлення вітаміну С. Для цього 2 г капусти або картоплі дрібно порізати й розтерти в ступці з невеликою кількістю товченого скла або піска, додати 10 мл 2% розчину НСІ. Добре перемішану масу відфільтрувати через скляну лійку з ватою в конічну колбу на 100 мл. У фільтрат додати 1 мл 0,5 % розчину крохмалю і титрувати робочим розчином 0,003 н I₂ до появи синього кольору.

У розрахунку вмісту вітаміну С в продукті використати формулу визначення маси:

$$M = \frac{n \cdot E \cdot V}{1000}, \text{ г}$$

де n - молярна концентрація еквівалента йоду;

E – молярна маса еквівалента аскорбінової кислоти в г, яка в даному випадку дорівнює 88 г; V – об'єм витраченого на титрування йоду, у мл.

Для перерахування на вміст вітаміну С в 100 г продукту (X) використати формулу:

$$X = \frac{M \cdot 1000}{2} (\text{г})$$

11.3.7 Якісні реакції на вітамін А (ретинол, антиксерофтальмічний)

11.3.7.1 Реакція Друммонда

Вітамін А з концентрованою сірчаною кислотою в хлороформному розчині утворює комплекс синього кольору.

В пробірку до 2-3 крапель розчину вітаміну А або риб'ячого жиру додають 2-3 краплі концентрованої сірчаної кислоти. Вміст пробірки забарвлюється в синій колір, який з часом змінюється на фіолетовий і бурий.

11.3.7.2 Реакція з ферум (II) сульфатом

Вітамін А з ферум (II) сульфатом у кислому середовищі утворює сполуку червоно-рожевого кольору.

У пробірку до 2-3 крапель розчину риб'ячого жиру в хлороформі в співвідношенні 1:5 або 0,05% масляного розчину вітаміну А в хлороформі

доливають 5-10 крапель льодяної оцтової кислоти, насиченої сульфатом заліза (II) і 1-2 краплі концентрованої сірчаної кислоти. З'являється блакитне забарвлення, яке поступово перетворюється на червоно-рожеве. Каротини у цій реакції мають зелене забарвлення.

11.3.8 Якісні реакції на вітамін D (кальциферол, антирахітичний)

11.3.8.1 Реакція з аніліном

Під час нагрівання хлороформного розчину вітаміну D або риб'ячого жиру з сумішшю аніліну та концентрованої соляної кислоти розчин забарвлюється в червоний колір.

У суху пробірку вносять 1-2 краплі риб'ячого жиру або хлороформного розчину вітаміну D й додають 1 краплю анілінового реактиву - анілін із концентрованою HCl (15:1). Після перемішування утворюється емульсія жовтого кольору, під час нагрівання до кипіння забарвлення змінюється на зелене, потім на червоне. Через 1-2 хв емульсія розділяється на два шари. Нижній шар забарвлений у інтенсивно червоний колір.

11.3.8.2 Реакція з бромом

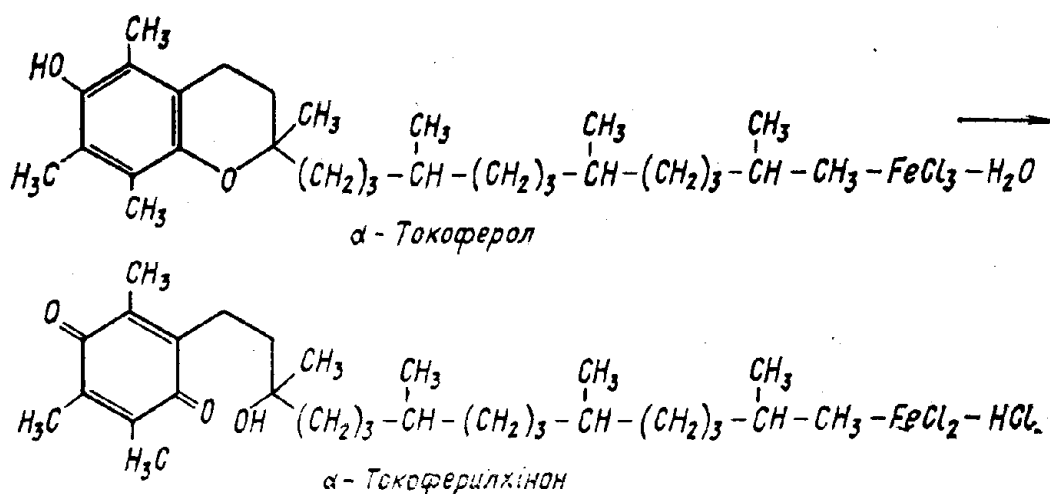
Розчин вітаміну D або риб'ячий жир із розчином броду в хлороформі забарвлюється в зелено-блакитний колір.

У пробірку з 2-4 краплями розчину вітаміну D у хлороформі або риб'ячого жиру додають 4-5 крапель розчину броду в хлороформі (1:60). Суміш у пробірці поступово забарвлюється в зелено-блакитний колір.

11.3.8 Якісні реакції на вітамін Є (токоферол)

11.3.8.1 Реакція з нітратною кислотою

Взаємодія α -токоферолу з концентрованою нітратною кислотою зумовлює забарвлення реакційної суміші в червоний колір. Це спричинено тим, що продукт окиснення α -токоферолу має хіноїдну структуру. Під час взаємодії з ферумом (III) хлоридом α -токоферол окиснюється до α -токоферилхінону – сполуки червоного кольору:



В суху пробірку вносять 5 крапель 0,1% спиртового розчину вітаміну Є, додають 1 мл концентрованої нітратної кислоти, інтенсивно перемішують і спостерігають поступову появу червоного забарвлення.

11.3.8.2 Реакція з ферум (III) хлоридом.

У суху пробірку вносять 0,5 мл 0,1% спиртового розчину α-токоферолу, потім 0,5 мл 1% розчину феруму (III) хлориду й інтенсивно перемішують. Спостерігають появу червоного забарвлення.

11.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Вітаміни А і D. Їх біологічна роль.
2. Якісні реакції на вітамін Є.
3. Якісні реакції на вітамін D та А.
4. Що являють собою вітаміни і чому вони так називаються?
5. Як класифікують вітаміни?
6. Назвіть основні джерела вітамінів.
7. В чому полягає біологічна роль вітамінів?
8. Дайте визначення поняттям: гіповітаміноз, авітаміноз, поліавітаміноз, гіпервітаміноз.
9. Охарактеризуйте номенклатуру та класифікацію вітамінів.
10. Який вітамін бере участь в утворенні світлочутливих пігментів сітківки ока (зорового пурпуру)?
11. При недостатності якого вітаміну проявляються симптоми підвищеної ламкості і проникності капілярів, крапковими крововиливами і кровоточивістю ясен.

Лабораторна робота № 12

Гормони

12.1 Мета: оволодіти методиками якісного визначення гормонів.

12.2 Короткі теоретичні відомості

Однією з умов нормального функціонування всіх органів і систем організму є *гомеостаз*, тобто кількісна і якісна сталість внутрішнього середовища організму, яка забезпечується складними механізмами регуляції, координації та інтеграції процесів, що відбуваються в організмі. У вищих організмів, починаючи з хребетних, головного значення набуває центральна нервова система і спеціальні анатомічні утворення – залози внутрішньої секреції або ендокринні залози. Секрети, що утворюються в клітинах ендокринних залоз, називаються *гормонами* і являють собою біологічно активні органічні речовини, які відіграють регуляторну роль у процесах обміну речовин і функціонуванні органів та тканин. У ході еволюції виникли механізми тісної інтеграції гормональної та нервової регуляції. Роль гормонів полягає в тому, що

вони гуморальним шляхом передають початковий нервовий імпульс у певне місце – клітину-мішень.

Залози внутрішньої секреції поділяють на центральні, що анатомічно пов'язані з ЦНС (гіпоталамус, гіпофіз, епіфіз), і периферичні – щитоподібна, паращитоподібна та підшлункова залози, надниркові та статеві залози, тимус, а також плацента.

У процесі життєдіяльності ЦНС отримує і розшифровує сигнали, що надходять з периферичних органів або із зовнішнього середовища. Цими сигналами можуть бути нервові імпульси або певні хімічні та фізичні впливи. Обидва типи сигналів об'єднуються на рівні гіпоталамуса, який у відповідь на збудження виділяє нейропептиди – так звані фактори регуляції. Останні активують (ліберини) або гальмують (статини) синтез та секрецію відповідних гормонів гіпофіза, які у свою чергу регулюють синтез і секрецію гормонів у периферичних залозах.

В організмі гормони функціонують як хімічні посередники, що передають сигнал про необхідність метаболічних змін у клітинах-мішенях певних органів і тканин організму. Вибірковість дії гормонів обумовлена наявністю в цих клітинах специфічних білкових рецепторів. Відомі два основні шляхи зв'язування гормонів з рецепторами, які визначають відповідну реакцію клітини, тобто механізми їх регуляторної дії. Перший із них є характерним для більшості білкових і пептидних гормонів, катехоламінів, а також простагландинів. При цьому відбувається взаємодія гормонів з рецепторами, які розташовані на поверхні зовнішньої мембрани клітини. У результаті цього ініціюється транспорт через мембрану йонів, наприклад Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , а також можуть активуватися ферменти цитоплазматичної мембрани, зокрема аденілат-і гуанілатциклази. Останні каталізують перетворення АТФ або ГТФ на циклічний АМФ (цАМФ) або цГМФ. Ці сполуки називаються *вторинними посередниками*, оскільки вони переносять сигнал, який доставляє клітині первинний посередник – гормон. Зазвичай гідрофільні гормони всередину клітини не проникають. Головна функція цАМФ і цГМФ – це алостерична активація ферментів протеїнкіназ, які каталізують фосфорилування різних білків у цитоплазмі, ядрі, рибосомах, мембранах з використанням АТФ.

12.3 Експериментальна частина

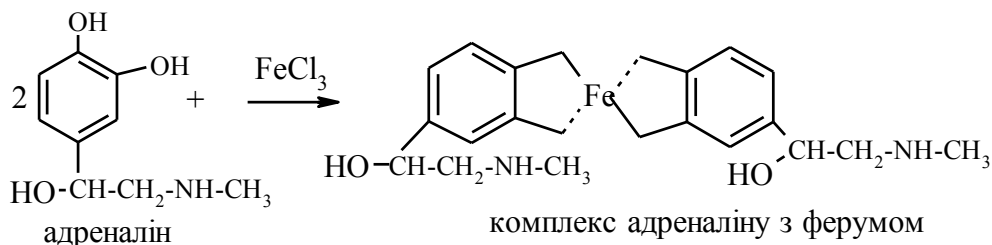
Обладнання і реактиви: 0,1 % розчин адреналіну, 0,15 моль/л феруму (III) хлориду, 0,2 %-вого розчину калію гексаціаноферату (III), 0,5 моль/л натрію гідроксиду, 0,2 % розчину адреналіну гідрохлориду або гідротартрату, гідротартратний буфер рН=3,56, 0,05 моль/л йоду, 0,05 моль/л натрію тіосульфату, 2 мг препарату кортизону ацетату, 2 мг препарату гідрокортизону, концентрована сульфатна кислота, хлороформ, дезоксикортикостерону ацетат, метиловий спирт, реактив Фелінга, водяна баня, 1 % спиртовий розчин прогестерону, 2 % спиртовий розчин м-динітробензену, 30 % розчин натрію гідроксиду, тестостерон.

12.3.1 Якісні реакції на адреналін та норадреналін

12.3.1.1 Реакція на адреналін з феруму (III) хлоридом

Адреналін та норадреналін утворюють з розчином ферум (III) хлориду смарагдово-зелене забарвлення, що переходить від краплі розчину амоніаку у вишнево-червоне забарвлення, а потім в оранжево-червоне.

Метод базується на здатності пірокатехінового угруповання адреналіну утворювати з феруму (III) хлоридом комплексну сполуку смарагдово-зеленого кольору:

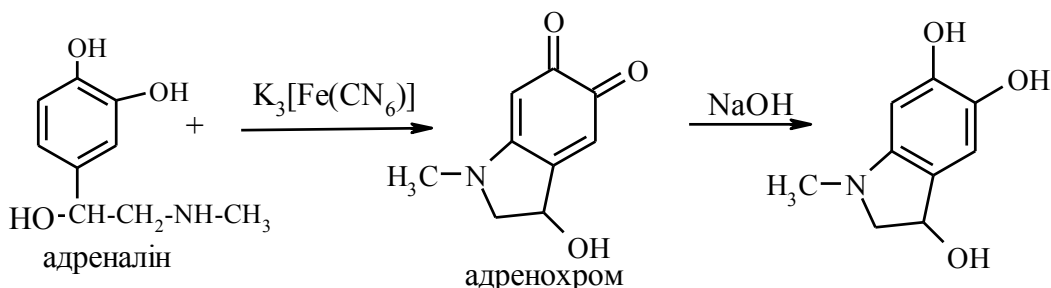


У пробірку приливають 10 крапель 0,1 %-вого розчину адреналіну з ампули та додають 1 краплю розчину 0,15 моль/л феруму (III) хлориду. Спостерігають появу характерного забарвлення.

12.3.1.2 Визначення адреналіну за утворенням флуоресціюючого продукту його окиснення – адренолутину

Метод базується на здатності адреналіну окиснюватися під дією калію гексаціаноферату (III) в адренохром, з якого в лужному середовищі утворюється адренолутин, що має жовто-зелену флуоресценцію

У дві пробірки вносять по 1 краплі 0,1 %-вого розчину адреналіну та додають в одну з них 5, а в іншу – 10 мл води. Перемішують скляною паличкою.



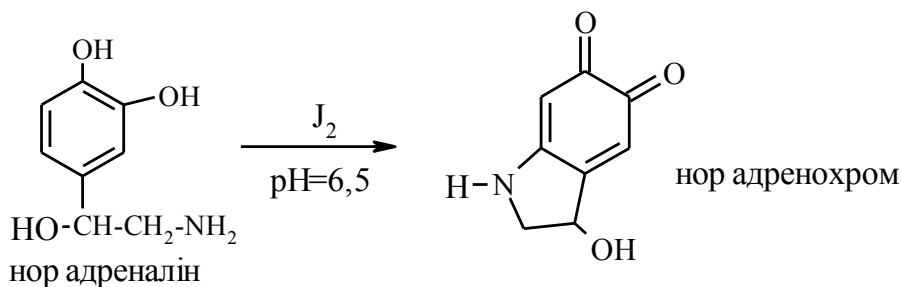
У дві інші пробірки відмірюють по 4 мл розведених розчинів адреналіну, приливають по 0,3 мл 0,2 %-вого розчину калію гексаціаноферату (III) та залишають на 5 хв (при цьому адреналін окиснюється в адренохром).

У кожену пробірку додають на кінчику скальпеля кристалічну аскорбінову кислоту та по 4 мл розчину 0,5 моль/л натрію гідроксиду (аскорбінова кислота перешкоджає подальшому окисненню адренохрому, а натрію гідроксид сприяє перетворенню його на адренолутин). Пробірки розташовують у штативі флуороскопа та порівнюють інтенсивність характерної флуоресценції в пробах.

12.3.1.3 Ідентифікація адреналіну та норадреналіну

Для ідентифікації цих сполук рекомендують проводити окиснення розчином йоду при рН = 3,6 та 6,5. Адrenoхром утворюється при значеннях рН = 3,6 та 6,5, а норадренохром – тільки при рН = 6,5.

Адреналін у розчинах, які мають рН = 3,6 та 6,5, утворює адrenoхром, що надає розчинам темно-червоного забарвлення. Норадреналін утворює норадренохром (червоно-фіолетового кольору) тільки в розчинах, що мають рН = 6,5:



До 1 мл 0,2 % розчину адреналіну гідрохлориду або гідротартрату додають 5 мл гідротартратного буферу рН=3,56 та 2 мл розчину 0,05 моль/л йоду, залишають на 5 хв, після чого змішують з 3 мл розчину 0,05 моль/л натрію тіосульфату. Розчин зберігає темно-червоне забарвлення (відмінність від адреналіну, якщо виникає інтенсивно червоне забарвлення).

Повторюють визначення з 10 мл буферного розчину з рН = 6,5, утворюється червоно-фіолетове забарвлення.

12.3.2 Якісні реакції на гормони коркової частини надниркових залоз

12.3.2.1 Реакція з концентрованою сульфатною кислотою

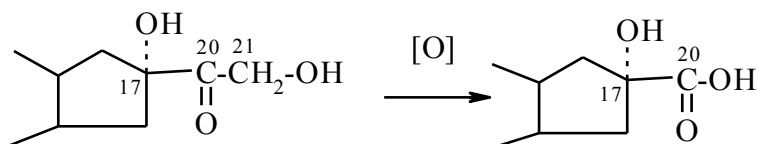
Концентрована сульфатна кислота є загальним внутрішньогруповим специфічним реактивом, який підтверджує наявність стероїдного циклу. У результаті зазначеної реакції кортизон дає жовте забарвлення із зеленою флуоресценцією, дезоксикортикостерон – вишневе забарвлення із зеленувато-коричневою флуоресценцією після розведення водою.

1. В одну пробірку вносять 2 мг препарату кортизону ацетату, у другу – 2 мг препарату гідрокортизону. Потім у кожен пробірку приливають 2 мл концентрованої сульфатної кислоти, обережно струшують і спостерігають за забарвленням, а через 20 хв – флуоресценцією в ультрафіолетовому світлі.

2. 2 мл препарату дезоксикортикостерону ацетату розчиняють в 2 мл концентрованої сульфатної кислоти. Додають 3 мл води (*обережно!*). Спостерігають за забарвленням і флуоресценцією. Після охолодження розчину додають 3 мл хлороформу, струшують. Спостерігають за забарвленням нижнього та верхнього шарів.

12.3.2.2 Реакція з реактивом Фелінга.

При нагріванні на водяній бані суміші спиртових розчинів препаратів кортикостероїдів з реактивом Фелінга випадає червоно-оранжевий осад. Реакція обумовлена відновними властивостями α -кетольної групи (20-оксо-21-гідрокси), яка легко окиснюється до карбоксильної:



Беруть дві сухі пробірки і вносять в одну 0,01 г кортизону ацетату, а в другу – 0,01 г дезоксикортикостерону ацетату. В обидві пробірки додають по 1 мл метилового спирту, пробірки добре струшують до розчинення лікарського засобу. Потім додають по 1 мл реактиву Фелінга і нагрівають на водяній бані, утворюється червоно-оранжевий осад (CuOH і Cu₂O).

12.3.3 Якісні реакції на статеві гормони та їх метаболіти.

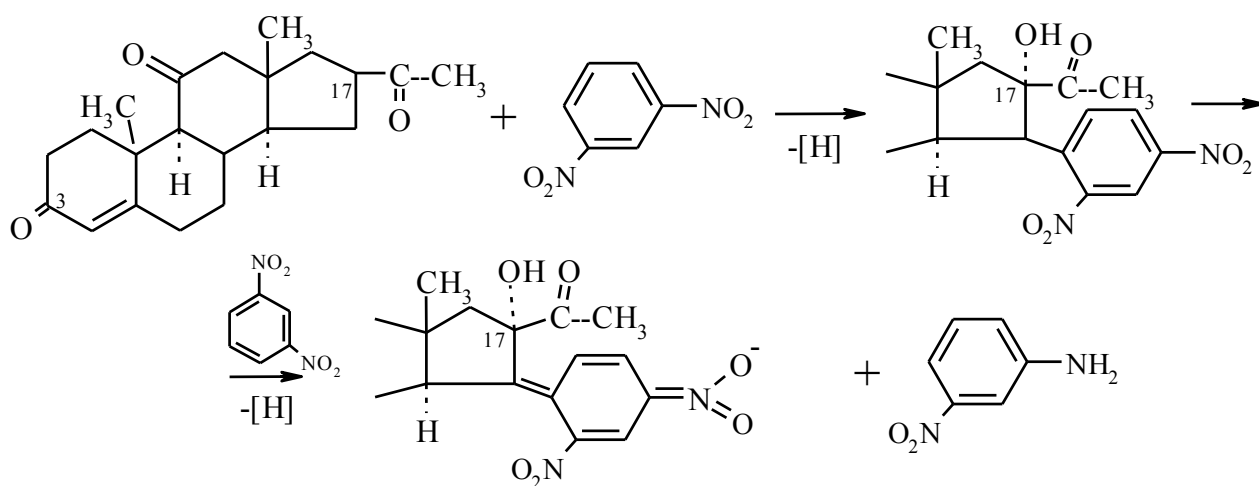
12.3.3.1 Реакція на прогестерон з концентрованою сульфатною кислотою.

При взаємодії прогестерону із сульфатною кислотою утворюється сполука, що має жовте забарвлення із зеленою флуоресценцією.

2 мг прогестерону розчиняють у 2 мл концентрованої кислоти, додають 3 мл води (*обережно!*), струшують. Спостерігають за появою забарвлення і флуоресценції. Після охолодження розчину додають 3 мл хлороформу, струшують; обидва шари забарвлюються.

12.3.3.2 Реакція прогестерону з м-динітробенzenом.

Метод ґрунтується на здатності прогестерону утворювати з м-динітробенzenом у лужному середовищі продукти конденсації рожевого забарвлення, яке поступово переходить у червоно-коричневе:



У пробірку вносять 5 крапель 1 % спиртового розчину прогестерону, додають по 5 крапель 2 % спиртового розчину м-динітробенzenу і 30 % розчину натрію гідроксиду. Пробірки струшують і спостерігають за забарвленням.

12.3.3.3 Реакція на тестостерон пропіонат з концентрованою сульфатною кислотою.

2-3 мг тестостерону пропіонату розчиняють у 2 мл концентрованої сульфатної кислоти. Утворюється жовто-оранжеве забарвлення з характерною флуоресценцією.

12.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Що таке гормони, яка їх хімічна природа і особливості біологічної дії?
2. Назвіть гормони, які мають білкову природу.
3. Які гормони є похідними амінокислот?
4. Назвіть гормони, які мають стероїдну природу.
5. Що лежить в основі якісних реакцій на гормони?
6. Чим відрізняються гормони від вітамінів і ферментів?
7. Якими методами вивчають дію гормонів?
8. Який вплив здійснюють гормони на білковий, жировий і вуглеводневий обмін?
9. Що таке гормоноїди? Наведіть приклади.
10. Які порушення обміну речовин в організмі пов'язані з порушенням дії інсуліну?
11. Назвіть можливі порушення обміну речовин при зміні поглинання та вмісту йоду в щитоподібній залозі.

Лабораторна робота № 13

Біохімія м'язів і м'язового скорочення

13.1 Мета: навчитись виділяти та розпізнавати за допомогою якісних реакцій білкові та небілкові речовини м'язової тканини для діагностики стану організму.

13.2 Короткі теоретичні відомості. М'язи містять 72-80% води і 20-28% сухого залишку. Головною складовою частиною їх є білки (16,5-21% від маси м'язів).

У м'язі розрізняють **структурні білки** (скорочувальні білки фібрил і білки м'язової строми – **міостроміни**); **білки саркоплазми**, які собою являють різні ферменти, що каталізують реакції обміну речовин в м'язі.

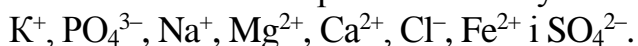
До структурних білків у першу чергу відносяться **міозин** – скорочувальний білок м'язових фібрил, який володіє ферментативними властивостями аденозинтрифосфатази і каналізує реакцію розщеплення АТФ на АДФ і неорганічний фосфат. Інші структурні білки – **актин** і **міостромін** – представляють основу м'язової строми і сарколеми. Окрім цього, актин утворює з міозином скорочувальний комплекс – **актоміозин**, який скорочується під впливом розщеплення АТФ.

Особливе місце серед м'язових білків займає **хромопротеїд** міоглобін, подібний до гемоглобіну. Цей білок здатний приєднувати кисень в багато разів активніше, ніж гемоглобін.

Речовини небілкової природи, які переходять в розчин (екстракт) після осадження м'язових білків, називаються *екстрактивними*. До них відносяться азотовмісні багаті енергією речовини: АТФ, креатинфосфат, креатин, креатинін, карнозин, глутатіон, кодегідрогенази (НАД і НАДФ), вільні амінокислоти і інші речовини.

До безазотистих екстрактивних речовин належать глікоген, глюкоза, гексозофосфорні ефіри, піровиноградна і молочна кислоти, холестерин і фосфоліпіди.

М'язи також містять порівняно велику кількість мінеральних йонів:



Усі ці речовини можуть бути виділені з м'язів, виявлені з допомогою специфічних якісних реакцій і визначені кількісно.

13.3 Експериментальна частина

Обладнання і реактиви: штатив з пробірками, лійки, піпетки, крапельниці, паперові і марлеві фільтри, колбочки на 50 мл, стаканчик на 50 мл, водяна баня, годинник, лакмусовий папір, штатив з пробірками, крапельниці, піпетки, спиртівка, водяна баня, м'язи тварин, насичений розчин пікринової кислоти, 10% розчин CH_3COOH , 5% розчин H_2SO_4 , дистильована вода, скляний пісок, 10% розчин $NaOH$, 2% розчин фенолу, 10 крапель розчину хлористого железа, 3% розчин молібденовокислого амонію $(NH_4)_2MoO_4$, концентрована HNO_3 , 1% розчин $BaCl_2$, 1 М розчин $NaOH$ і 1 мл 0,05 М розчину $CuSO_4$.

13.3.1 Відкриття креатину і креатиніну

Креатин дає з пікриною кислотою в лужному середовищі кольору реакцію (оранжево-червоне забарвлення). Для того, щоб одержати кольорову реакцію з креатином, його треба перевести в креатинін нагріванням з H_2SO_4 .

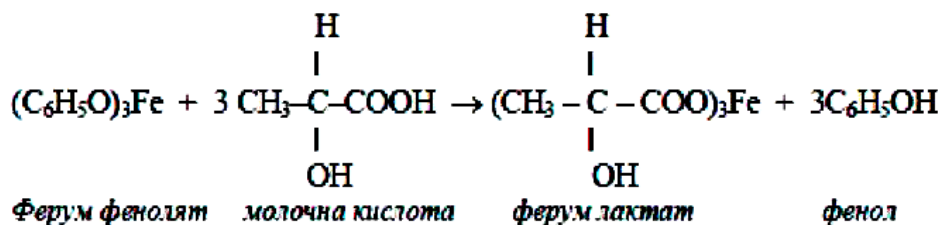
Готують водний екстракт м'язів – м'язи розтирають з скляним піском, переносять в стаканчик, заливають 30 мл води і настоюють 15 хв, час від часу помішуючи скляною паличкою. Потім рідину фільтрують через 3 шари марлі в чисту колбочку. Залишок тканини в стаканчику знову заливають 30 мл води, настоюють, помішуючи, 15 хв. й фільтрують в колбочку. Готують безбілковий фільтрат м'язів – 15 мл водного екстракту м'язів підкислюють 5 краплями 10%-ного розчину CH_3COOH і кип'ятять. Білки випадають в осад. Рідину фільтрують через паперовий фільтр в колбочку

У дві пробірки наливають по 1 мл безбілкового фільтрату. В 1-у пробірку додають 1 мл 5%-ного розчину H_2SO_4 і нагрівають 30 хв. на киплячій водяній бані. Рідину нейтралізують (на лакмус) 10%-ним розчином $NaOH$ фільтрують в нову пробірку через паперовий фільтр. Потім в обидві пробірки наливають по 3 мл 10%-ного розчину $NaOH$ і по 5-8 краплин насиченого розчину пікринової кислоти. В обох пробірках появляються оранжево-червоне забарвлення, більш інтенсивне в 1-й пробірці.

Результат досліду записують, пояснивши причину різниці в забарвленні.

13.3.2 Визначення вмісту молочної кислоти в м'язовій тканині методом Уффельмана

Ферум фенолят (реактив Уффельмана – 100 мл 2% розчину фенолу + 10 крапель розчину хлористого заліза) при взаємодії з молочною кислотою утворює ферум лактат жовто-зеленого кольору, інтенсивність якого пропорційна вмісту молочної кислоти і визначається колориметрично:



1 г подрібнених м'язів гомогенізувати з 5 мл дистильованої води і профільтрувати через марлю складену вдвоє. Фільтрат поставити на киплячу водяну баню на 1 хв та повторно профільтрувати.

У три пробірки внести по 5 мл 1% розчину фенолу і по краплі 1% розчин ферум (III) хлориду до утворення фіолетової забарвлення: після цього в першу (дослідну) пробірку додати 1 мл фільтрату, у другу (стандартну) - 1 мл стандартного розчину літій лактату або іншої солі молочної кислоти, у третю (контрольну) - 1 мл води.

Визначити екстинкцію стандартної і дослідної проби на ФЕК (синій світлофільтр, кювета довжиною оптичного шляху 5 мм) відносно контролю.

Розрахунок вмісту молочної кислоти провести за формулою:

$$C_d = \frac{C_{ст} \cdot E_d}{E_{ст}}$$

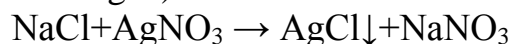
C_d - вміст молочної кислоти в дослідній пробі, (мг%); $C_{ст}$ - вміст молочної кислоти у стандартній пробі (мг%); E_d - екстинкція дослідної проби; $E_{ст}$ - екстинкція стандартної проби.

Провести розрахунки та записати висновок

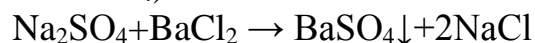
13.3.3 Відкриття мінеральних йонів

Відкриття мінеральних йонів засновано на утворенні ними з відповідними реактивами нерозчинних, погано дисоційованих і забарвлених сполук. Так, йон фосфорної кислоти в кислому середовищі дає жовтий осад при додаванні молібденово-кислого амонію в результаті утворення комплексної фосфомолібденової сполуки.

Йони хлору відкривають за появою осаду при додаванні солей срібла (утворення білого нерозчинного AgCl):



Йон сульфату – по випаданню осаду при додаванні солей барію (утворення нерозчинного BaSO_4):



В три пробірки наливають по 1 мл безбілкового фільтрату. В 1-у пробірку добавляють рівний об'єм 3%-ного розчину $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, підкисляють

азотною кислотою і кип'ятять на спиртівці або водяній бані. Появляється жовте забарвлення або випадає жовтий осад (в залежності від кислотності). В 2-у пробірку додають декілька краплин 1%-ного розчину AgNO_3 . Спостерігають випадання осаду. В 3-ю пробірку додають декілька краплин 1%-ного розчину BaCl_2 . Випадає білий осад.

Результати та реакції досліду і його пояснення записують в протокол.

13.3.4 Виділення основних білків м'язів

Метод ґрунтується на поступовому виділенні з м'язової тканини білка міогену (білок м'язової плазми), який відноситься до групи альбумінів і розчиняється у воді, потім міозину (структурного білка м'язів), який у воді не розчиняється і може бути виділений з м'язів розчином солей з великою йонною силою і колагену (білка сполучної тканини). Для якісного визначення користуються біуретовою реакцією, яка служить доказом наявності пептидних зв'язків в білках і поліпептидах.

13.3.5 Одержання водяної витяжки м'язів (міогену)

М'язову тканину (біля 0,5 г) розтирають в ступці з 10 краплинами дистильованої води до одержання гомогенної маси. Потім по краплинах додають 3 мл дистильованої води при помішуванні. Водяну витяжку фільтрують через марлевий фільтр. Залишок м'язової тканини залишають для одержання сольової витяжки, а з фільтратом проробляють біуретову реакцію: при додаванні до розчину білка 1 мл 1 М розчину NaOH і 1 мл 0,05 М розчину CuSO_4 розчин набуває червоно-фіолетового забарвлення.

Висновки записують в протокол.

13.3.6 Одержання сольової витяжки (міозину)

Тканину яка залишилася після одержання водяної витяжки промивають від залишків водорозчинної альбумінової фракції шляхом промивання новими порціями води (по 2 мл) до того часу, поки розчин не перестане давати біуретову реакцію. Промиваючи рідину виливають, а відміту тканину в ступці заливають 2 мл дистильованої води і залишають на 5 хв. Глобулінова фракція переходить в розчин. Рідину відділяють фільтруванням.

Залишок тканини зберігають для одержання колагену, а з невеликими порціями фільтрату проробляють біуретову реакцію.

Результати реакції і висновки записують в протокол.

13.3.7 Одержання колагену

Для виділення слідів глобулінової фракції залишок тканини промивають на фільтрі новими порціями (по 2 мл) 5% розчином KCl поки розчин не перестане давати біуретову реакцію.

Промивну рідину виливають. Залишок тканини переносять з марлевого фільтру в пробірку, заливають 1 мл дистильованої води, закривають пробіркою з холодильником і кип'ятять на киплячій водяній бані близько 30 хв. При нагріванні колаген сполучної тканини переходить в розчин.

Гарячий розчин фільтрують і з фільтратом проробляють біуретову реакцію. Одержують синьо-фіолетове забарвлення, яке характерне для розчину колагену. Результати реакції записують в протокол.

13.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Який хімічний склад м'язового волокна?
2. Перелічіть, які містяться в м'язах фосфоровмісні сполуки?
3. Перелічіть, які містяться в м'язах вуглеводи?
4. Яка роль міозину і актину в скороченні м'язів?
5. У чому суть хімізму м'язового скорочення?

Лабораторна робота № 14

Дослідження біохімічних властивостей сечі

14.1 Мета: на основі дослідження фізичних властивостей сечі, рН сечі, наявності або відсутності білку, цукру та інших компонентів, характеру осаду навчитись давати оцінку протіканню процесів обміну речовин в організмі спортсмена.

14.2 Короткі теоретичні відомості

Біохімічний аналіз сечі широко розповсюджений в спортивній практиці. Він дозволяє судити про протікання процесів обміну речовин в організмі спортсмена і про реакції його на фізичні навантаження.

В останній час при дослідженні сечі широко використовують уніфіковані методи, багато з яких передбачають використання спеціальних наборів реактивів.

При аналізі сечі спочатку визначають її фізичні показники (колір, запах, прозорість, питому вагу). Зміна кольору сечі може залежати як від її концентрації, так і від наявності в ній жовчних пігментів (зеленувато-коричневий або жовто-коричневий колір), кров'яних пігментів (червонуваті відтінки) і т. п. Зміна запаху сечі може бути викликана виділенням з сечею лікарських речовин або незвичайних продуктів обміну речовин (наприклад, при наявності великої кількості ацетону сеча набуває запаху гнилих яблук; сильний запах аміаку говорить про лужне бродіння сечі). Помутніння сечі може бути викликане випаданням в осад солей (при лужній реакції – фосфорнокислих, при кислій – сечовокислих), а також наявністю гною в сечі (свідчить про захворювання нирок і сечовивідних шляхів).

Відносна густина сечі коливається від 1,010 до 1,025 г/см³. Це залежить перш за все від величини сечовідділень і, значить, від концентрації сечі: чим вона більша, тим вища відносна густина. Підвищення відносної густини сечі може бути пов'язано з появою в ній складових частин, наприклад цукру.

Реакція сечі в звичайних умовах слабкокисла. При посиленому м'ясному харчуванні вона стає ще кислішою, а при рослинному – слабколужною.

Пасивне виділення кислих речовин, наприклад молочної кислоти, після інтенсивних фізичних навантажень веде до ще більш різких зсувів реакції в кислу сторону.

При посиленому виділенні лужних речовин (наприклад, в гірських умовах), а також при деяких захворюваннях реакція сечі може стати лужною.

Нормальними складовими частинами сечі є сечовина, креатинін, солі сечової і щавелевої кислот, йони хлору, амонію, натрію, фосфату. Незвичайними складовими частинами – білок, який з'являється в сечі після значних фізичних навантажень і при захворюваннях нирок і сечовивідних шляхів; цукор, як наслідок значного підвищення його вмісту в крові (аліментарна гіперглікемія, зв'язана зі значним емоційним збудженням, або захворювання цукровим діабетом). Кетонові тіла, які з'являються в сечі при недостатньому їх окисненні в тканинах; жовчні пігменти і жовчні кислоти (при захворюваннях печінки і жовчовивідних шляхів) і ін.

У сечі здорової людини глюкоза міститься в незначній кількості (не вище 0,4 г/л) і не може бути виявлена звичайними хімічними реакціями. Виділення цукру із сечею в кількості понад норму обумовлено або збільшенням його вмісту в крові (понад 9 ммоль), або підвищенням пропускної здатності нирок. Стійке підвищення цукру в крові спостерігається при порушенні гормональної регуляції вуглеводного обміну і найчастіше при панкреатичному діабеті. Вміст цукру в сечі при тяжких формах діабету може досягати 450 ммоль/л. Глюкозурію, що обумовлюється порушенням пропускної здатності нирок, так звану ниркову, спостерігають при введенні до організму великої кількості алкоголю, опіуму, адреналіну, хлороформу, флорадзину та інших речовин. Для визначення цукру в сечі застосовують проби Троммера, Фелінга і Ніландера.

14.3 Експериментальна частина

14.3.1 Визначення фізичних показників сечі

Обладнання і реактиви: сеча, дистильована вода, лакмусовий або індикаторний папір, розчин вапняного молока (розчин $\text{Ca}(\text{OH})_2$, у воді), 10% розчин NaOH , насичений розчин пікринової кислоти, 5% розчин HNO_3 , 5% розчин AgNO_3 , 3% розчин молібденовокислого амонію, насичений розчин щавелевокислого амонію, концентрована HNO_3 , розчин концентрованого аміаку, 20% розчин сульфосаліцилової кислоти, концентрована HNO_3 , реактив Фелінга, реактив Бенедикта (1,73 г лимоннокислого натрію і 10 г безводного Na_2CO_3 , розчиняють при кип'ятінні в 70 см³ дистильованої води. Окремо розчиняють 1,73 г CuSO_4 в 10 см³ дистильованої води. Розчини зливають і після охолодження доводять до 100 см³), 10% розчин нітропрусиду натрію, 10% розчин NaOH , концентрована CH_3COOH , 10% розчин FeCl_3 , 30% розчин азотної кислоти (відносна густина 1,2г/см³).

Штатив з пробірками, крапельниці, піпетки, спиртівка, водяна баня, фільтри, лійки, годинник, піпетки на 1 см³, лійки, паперові фільтри, скляні палички, циліндри на 50 см³ і 200 см³, урометри.

14.3.1.1 Визначення кольору, запаху і осаду сечі

У мірний циліндр на 50 см³ наливають сечу. Колір і прозорість визначають на око, користуючись такою термінологією: безбарвна, блідо-

жовта, солом'яно-жовта, шафранно-жовта, рожево-жовта, кроваво-червона, червоно-бура, бура, зеленувато-бура; прозора, мутнувата і мутна.

Запах позначають термінами – нормальний, аміачний, плодовий (при надлишку ацетону) і т.п. Фізичну характеристику сечі записують в протокол.

14.3.1.2 Дослідження відносної густини сечі

Відносну густину сечі визначають з допомогою спеціального ареометра (урометра). Він має нижню широку частину, яка містить грузило, і верхню трубку, в якій знаходиться шкала з поділками. Є два види урометрів – з поділками від 1 до 1,03 і від 1,03 до 1,06.

Сечу наливають в циліндр на 200 см³, по стінці, щоб запобігти утворенню піни, яка заважає встановленню рівня, занурюють урометр. Рівень відмічають по цифрі на шкалі, до якої занурився урометр. Для цього циліндр піднімають так, щоб рівень рідини в ньому знаходився на рівні очей, і реєструють ту мітку на стержні урометра, яка відповідає нижньому меніску рідини.

Якщо густина сечі рівна, або перевищує 1,018, то концентраційна здатність нирок збережена, що виключає необхідність її дослідження з допомогою спеціальних проб.

Мінімальна кількість сечі, яка доступна урометричному дослідженню, рівна 40 см³. Якщо сечі менше 40 см³, її розбавляють до вказаного об'єму і останню (значиму) цифру густини розчину множать на ступінь розведення. Наприклад, якщо для аналізу одержано 20 см³ сечі, то її розводять в циліндрі дистильованою водою у два рази (до 40 см³) і з допомогою урометра визначають густину розчину. Якщо вона дорівнює 1,006, то істинна густина сечі, взятої для дослідження, рівна 1,012.

14.3.2 Визначення хімічних показників сечі

14.3.2.1 Визначення реакції сечі

У пробірку з сечею опускають лакмусовий папірець. Про реакцію сечі судять за кольором внесеного в неї лакмусового папірця: почервоніння говорить про кислоту, а посиніння – про лужну реакцію. Для точнішого визначення реакції використовують індикаторний папір.

Він має ряд поперечних смужок, які по-різному змінюють колір в залежності від активної реакції середовища. До набору папірців додається шкала з вказівкою, яка зміна кольору відповідає тому чи іншому рН. Папірець занурюють в сечу, а потім порівнюють зі шкалою і визначають рН сечі.

Результати досліду записують в протокол.

14.3.2.2 Відкриття солей амонію в сечі

У пробірку наливають 2 см³ сечі, додають 4 краплини вапняного молока і злегка підігрівають на спиртівці, закріпивши біля верхнього краю пробірки змочений дистильованою водою червоний лакмусовий папірець. Через деякий час він синіє в результаті лужної реакції за рахунок виділеного аміаку.

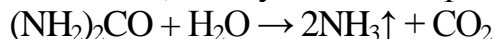
14.3.2.3 Відкриття креатиніну

У пробірку наливають 1 см³ сечі, додають 4 краплини 10% розчину NaOH і стільки ж насиченого розчину пікринової кислоти. З'являється яскраво оранжеве забарвлення пікрату креатиніну.

Результати дослідів і рівняння реакції записують в протокол.

14.3.2.4 Відкриття сечовини

У пробірку наливають 2 см³ сечі, додають 6 краплин 10% розчину NaOH і обережно кип'ятять. Біля верхнього краю прикріплюють змочений водою червоний лакмусовий папірець. Внаслідок виділення аміаку, який утворюється при гідролізі сечовини, лакмусовий папірець синіє:



Результати дослідів і рівняння реакції записують в протокол.

14.3.2.5 Відкриття хлоридів в сечі

У пробірку наливають 2 см³ сечі, додають 1-2 краплини 5% HNO₃, і 1-2 краплини 5% розчину AgNO₃. Випадає білий осад.

Результати дослідів і рівняння реакції записують в протокол.

14.3.2.6 Відкриття фосфатів в сечі

У пробірку наливають 1 см³ сечі, підкисляють її азотною кислотою, додають 2 см³ 3% розчину молібденовокислого амонію і нагрівають на спиртівці або водяній бані. Поступово утворюється жовтий осад фосфорномолібденовокислого амонію. Результати дослідів і рівняння реакції записують в протокол.

14.3.2.7 Відкриття йонів кальцію в сечі

У пробірку наливають 2 см³ сечі і додають 4 краплини насиченого розчину щавлевокислого амонію. Відразу ж випадає осад щавлевокислого кальцію.

Результати дослідів і рівняння реакції записують в протокол.

14.3.2.8 Відкриття білку в сечі

Проба з сульфосаліциловою кислотою

До 3-4 см³ профільтрованої сечі додають 4-6 краплин сульфосаліцилової кислоти. При позитивній пробі відбувається помутніння реакційної суміші. Необхідно пам'ятати, що надлишок кислоти веде до розчинення білка і помутніння зникає.

Проба є однією з високочутливих і специфічних, бо при додаванні сульфосаліцилової кислоти рН сечі знижується до 1-2, в результаті чого білки реагують з кислотою в якості катіону, утворюючи нерозчинні солі сульфосаліцилової кислоти.

Результат реакції записують в протокол.

Проба з концентрованою азотною кислотою (проба Геллера)

У пробірку наливають 1-1,5 см³ концентрованої HNO₃. Обережно по стінці нашаровують сечу. При наявності білка на межі двох рідин утворюються білі кільця.

Результат реакції записують в протокол.

Кількісне визначення вмісту білка за Стольниковим

В п'ять пронумерованих пробірок наливають по 2 см³ води. Потім в 1-у пробірку доливають 2 см³ профільтрованої сечі. Вміст пробірки перемішують і 2 см³ розведеної сечі з цієї пробірки переносять в наступну пробірку і т.д. Із 5-ої пробірки (після перенесення в неї 2 см³ з 4-ої і перемішування) 2 см³ виливають геть. Таким чином одержують сечу, розведену в 2, 4, 8, 16, 32 рази.

В кожен пробірник наливають по стінці азотної кислоти. Відмічають найбільше розведення, в якому спостерігається позитивна реакція (поява кільця).

Відомо, що мінімальний вміст білку, який дає утворення кільця, рівний 0,0033%. Тому, для вираження результату аналізу в процентах вмісту білка, знайдену величину розведення множать на 0,0033.

Результат аналізу записують в протокол.

14.3.2.9 Відкриття і визначення вмісту глюкози в сечі

Виявлення глюкози в сечі

У пробірник наливають 2 см³ профільтрованої сечі і проробляють реакцію Фелінга. Результат досліду записують в протокол.

Напівкількісне визначення глюкози в сечі (орієнтовний експрес-метод). У ступці розтирають у тонкий порошок 1 г купрум(II) сульфату і 10 г безводного натрій карбонату. На предметне скло насипають трохи порошку, наносять кілька крапель сечі і нагрівають до кипіння. Синій колір означає, що глюкоза відсутня, жовтувато-зелений означає, що глюкоза присутня в межах 0,5%, зелений – 1 %, коричнево-червоний – до 2 %, інтенсивно-червоний – вище 2 %.

Кількісне визначення глюкози в сечі за Бенедиктом

У пробірник наливають 5 см³ реактиву Бенедикта, додають точно 8 крапель сечі і кип'ятять 2 хв. на спиртівці. Якщо сеча не містить цукру, то колір не міняється. При наявності цукру колір стає горохово-зеленим (0,08-0,1 % цукру), коричнево-зеленим (0,5%), коричневим (0,6%), жовтим (1%), червоним (2% і більше).

Результати досліду записують в протокол.

14.3.2.10 Відкриття кетонів в сечі

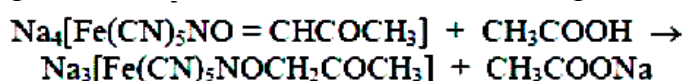
Ацетон і ацетооцтова кислота (кетонів тіла) з нітропрусидом натрію в лужному середовищі утворюють продукти реакції, забарвлені в червоний колір.

При дії концентрованої оцтової кислоти утворюються продукти вишневого кольору.

Ацетооцтова кислота здатна також утворювати з хлоридом заліза (III) комплексну сполуку вишнево-червоного кольору.

Реакція з нітропрусидом натрію (проба Легала)

У пробірник внести 2,5 мл сечі, додати 0,5 мл 10% розчину натрій гідроксиду та 0,5 мл 10% розчину натрій нітропрусиду і перемішати. Спостерігати за розвитком забарвлення. Після цього у пробірник додати 1 мл концентрованої ацетатної кислоти та спостерігати за зміною забарвлення.



Результат досліду і висновки записують в протокол.

Реакція з хлоридом заліза

У пробірник наливають 2 см³ дистильованої сечі і додають по краплях 10% розчину FeCl₃, до припинення утворення осаду фосфатів. Осад відфільтровують, до фільтрату додають ще декілька крапель FeCl₃, і

спостерігають за по явою вишневого забарвлення. Результати дослідів і висновки записують в протокол.

14.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Які нормальні складові частини сечі?
2. Назвіть патологічні складові частини сечі і вкажіть, при яких захворюваннях вони з'являються.
3. Скільки сечі виділяється за добу із організму здорової людини?
4. Назвіть найважливіші компоненти сечі здорової людини.
5. В яких межах коливається густина сечі здорової людини?
6. Від чого залежить рН сечі?
7. Як впливає характер їжі на фізико-хімічні властивості сечі?
8. У вигляді яких сполук виділяються з організму хлориди і скільки?
9. Як якісно та кількісно можна визначити білок у сечі?
10. Як якісно та кількісно визначають глюкозу в сечі?
11. Пояснити поняття "ацетон сечі". Яке діагностичне значення проби на ацетон?
12. Записати хімізм реакції взаємодії ацетону з йодом.
13. Що означають назви "кетонемія" і "кетонурія"?
14. Що являє собою ацетон і за яких умов він утворюється в організмі?
15. Яке діагностичне значення має визначення ацетону та ацетоацетатної кислоти?
16. Записати схему утворення кетонових тіл.
17. За яких умов вміст ацетону і ацетоацетатної кислоти в рідинах організму зростає?

Лабораторна робота № 15

Біохімічне дослідження крові

15.1 Мета: навчитись за біохімічними показниками крові судити про м'язову діяльність, діяльність тканин і органів людини під час фізичних навантажень.

15.2 Короткі теоретичні відомості.

Біохімічне дослідження крові має більше значення для вивчення реакції організму спортсмена на фізичні навантаження, ніж дослідження сечі.

До біохімічних показників крові, які дають найбільш важливу інформацію і разом з тим легко доступні для визначення, належать вміст у крові цукру, молочної кислоти і вільних жирних кислот.

За рівнем цукру в крові при м'язовій діяльності судять про ступінь забезпечення мобілізації резервних вуглеводів і забезпечені цукром працюючих м'язів, нервової системи і серця. Якщо підвищена при м'язовій діяльності потреба тканин і органів у вуглеводах повністю задовольняється шляхом зростання їх мобілізації, то рівень цукру в крові залишається постійним. При недостатній мобілізації він знижується, при надмірній (наприклад, в умовах великого емоційного збудження) зростає.

Вміст цукру в крові в стані спокою коливається від 80 до 100 мг% , а при м'язовій діяльності може (залежно від її характеру, тривалості і умов виконання) зменшуватися до 60-50 мг% або збільшуватися до 200 і більше мг%.

Вміст у крові вільних жирних кислот характеризує ступінь мобілізації ліпідів. У спокої він складає від 0,550 до 0,700 мілі-молей в 1 л. При тривалій м'язовій діяльності, в період відпочинку, коли основним джерелом енергії (субстратом окислення в м'язах) стають жирні кислоти, утримання їх у крові зростає і може досягати 1,0 і більше мілі-молей віл.

Рівень молочної кислоти в крові дозволяє судити про співвідношення процесів аеробного окиснення і анаеробного гліколізу, посилення останнього в працюючих м'язах призводить до підвищення вмісту молочної кислоти в крові. У стані спокою воно становить від 7 до 15 мг%. При інтенсивній м'язовій діяльності (наприклад, після бігу на середні дистанції) може зростати до 200 і навіть більше мг %. Переключення організму під час м'язової діяльності з анаеробного гліколізу на аеробне окиснення супроводжується зниженням рівня молочної кислоти.

У період відпочинку після роботи зміна вмісту молочної кислоти в крові характеризує швидкість відновлення працездатності. Чим швидше протікає процес реституції , тим швидше знижується рівень молочної кислоти.

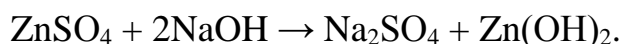
Оскільки швидкість і ступінь мобілізації вуглеводів і ліпідів, інтенсивність гліколізу і швидкість заміни його аеробним окисненням при м'язовій діяльності, як і швидкість процесу біохімічної реституції в період відпочинку, залежать від ступеня тренування спортсмена, дослідження змін вмісту цукру, жирних кислот і молочної кислоти в крові дуже важливо для оцінки тренуваності і контролю за процесом спортивного тренування.

15.3 Експериментальна частина.

Обладнання і реактиви: 0,1 н. NaOH, 45 % ZnSO₄, розчину (1,65 г K₃[Fe(CN)₆], 10,6 г безводного Na₂CO₃, до 1 л води), розчин (5 г KI, 10 г ZnSO₄, 50 г NaCl, до 200 г води), 3 % розчин оцтової кислоти, 1 % розчину крохмалю, 0,005 н. розчином натрій тіосульфату, пробірки з широким горлом, фільтрувальний папір, водяна баня, гаряча вода, мікробюретки.

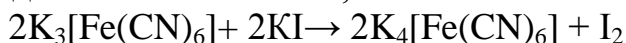
15.3.1 Визначення вмісту цукру в крові по Хагедорну і Іенсену

Білки видаляють за допомогою цинк гідроксиду, який одержують за реакцією:

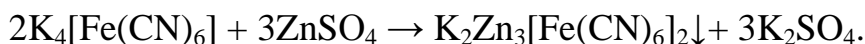


Безбілковий фільтрат нагрівають з калій гексаціанофератом (III) (K₃[Fe(CN)₆]), який при взаємодії з глюкозою відновлюється до K₄[Fe(CN)₆].

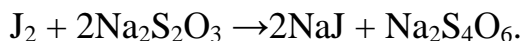
Калій гексаціаноферат (III) береться у надлишку, його залишок відтитрують йодометрично. При взаємодії з калій йодидом K₃[Fe(CN)₆] у K₄[Fe(CN)₆], а йод виділяється в кількості, еквівалентній кількості K₃[Fe(CN)₆]:



Ця реакція оборотна, тому її ведуть у присутності $ZnSO_4$, який утворює з $K_4[Fe(CN)_6]$ нерозчинний осад:



Йод, який виділився, відтитрують натрій тіосульфатом:



За кількістю виділеного йоду визначають кількість $K_3[Fe(CN)_6]$, який залишився, визначають, скільки $K_3[Fe(CN)_6]$ пішло на окислення глюкози, а отже, і її вміст.

Техніка виконання аналізу. У 2 пробірки наливають по 1 см^3 $0,1\text{ н.}$ розчину $NaOH$, вводять в кожну по $0,1\text{ см}^3$ крові, додають 5 см^3 $0,45\%$ -ного розчину $ZnSO_4$ і ставлять в киплячу водяну баню на 3 хв. Фільтрують через паперовий фільтр в широкі пробірки. У пробірку з залишком осаджених білків наливають 2 рази по 3 см^3 гарячої води, яку зливають потім у широку пробірку через фільтр.

До фільтрату в широкій пробірці додають 2 см^3 розчину ($1,65\text{ г}$ $K_3[Fe(CN)_6]$, $10,6\text{ г}$ безводного Na_2CO_3 , до 1 л води) і ставлять на 15 хв в киплячу водяну баню. Одночасно в баню ставлять і «сліпий дослід», тобто пробірку, куди налиті всі інгредієнти, крім крові (контроль на реактиви). Через 15 хв пробірки виймають з бані, охолоджують і додають 3 см^3 розчину KI з $ZnSO_4$ (5 г KI , 10 г $ZnSO_4$, 50 г $NaCl$, до 200 г води), 2 см^3 3% -ного розчину оцтової кислоти і 2 краплі 1% -ного розчину крохмалю. Розчин забарвиться в синій колір, відтитрують до знебарвлення $0,005\text{ н}$ розчином натрій тіосульфату, користуючись мікробюретками на 2 см^3 з поділками на $0,1\text{ см}^3$.

Вміст цукру в $0,1\text{ см}^3$ крові визначають за таблицею 15.1. У крайньому вертикальному стовпці її (ліворуч) відраховують кількість цілих і десятих мілілітрів $0,005\text{ н.}$ розчину тіосульфату натрію, а у верхньому горизонтальному – залишаються соті частки. Відповідна цифра таблиці дає кількість міліграмів цукру в $0,1\text{ см}^3$ крові; в 100 см^3 його в 1000 разів більше. Наприклад, на титрування дослідів пішло в першому випадку $1,40\text{ см}^3$, у другому – $1,42\text{ см}^3$, а на титрування контролю – $1,97\text{ см}^3$. Середньою величиною для дослідів буде $1,41\text{ см}^3$. У таблиці 16.1 знаходимо, що це відповідає $0,104\text{ мг}$ в $0,1\text{ см}^3$, або $104\text{ мг}\%$ ($0,104 \times 1000$). Результат титрування контролю відповідає $-0,005\text{ мг}$, або $5\text{ мг}\%$. Значить, вміст цукру в крові буде дорівнювати $104 - 5 = 99\text{ мг}\%$.

Таблиця 15.1 – Дані для визначення вмісту цукру у крові

(мл)	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141,	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,130	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,-015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002

15.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. В яких межах може коливатися рН крові здорової людини?
2. Коли рівень цукру в крові вище – натщесерце або через 2 години після сніданку і чому?
3. Чи однаково буде змінюватися він при виконанні тривалих фізичних навантажень натщесерце або після сніданку?
4. Поясніть причини особливо значного збільшення змісту, цукру в крові при спортивних іграх.
5. При бігу на 100-400 м рівень цукру в крові частіше підвищується, а при бігу на відрізки 100-метрової дистанції нерідко знижується. Які причини цього ?
6. Чому відразу після бігу на 100 м рівень молочної кислоти в крові нижче, ніж через 1-2 хв. після фінішу, а відразу після бігу на довгі дистанції вище, ніж через 1-2 хв. після фінішу?
7. Чим пояснюється те, що при бігу на наддовгі дистанції рівень молочної кислоти в крові на початку бігу вище, ніж наприкінці його?
8. Розташуйте дистанції легкоатлетичного бігу по мірі підвищення рівня молочної кислоти в крові, викликаного бігом на цих дистанціях. Яка подальша доля молочної кислоти, що надійшла в кров при м'язовій діяльності (перерахуйте всі шляхи її усунення) ?

ДОДАТОК А

ПРАВИЛА РОБОТИ В ЛАБОРАТОРІЇ І ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ

При роботі в хімічній лабораторії необхідно неухильно виконувати правила роботи та техніку безпеки:

- старанно готуватися до кожного лабораторного заняття;
- стисло записувати в журналі усі спостереження, зроблені під час експерименту;
- усі склянки з реактивами закривати пробками і ставити на постійні, відведені для них місця. Не брати зайву кількість реактивів, а коли це випадково трапиться, не виливати надлишок у загальну склянку, щоб не забруднювати реактив у склянці;
- усі операції з леткими та шкідливими речовинами проводити лише у витяжній шафі;
- ніяких речовин в лабораторії не коштувати на смак. Нюхати речовини можна, лише направляючи на себе пару або газу легким рухом руки, а не нахилиючись до посудини і не вдихаючи на повні груди;
- категорично забороняється затикувати ротом у піпетки кислоти, луги, органічні речовини і їх розчини;
- під час нагрівання рідких і твердих речовин у пробірках і колбах заборонено направляти їх отвори на себе і сусідів, не зазірати зверху у посудину, яка нагрівається відкрито, щоб запобігти можливого враження під час викиду гарячої маси;
- категорично забороняється виливати у раковину концентровані розчини кислот і лугів, а також різноманітні органічні розчинники, сильно пахучі і вогнебезпечні речовини. Усі ці відходи потрібно зливати у спеціальні бутлі;
- не входити до лабораторії у верхньому одязі, не класти на хімічні столи портфелі, валізки та інші непотрібні для хімічного дослідження речі;
- вимкнути після роботи електронагрівальні прилади, загасити газові пальники, перевірити, чи добре закручені водопровідні крани;
- при опіку полум'ям, кислотами, лугами і при отруєнні реактивами або газом, слід негайно звернутися до викладача або лаборанта для надання першої допомоги. У тяжких випадках до потерпілого негайно слід викликати лікаря.

ДОДАТОК Б

ПРИГОТУВАННЯ РЕАКТИВІВ ТА РОЗЧИНІВ

Амоніачний розчин аргентуму нітрату – до 2-3% розчину аргентуму нітрату додають концентрований розчин амоніаку до розчинення осаду.

Амонію молібдату розчин у нітратній кислоті – 7,5 г амонію молібдату розчиняють у 100 мл води і додають 100 мл 32 % нітратної кислоти.

Бенедикта реактив – 17,3 г натрію цитрату і 10 г безводного натрію карбонату розчиняють при нагріванні в 50 мл води (не доводячи до кипіння), додають 10 мл 17,3% розчину купруму сульфату, перемішують, кількісно переносять у мірну колбу на 100 мл і доводять об'єм водою до мітки.

Біуретового реактиву – 0,75 г купруму сульфату та 3 г калію натрію тартрату розчиняють у 250 мл води в мірній колбі ємністю 1 л, потім при енергійному перемішуванні додають 150 мл 10% розчину натрію гідроксиду, 1г калію йодиду, перемішують і доводять об'єм розчину водою до мітки.

Гідротартратного буферу рН=3,56 для визначення адреналіну та норадреналіну. Розчин калію гідротартрату, насиченого при 25°C.

Дифеніламінового реактиву – 1 г дифеніламіну розчиняють у 100 мл льодяної оцтової кислоти. До розчину додають 2,75 мл концентрованої сульфатної кислоти

Індігокармін – 1 г індігокарміну розтирають у фарфоровій ступці, розчиняють у 50 мл концентрованої сульфатної кислоти, додають води до об'єму 1л, фільтрують і зберігають у посудині з темного скла.

Міллона реактив – готують під тягою. У 57 мл HNO_3 конц. розчиняють 40г меркурію спочатку на холоді, а потім ледь нагріваючи на водяній бані. Одержаний розчин розбавляють двома об'ємами води, дають відстоятися і зливають з осаду. Зберігають у посудині з темного скла.

Молочно-ацетатної суміші – свіже незбиране молоко змішують навпіл з ацетатним буфером при рН=4,9. У закритому посуді на холоді ця суміш придатна до використання понад два тижні.

Насичена бромна вода – 5г бром у 100 мл води в колбі з притертою пробкою струшують під витяжкою, зрідка трохи відкриваючи пробку для видалення накопичившихся парів бром у.

Ніландера реактив – 2 г основного бісмуту нітрату та 4 г калію натрію тартрату розчиняють у 15 частинах води; перед використанням додають амоніак до слаболужної реакції. Розчин має бути прозорим і зеленого кольору.

Орцинового реактиву – до 1 г орцину прилити 500 мл 30%-вої хлоридної кислоти ($\rho=1,15 \text{ г/см}^3$). Перемішати до розчинення та додати 4-5 мл 10% розчину феруму (III) хлориду. Реактив зберігають у щільно закупореній темній посудині.

За Лоурі та Сяткіним реактиви 1 і 2 для визначення білка:

Реактив 1 складається з двох розчинів: 1) 4 г натрію гідроксиду розчиняють у воді в мірній колбі місткістю 1 л, додають 20 г натрію карбонату і доводять об'єм розчину водою до мітки; 2) 1 г купруму сульфату розчиняють у

воді в мірній колбі місткістю 100 мл і доводять об'єм водою до мітки; 2 г натрію тартрату чи натрію цитрату розчиняють у воді в мірній колбі місткістю 100 мл і доводять об'єм розчину водою до мітки; обидва розчини зливають при перемішуванні.

Реактивом 1 служить суміш 49 мл розчину 1 і 1 мл розчину 2. Готують перед використанням.

Реактив 2. 1 мл розчину 2 поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл і доводять 2 % -вим розчином натрію карбонату до мітки.

Робочого розчину йоду – 0,3 г йоду розчиняють у 3% розчині калію йодиду і до 1об'єму 0,3% розчину йоду додають 9 об'ємів води.

Розчин йоду в розчині калій йодиду (розчин Люголя) – У 100 мл розчиняють 20 г калію йодиду і 10 г йоду. Перед використанням розчин розводять у 5 раз.

0,5 М спиртового розчину КОН – розчиняють 40 г КОН в 30 мл води. В залежності від концентрації спиртового розчину беруть відповідну кількість водного розчину КОН і розводять перегнаним над NaOH спиртом (на 100 г спирту 5 г NaOH). Спирт кип'ятять над лугом зі зворотнім холодильником впродовж години, потім переганяють. Розчин відстоюють добу, фільтрують та зберігають в склянці темного скла, добре закривши пробкою (захищають від вуглекислоти повітря).

Тирозину 0,1 % розчин – 0,1г тирозину розчиняють при слабкому нагріванні в 100 мл 0,01М розчину натрію гідрокарбонату.

Трис-буфер (0,1 моль/л, рН = 7,1...9,2)

24,2 г трис-(гідроксиметил)-амінометану розчиняють у мірній колбі місткістю 1 л (у 500 мл H₂O). Для одержання необхідного значення рН додають указаний у таблиці Б.1 об'єм 1 моль/л HCl і доводять водою до 1000 мл.

Таблиця Б.1 – Приготування трис-буфера

рН	HCl, мл	рН	HCl, мл	рН	HCl, мл
7,1	189	7,8	150	8,5	50
7,2	183	8,1	90	8,7	16,5
7,4	170	8,3	70	9,2	5,75

Фелінга реактив. Готують окремо два розчини. Розчин 1 – у мірній колбі місткістю 1 л розчиняють 200 г калію-натрію тартрату і 150 г NaOH і доводять водою до мітки. Розчин 2 – у мірній колбі місткістю 1 л розчиняють у воді 40 г купрум (II) сульфату і доводять водою до мітки; перед використанням змішують рівні об'єми цих розчинів.

Фенілгідазину сульфат, розчин. 0,1 г фенілгідазину гідрохлориду розчиняють у 100 мл охолодженої суміші з рівних об'ємів концентрованої сульфатної кислоти і води. Розчин має бути свіжоприготовленим.

Фенольний реактив. 100 г натрію вольфрамату і 25 г натрію молібдату розчиняють у 700 мл води, до розчину додають 50 мл концентрованої фосфатної кислоти (85 %) і 10 мл концентрованої хлоридної кислоти. Суміш

обережно нагрівають протягом 10 год у колбі місткістю 1,5 л зі зворотним холодильником, охолоджують і додають 150 г літію сульфату, 50 мл води і кілька крапель рідкого бром; залишок бром відганяють при нагріванні суміші без холодильника (під тягою), охолоджують, доводять об'єм розчину водою до 1 л і фільтрують (основний розчин). Реактив зберігають у захищеному від світла місці. Робочий реактив готують розведенням основного розчину реактиву водою у співвідношенні 1:2 перед використанням.

Ферум-цитратний реактив. Розчиняють 1,5 г форуму (II) сульфату і 1 г натрію метабісульфату в 200 мл води (розчин А). У 10 мл розчину А розчиняють 0,5 г натрію цитрату (розчин Б). Розчин Б використовують тільки в день приготування.

Фоліна реактив – у колбі місткістю 1 л розчиняють 1 г натрію вольфрамату і 20 г фосфатно- молібдатної кислоти в 750 мл води, закривають колбу пробкою зі зворотним холодильником і вміст кип'ятять 10 годин; потім його охолоджують, переливають у мірну колбу і доводять водою об'єм до 1 л.

Фосфатно-цитратний буфер (0,1 моль/л, рН = 5,0...8,0)

Вихідні розчини:

1. Розчин 0,2 моль/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (35,61 г солі розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1 л).

2. Розчин 0,1 моль/л лимонної кислоти (21,01 г кислоти розчиняють у дистильованій воді в колбі місткістю 1 л). Для одержання потрібного рН змішують розчини в кількостях наведених в таблиці Б.2.

Таблиця Б.2 – Розчини для приготування фосфатно-цитратного буфера

рН	Na_2HPO_4 0,2 моль/л	Лимонна кислота 0,1 моль/л
5,6	5,8	4,2
6,4	6,9	3,1
6,8	7,7	2,3
7,2	8,7	1,3
8,0	9,7	0,3

Лимоннокислий буфер, рН якого дорівнює 5,0: змішують **10,3** мл 0,2 М розчину $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ із 9,7 мл 0,1 М розчину лимонної кислоти $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$.

Хлоридна кислота, розведений розчин. Змішують 25 % хлоридну кислоту з водою у співвідношенні 1:2.

Шлунковий сік з підвищеною кислотністю (імітація). Готують, як описано вище, але додають 10 мл концентрованої хлоридної кислоти на 1700 мл шлункового соку.

Шлунковий сік з пониженою кислотністю (імітація). На 1700 мл води беруть 37 г натрію хлориду, 3,5 мл концентрованої хлоридної кислоти та 12 г пептону.

Шлунковий сік нормальний (імітація). На 1700 мл води беруть 37г натрію хлориду, 7 мл концентрованої хлоридної кислоти, 2 мл концентрованої молочної кислоти (40 %) та 12 г пептону. Фільтрують шлунковий сік через два шари марлі та зберігають у холодильнику.

Шлунковий сік патологічний (імітація). До 1 л шлункового соку, але без хлоридної кислоти додають 10 мл молочної кислоти (40 %) і 13,6 мл цитратної крові, додаючи перед кожним визначенням по 10 крапель. Розчин патологічно шлункового соку зберігають у темній склянці в холодильнику.

Рекомендована література

1. Біохімія: Підручник / М.Є.Кучеренко та ін. - Київ: Либідь, 1995.- 464 с.
3. Боечко Ф.Ф. Біологічна хімія. - Київ: Вища школа, 1995. - 536 с.
4. Волков Н.И., Несен Э.Н. Осипенко А.А., Корсун С.Н. Биохимия мышечной деятельности. - К.: Олимпийская литература, 2000.- 504 с.
2. Гонський ЯЛ. Максимчук Т.П. Біохімія людини. - Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. - 736 с.
3. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. - Элиста: АПП "Джангар", 1998.–250 с.
4. Осипенко Г.А. Основи біохімії м'язової діяльності. К.: Олімпійська література, 2007. – 200 с.
5. Практикум з клінічної біохімії /І.Ф. Мешишен, В.П. Пішак,П.П. Григор'єва та ін. - Чернівці, 2000. – 157 с.
6. Совтисік Д.Д. Загальна хімія і біологічна хімія. Практикум. Кам'янець-Подільський: К-ПДУ, 2006. - 124 с.
7. Явоненко О.Ф., Яковенко Б.В. Біохімія. – Суми: ВТД «Університетська книга», 2002. – 315 с.
5. Ленинджер А. Биохимия. – М.: Мир, 1976, -957с.
8. Страйер Л. Биохимия. – М.: Мир, 1985. – 398с.
9. Уайт А. Основы биохимии. – М.: Мир, 1981,-535с.
10. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. – М.: Высшая школа, 1986. – 623 с.