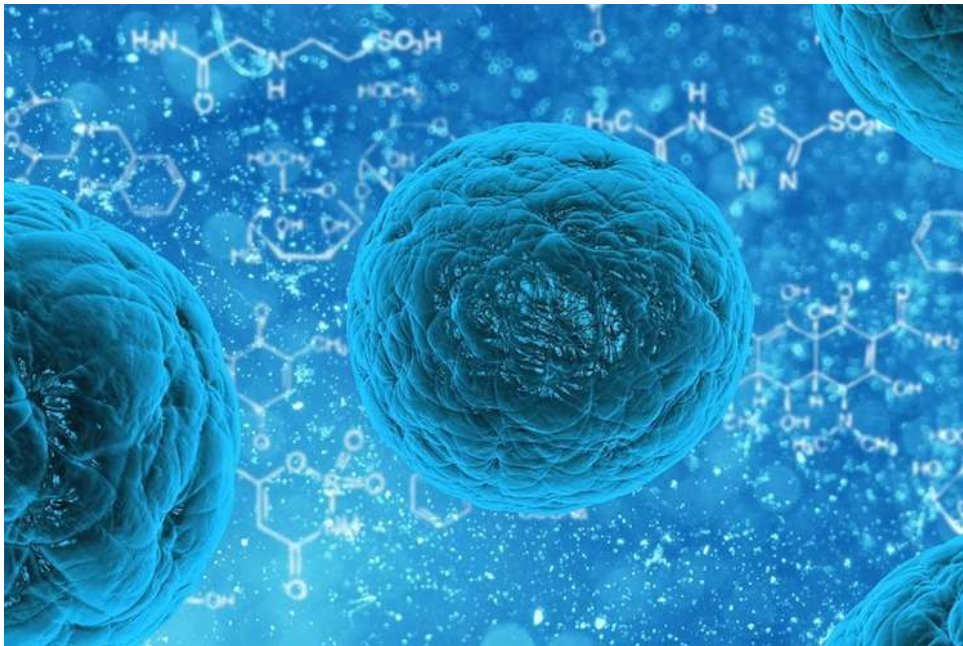


**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «ЧЕРНІГІВСЬКИЙ КОЛЕГІУМ»
імені Т. Г. ШЕВЧЕНКА**

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

**до виконання лабораторних робіт
з курсу *Харчова хімія*
Розділ: Основи біохімії
для студентів спеціальності 181 Харчові технології**



Чернігів 2023

УДК 577.176

Укладачі: кандидат технічних наук, доцент Савченко Олеся Миколаївна,
доктор технічних наук, професор Сиза Ольга Іллівна

Савченко О.М., Сиза О.І.

Біохімія. Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу «Харчова хімія. Розділ: Основи біохімії» для студентів спеціальності 181 Харчові технології / уклад. О.М. Савченко, О.І. Сиза. Чернігів: НУЧК імені Т.Г. Шевченка, 2023. 125 с.

Рецензенти:

Демченко Н.Р.– доцент кафедри біології
Національного університету «Чернігівський колегіум» імені Т.Г. Шевченка,
кандидат біологічних наук

Ткаченко С.В. – доцент кафедри хімії, технологій та фармації
Національного університету «Чернігівський колегіум» імені Т.Г.Шевченка,
кандидат біологічних наук

Затверджено на засіданні кафедри хімії, технологій та фармації:
протокол № 2 від 07 вересня 2023 року

Затверджено на вченій раді природничо-математичного факультету:
протокол №2 від 27 вересня 2023 року

Харчова хімія. Розділ: Основи біохімія є нормативною навчальною дисципліною. Вивчення цієї дисципліни дає майбутнім спеціалістам можливість розуміти суть біологічних процесів у різних галузях біотехнологічних виробництв, кваліфіковано керувати технологічним процесом, науково його обґрунтовувати та вдосконалювати з метою отримання високоякісних продуктів харчування. Запропоновані методичні вказівки містять описи лабораторних робіт, рекомендації до проведення математичної обробки результатів експерименту. Для більш глибокого розуміння курсу перед описом кожної роботи наведено короткі теоретичні відомості. Надано перелік рекомендованої літератури.

Перед виконанням лабораторної роботи з практикуму студенти вивчають запропонований теоретичний матеріал, опрацьовують методичні вказівки до роботи та отримують у викладача дозвіл на її виконання. Після обробки результатів студенти готують звіт.

Зміст

Вступ	4
Лабораторна робота № 1 Прості білки. Якісні кольорові реакції на функціональні групи білків та амінокислот.....	5
Лабораторна робота № 2 Властивості амінокислот, методи виділення і кількісного визначення	14
Лабораторна робота № 3 Фізико-хімічні властивості білків	20
Лабораторна робота № 4 Складні білки: глікопротеїни та нуклеопро­теїни .	31
Лабораторна робота № 5 Складні білки. Дослідження білків молока.....	37
Лабораторна робота № 6 Ферменти, їх будова, властивості та функції. Активатори та інгібітори ферментів.....	41
Лабораторна робота № 7 Специфічність дії ферментів.....	49
Лабораторна робота № 8 Кількісне визначення активності ферментів	51
Лабораторна робота № 9 Обмін речовин та енергії. Біологічне окиснення. Тканинне дихання. Окисно-відновні ферменти	53
Лабораторна робота № 10 Вуглеводи, структура та обмін	62
Лабораторна робота № 11 Визначення глюкози в сечі. Функціональні проби на патологію вуглеводного обміну	71
Лабораторна робота № 12 Фізико-хімічні властивості ліпідів.....	72
Лабораторна робота № 13 Обмін ліпідів. Вплив жовчі на активність ліпази	79
Лабораторна робота № 14 Дослідження фосфоліпідів.....	81
Лабораторна робота № 15 Обмін білків	82
Лабораторна робота № 16 Водорозчинні вітаміни.....	89
Лабораторна робота № 17 Жиророзчинні вітаміни	100
Лабораторна робота № 18 Гормони	103
Лабораторна робота № 19 Біохімія м'язів.....	108
Лабораторна робота № 20 Дослідження біохімічних властивостей сечі.....	111
Лабораторна робота № 21 Біохімічне дослідження крові.....	117
Додатки	121
Рекомендована література	125

В с т у п

Біохімія – одна з базових дисциплін, яка закладає основи для подальшого вивчення майбутніми технологами харчових виробництв профільних дисциплін, а саме: технічної мікробіології, харчової хімії, основ фізіології і гігієни харчування, загальних технологій харчової промисловості.

Даний практикум містить 21 лабораторну роботу із біохімії. В методичних вказівках наведені лабораторні роботи з усіх основних розділів курсу: білки, нуклеїнові кислоти, ферменти, ліпіди, вуглеводи, вітаміни, гормони. При цьому особливу увагу приділено вивченню біологічно активних речовин, що знаходять застосування в харчових технологіях.

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.

При створенні цих методичних вказівок використані знання та навички студентів, що були здобуті з предметів: неорганічна хімія, органічна хімія, аналітична хімія, фізична хімія.

Структура лабораторних робіт дозволяє проводити їх без додаткових вказівок, що особливо актуально в зв'язку з необхідністю підготовки студентів до самостійного рішення проблем в навчально-дослідницькій та практичній роботі. Перед тим, як приступити до виконання лабораторних робіт, кожний студент повинен ознайомитися з правилами роботи і технікою безпеки у хімічній лабораторії (Додаток В). Приготування реактивів та розчинів наведено в додатку А.

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).

Для більш глибокого засвоєння теоретичного матеріалу, протягом семестру студенти виконують різні вправи і розв'язують задачі за індивідуальними завданнями. Це надає викладачам можливість контролю за самостійною роботою студентів та перевіряти своєчасність підготовки їх до лабораторних занять.

Лабораторний практикум визначає той необхідний мінімум знань, які повинен засвоїти студент на лабораторних заняттях. Більш детальні відомості в області різних розділів хімії студенти одержують в лекційних курсах.

Лабораторна робота № 1

Прості білки. 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 (вітаміни, гормони, медіатори та інші), вода і неорганічні іони.

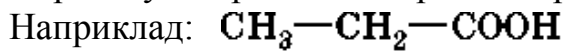
Білки – високомолекулярні нітрогеновмісні органічні сполуки, побудовані з великої кількості залишків амінокислот, з'єднаних між собою пептидними (кислотно-амідними) зв'язками в поліпептидний ланцюг (ланцюги), що мають складну структурну (просторову) організацію та виконують важливі життєві функції.

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%.

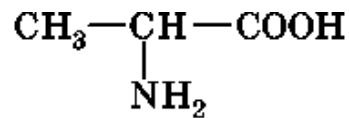
На сьогодні досягнуто значних успіхів у розкритті структури великої кількості білків, у вивченні взаємозв'язку структури і функції білків, механізму їх участі у найважливіших процесах життєдіяльності організму, у розумінні основ патогенезу багатьох хвороб. Білки мають велике народногосподарське значення. 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.



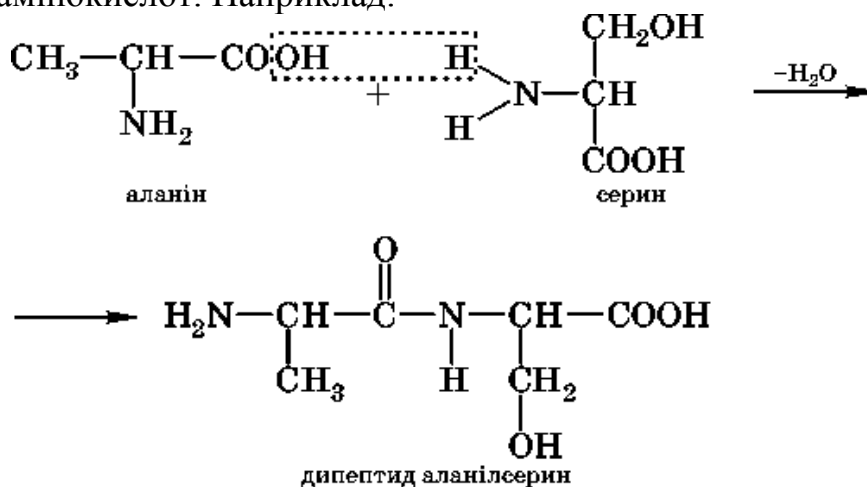
пропіонова кислота



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.

У харчовій промисловості широко використовуються речовини білкової та пептидної природи (ферменти, білкові продукти харчування, харчові і кормові добавки та інші); гідролізати тканинних білків; суміші індивідуальних амінокислот; амінокислоти (цистеїн, гістидин, глутамінова кислота, метіонін та інші); похідні амінокислот (ацетилцистеїн, цистамін та інші).

Існують дві різновидності кольорових реакцій:

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

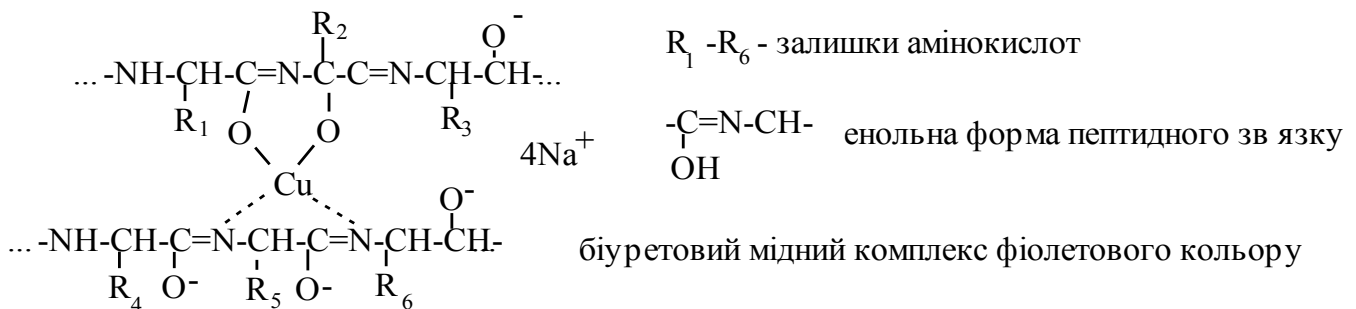
Радикали амінокислот дають різноманітні забарвлення, що зумовлює можливість виявлення більшості з них певними кольоровими реакціями.

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, які використовуються в харчовій промисловості.

1.3 Експериментальна частина

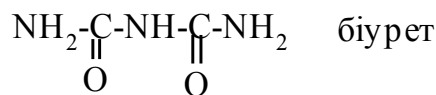
1.3.1 Біуретова реакція на пептидну групу (реакція Піотровського).

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:



При цьому енольна форма поліпептиду, утворена в сильно-лужному середовищі, дає негативний заряд, та її кисень, що взаємодіє з купрумом, утворює ковалентний зв'язок, а при взаємодії з атомами нітрогену, купрум утворює координаційні зв'язки. 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.

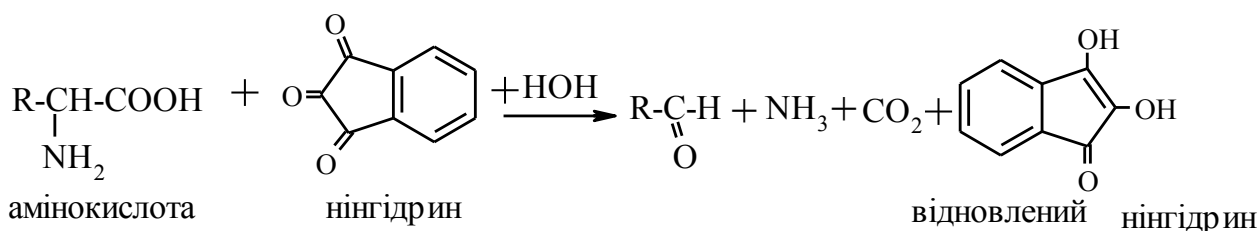
Біурет, що дав назву цій реакції, утворюється при сплавленні двох молекул сечовини:



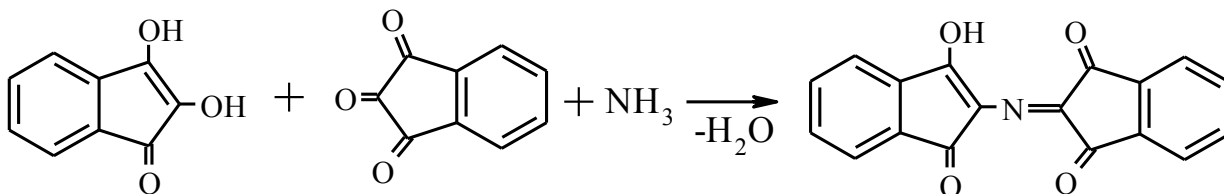
У три пронумеровані пробірки вносять по 1 мл: 1 % розчину яєчного білка; 1 % розчину желатини; 0,1 % розчину амінокислоти гліцину чи аланіну. Добавляють в кожен пробірку по 1 мл біуретового реактиву, ледь збовтують. Спостерігають, чи утворюватиметься синьо-фіолетове забарвлення, дають пояснення (по кожній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

1.3.2 Нінгідринова 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:



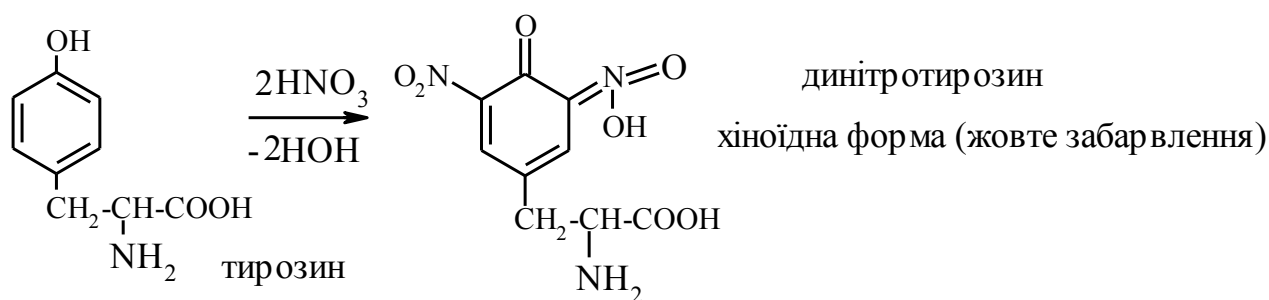
Нінгідринова реакція з використанням спиртового (або ацетонового) розчину широко використовується в хроматографічному аналізі, а також для колориметричного кількісного визначення, амінокислот (цистеїн, метіонін, глутамінова кислота, гістидин; амінокислот у гідролізатах білків).

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:

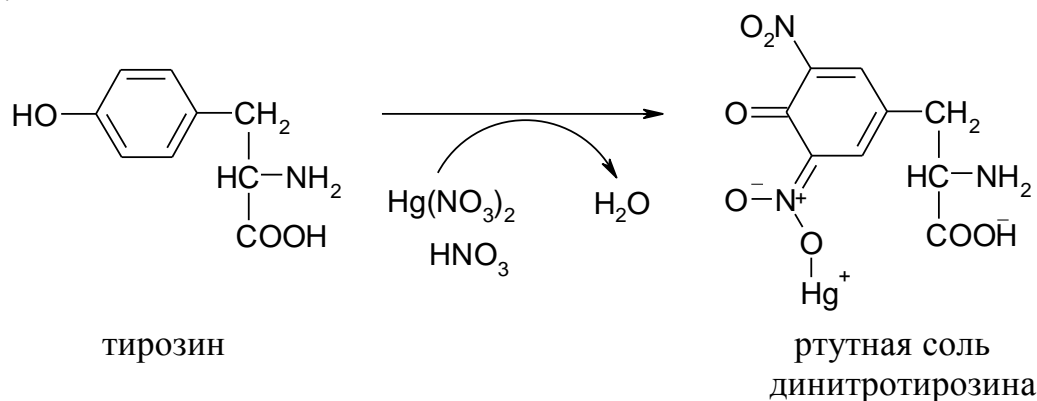


Фенілаланін нітрується важче. Білки, що не містять циклічних амінокислот, не дають ксантопротеїнової реакції.

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 тирозин (реакція Міллона)

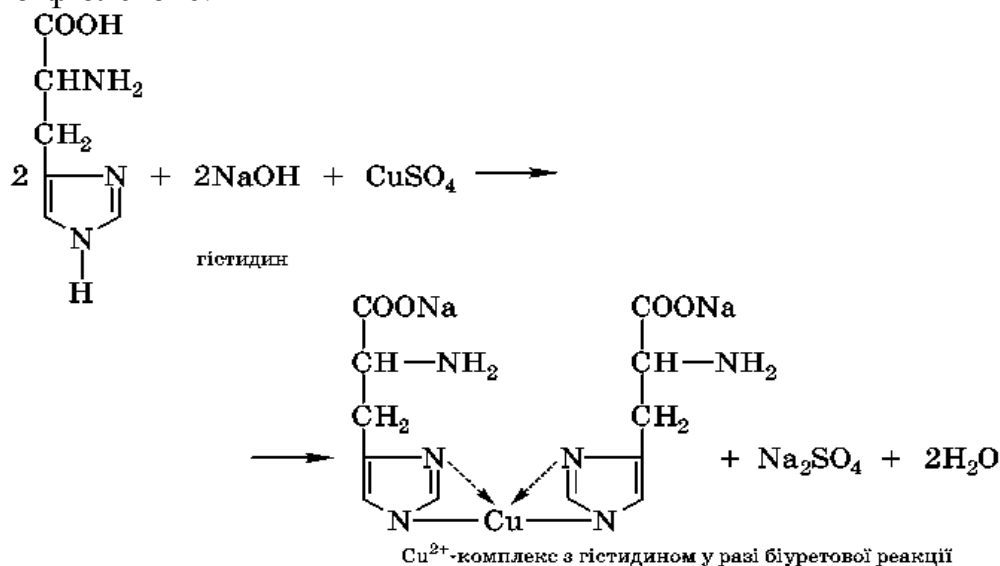
Амінокислота тирозин і білки, що її містять, при нагріванні з реактивом Міллона (суміш меркурію нітратів і нітритів, розчинених в концентрованій нітратній кислоті) утворюють меркурієву сіль динітротирози, забарвлену в пурпурово-червоний колір. Ця реакція не є абсолютно специфічною для тирозину, її дають феноли, поліфеноли, а також алкалоїди, що мають фенольну групу:



В одну пробірку наливають 1 мл 1 % розчину яєчного білка, в другу – 1 мл 0,1 % розчину тирозину і в третю – 1 мл 0,1 % розчину фенілаланіну. Додають у всі пробірки по 3 краплі реактиву Міллона і обережно нагрівають на водяній бані (не вище 50°C). Утворюється меркурієва сіль динітротирози, забарвлена в пурпурово-червоний колір. Дають пояснення і записують хімізм реакції.

1.3.5 Реакція на гістидин

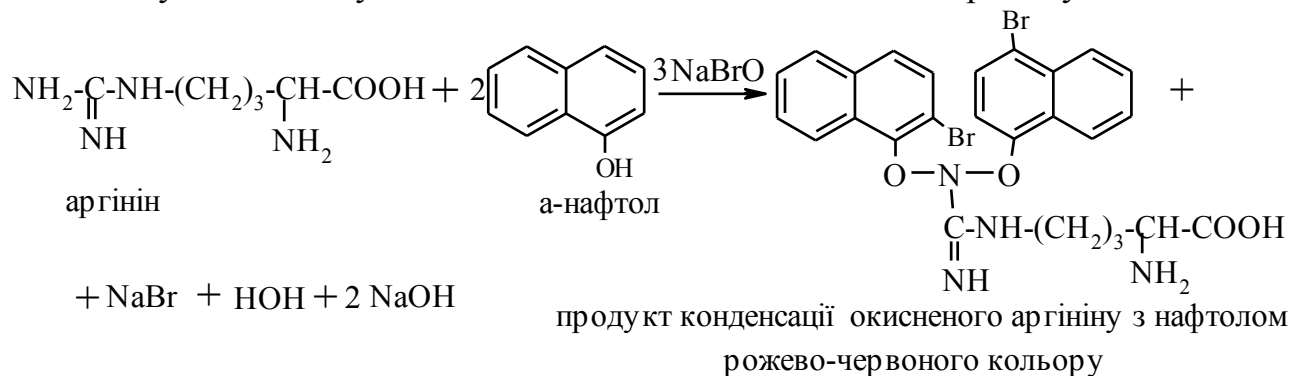
Розчин гістидину значної концентрації в лужному середовищі в присутності купруму сульфату дає фіолетове забарвлення, що переходить у червоно-фіолетове:



До 0,5 мл 4 % розчину гістидину приливають 1,5 мл води, 0,5 мл 10 % розчину натрію гідроксиду і нагрівають до кипіння. До гарячого розчину додають краплю 10 % розчину купруму сульфату (біуретова реакція). Спостерігають за утворенням забарвлення і записують хімізм реакції.

1.3.6 Реакція на аргінін (реакція Сакагучі)

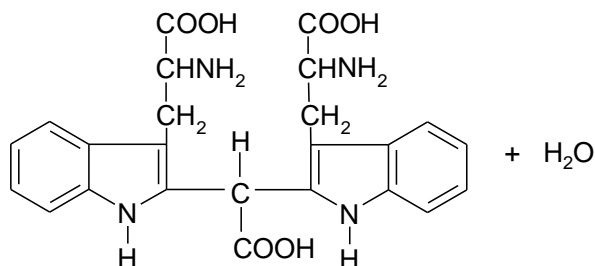
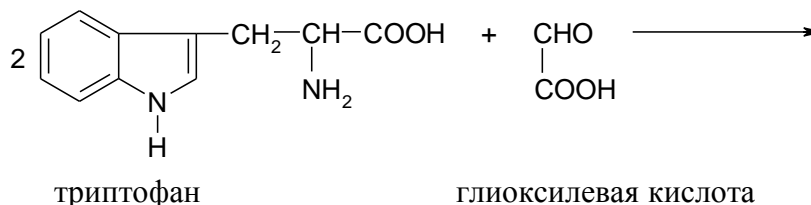
Амінокислота аргінін та поліпептиди, що містять її, окиснюються в лужному середовищі натрію гіпобромітом і в присутності α -нафтолу утворюють продукт конденсації червоного кольору (реакція на гуанідинове угруповання). Реакція не є строго специфічною для аргініну, її дають і інші монозаміщені гуанідину (метилгуанідин, глікоциамін, агматин та інші), але вони відсутні в молекулі білка і не заважають визначенню аргініну:



В одну пробірку вносять 1 мл 1 % розчину яєчного білка, в другу – 1 мл 0,01 %-вого розчину аргініну. У кожену пробірку додають 1 мл 10 %-вого розчину натрію гідроксиду і по 3 краплі 0,2 % спиртового розчину α -нафтолу, ретельно перемішують вміст пробірок, додають по 1 мл 2 % розчину натрію гіпоброміту. Спостерігають за утворенням забарвлення (для стабілізації кольору рекомендується додати 0,5 мл 40 % розчину сечовини) і записують хімізм реакції.

1.3.7 Реакція на триптофан (реакція Адамкевича)

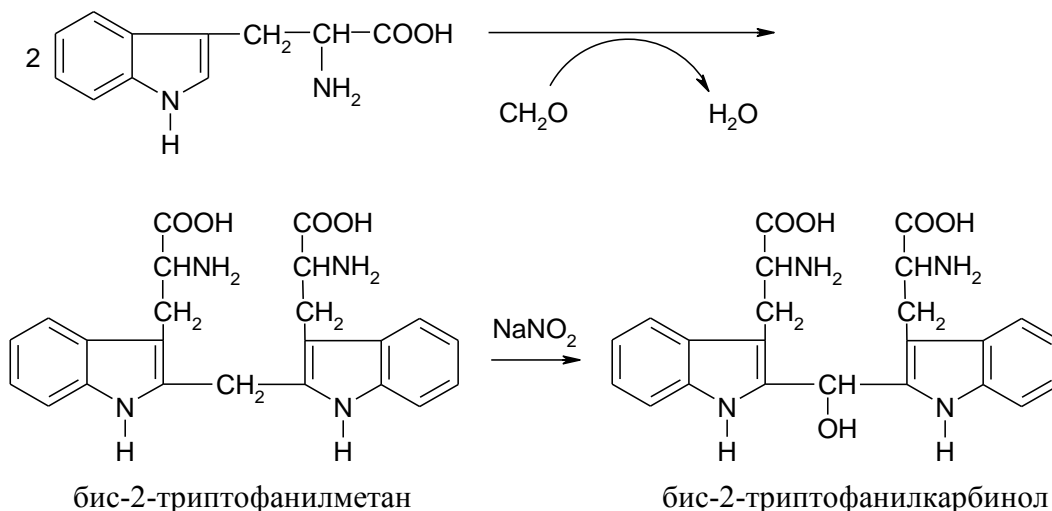
Амінокислота триптофан і білки, що її містять, у кислому (лужному) середовищі реагують з гліоксиловою кислотою (альдегідами), утворюючи продукт конденсації червоно-фіолетового кольору:



У першу пробірку наливають 1 мл нерозведеного білка, в другу – 1 мл 0,1 %- ного розчину триптофану. 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 купруму (II) сульфату.

1.3.8 Реакція Вуазене на триптофан

Триптофан, конденсуючись з формальдегідом, утворює забарвлений продукт конденсації *бис-2-триптофанілметан*, який окислюється до *бис-2-триптофанілкарбінолу*:

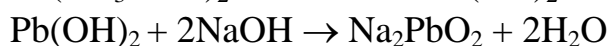
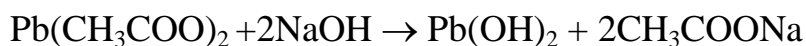
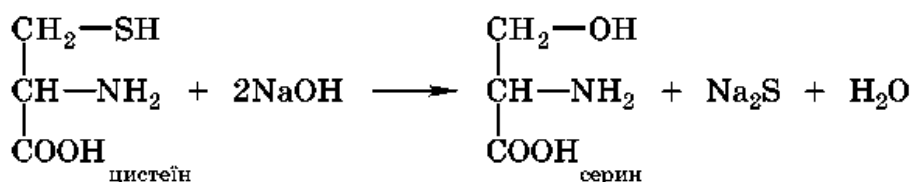


За наявності мінеральних кислот *бис*-2-триптофанілкарбінол утворює солі, які забарвлені в синьо-фіолетовий колір. |

У першу пробірку наливають 2 мл 0,01 % розчину триптофану, в другу – 2 мл 1 % розчину яєчного білка. У кожену пробірку додають одну краплю розчину формальдегіду, суміш перемішують і вливають порціями по декілька крапель 6 мл концентрованої сульфатної кислоти, охолоджуючи пробірку у ванночці з льодом. Суміш знову перемішують і дають відстоятися 10 хв. Потім, перемішуючи суміш, у пробірку вносять десять крапель 0,5 % розчину нітриту натрію; з'являється інтенсивне синьо-фіолетове забарвлення.

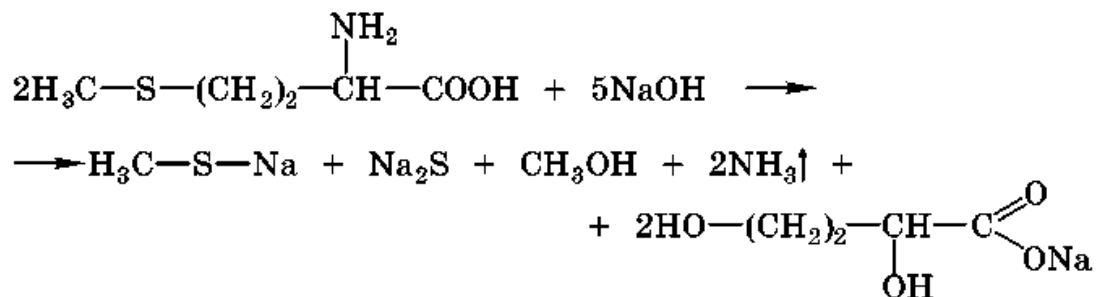
1.3.9 Реакція на амінокислоти, що містять слабозв'язаний сульфур (реакція Фоля)

Сульфгідрильні групи (—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 меркаптану і сульфідів:



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

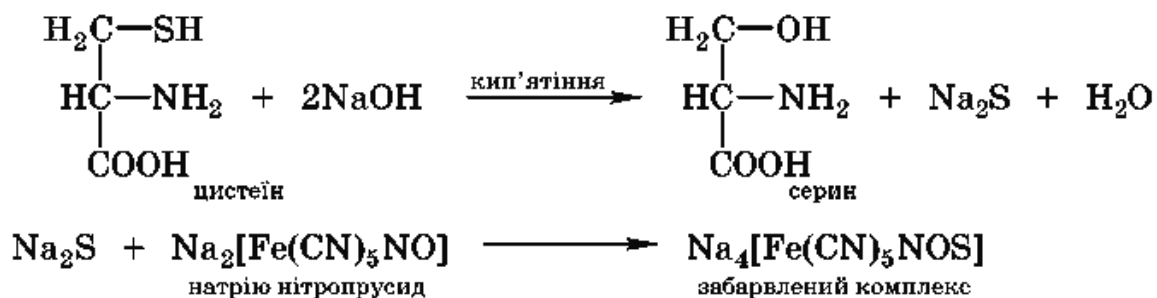
У три пронумеровані пробірки вливають по 10 крапель 5 % розчину плюмбуму ацетату і краплями додають 20 % розчин натрію гідроксиду до розчинення попередньо утвореного осаду. Потім у першу пробірку додають 1

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'ятять. Спостерігають за перетворенням забарвлення в кожній пробірці, дають пояснення і записують рівняння хімічної реакції.

1.3.10 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'ятять 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

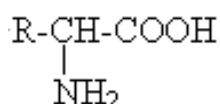
Властивості амінокислот, методи виділення і кількісного визначення

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

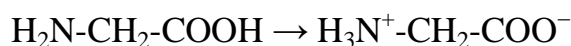
2.2 Короткі теоретичні відомості

Амінокислоти — це нітрогеномісні карбонові кислоти, тобто хімічні сполуки, молекула яких одночасно містять аміногрупу $-\text{NH}_2$ та карбоксильну групу $-\text{COOH}$, і карбоновий скелет.

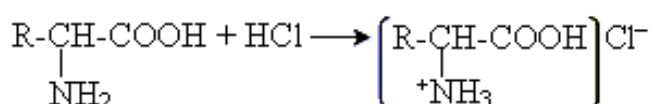
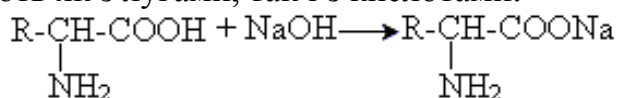
В залежності від положення аміногрупи розрізняють α -, β -, γ -амінокислоти, тощо. Найбільш важливе значення мають α -амінокислоти, які входять до складу білків. В загальному вигляді формулу α -амінокислоти можна представити наступним чином:



Амінокислоти проявляють амфотерні властивості оскільки вміщують як основну групу $-\text{NH}_2$, так і кислотну групу $-\text{COOH}$. Амфотерність амінокислот проявляється, наприклад, при утворенні внутрішніх солей, так званих біполярних йонів:



Амінокислоти реагують як з лугами, так і з кислотами:



Вільні амінокислоти екстрагують із біологічного матеріалу 75-80%-вим водним розчином етанолу. Амінокислоти у витяжці визначають за допомогою реакції з нінгідрином.

Кількісне визначення амінокислот методом формольного титрування за Серенсенем. Метод використовують для визначення карбоксильних груп амінокислот. Визначаючи кількість карбоксильних груп формольним титруванням, одночасно можна встановити наявність амінних груп, тому що кількість карбоксильних груп, що титруються лугом, еквівалентна кількості зв'язаних формальдегідом амінних груп.

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

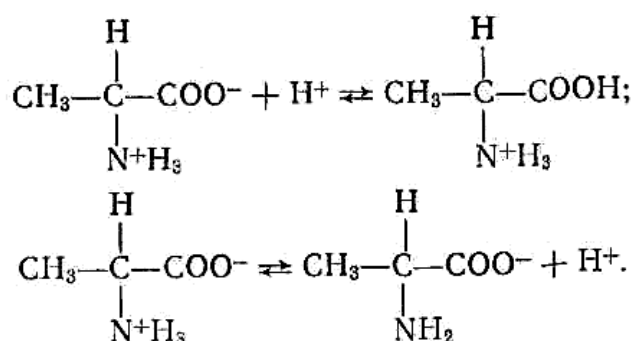
Вміст нітрогену в більшості білків практично близький і може сягати 16 %. Знайдену кількість нітрогену помножують на 6,25 (тому що $100 : 16 = 6,25$) і

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

2.3.1 Амфотерні властивості α -аланіну

Аланін у водному розчині існує у формі біполярного йона і виявляє кислотні і основні властивості:



У дві пробірки вносять по 0,5 мл краплин розчину α -аланіну. В одну з них додають, струшуючи, по краплинам 0,01 моль/л розчин хлоридної кислоти з індикатором конго до зникнення забарвлення (вияв лужних властивостей). В іншу пробірку, постійно струшуючи, додають по краплинам 0,01 моль/л розчин гідроксиду натрію з фенолфталеїном до зникнення забарвлення (вияв кислих властивостей).

2.3.1 Виділення вільних амінокислот із біологічного матеріалу

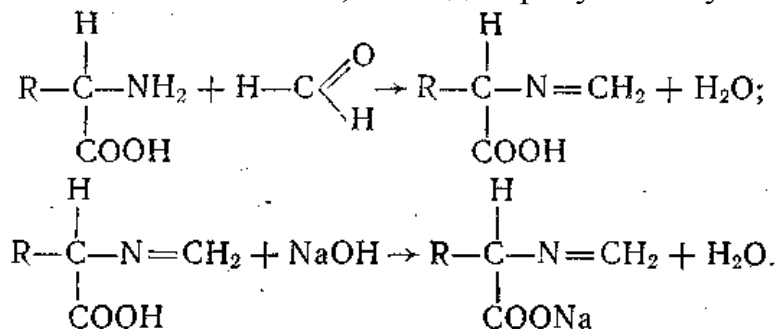
У ступку вміщують 2 г розмолотого сухого біологічного матеріалу та заливають 10 мл 75%-вого розчину етилового спирту, нагрітого до 60-70⁰С на водяній бані. Отриману суміш розтирають протягом 15 хвилин і фільтрують через вставлений у лійку складчастий паперовий фільтр в чашку для випарювання, використовуючи її як приймач. Чашку ставлять на киплячу водяну баню та повністю випарюють спирт. Отриманий сухий залишок розчиняють в 1 мл 1 % розчину соляної кислоти та перемішують скляною паличкою протягом 10-15 хвилин.

Для виявлення амінокислот у витяжці до 5 краплин суміші додають 2 мл дистильованої води і 3- 4 краплини розчину нінгідрину. Суміш перемішують і нагрівають на водяній бані при 70⁰С протягом 5 хвилин. Поява синьо-фіолетового забарвлення, засвідчує про наявність в пробі α -амінокислот.

Якщо густину забарвлення витяжки із нінгідрином виміряти за допомогою колориметра і співставити з густиною забарвленням нінгідрином суміші α -амінокислот відомої концентрації, то можна розрахувати концентрацію α -амінокислот у досліджуваній пробі.

2.3.2 Кількісне визначення амінокислот методом формольного титрування за Серенсом

Метод ґрунтується на здатності амінокислот реагувати з нейтральним розчином формальдегіду з утворенням метиленамінокислот. Цей метод застосовується для визначення карбоксильних груп амінокислот, які титрують розчином лугу, попередньо блокуючи аміногрупи формальдегідом. Під час реакції з формальдегідом аміногрупа втрачає основні властивості, внаслідок чого утворюється метиленамінокислота, яка відтитровується лугом:



Визначаючи кількість карбоксильних груп титруванням, можна одночасно встановити й вміст α -аміногруп, оскільки кількості карбоксильних груп і зв'язаних формальдегідом α -аміногруп еквівалентні.

Готують дві колби на 100 мл. В одну вносять 40 мл розчину амінокислот, що досліджується, в іншу – 40 мл дистильованої води. Додають по 10 крапель розчину фенолфталеїну і 0,05 моль/л розчин натрій гідроксиду (обережно) до забарвлення розчинів (проби і контролю) у ледь помітний рожевий колір. У кожену колбу додають по 10 мл формольної суміші і титрують з бюретки 0,05 М розчином натрій гідроксиду до появи рожевого кольору. Колір проби і контролю повинен бути однаковий.

Масову концентрацію амінокислот (мг/мл) визначають за формулою:

$$C = (A-B)fQ/V,$$

де A і B – об'єми розчину гідроксиду калію, витрачені на титрування проби і контролю (мл); f - коефіцієнт поправки на титр 0,05 моль/л розчину гідроксиду калію (0,97); Q - маса амінокислот, еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину гідроксиду калію (0,7 мг); V – об'єм розчину амінокислоти взятої для аналізу.

2.3.3 Колориметричні методи визначення кількості білка

2.3.3.1. Визначення кількості білка за біуретовою реакцією

Серед різних методів визначення білка особливого розповсюдження набув метод, що базується на біуретовій реакції (див. роботу 1, А). 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

реагенту, 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 реагентів без препарату. Калібрувальний графік будують в межах концентрації від 1 до 10 мг стандартного зразка білка, вимірюючи оптичну густину розчинів при відповідній довжині хвилі.

2.3.3.2 Мікрометод визначення кількості білка з реагентом 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 реагенту 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 реагентів 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.

2.3.3.3 Визначення кількості білка за методом Лоурі

Метод ґрунтується на визначенні інтенсивності забарвлення, яке дає розчин білка в кольорових реакціях — біуретовій і реакції Фоліна (ароматичні амінокислоти і цистеїн). При взаємодії білка з лужним розчином купруму (II) сульфату (реагент 1) утворюються комплексні сполуки (біуретова реакція), які своїми тирозиновими і цистеїновими радикалами відновлюють суміш фосфатно-вольфраматної і фосфатно-молібдатної кислот з утворенням комплексної сполуки синього кольору (реагент Фоліна). Незважаючи на високу чутливість, метод Лоурі має деякі вади, оскільки цю реакцію дають і інші речовини, наприклад фенольної природи, а також вільні ароматичні амінокислоти.

Визначення проводять таким чином: до 0,2 мл розчину досліджуваного білка додають 1 мл лужного розчину купруму (II) сульфату. Суміш ретельно перемішують, залишають за кімнатної температури на 10 хв, потім швидко вносять 0,08 мл реагенту Фоліна й знову перемішують. Через 30 хв розчин забарвлюється в синій колір. Інтенсивність забарвлення (оптичну густину) вимірюють на фотоколориметрі чи спектрофотометрі. Якщо в 1 мл досліджуваного розчину білка міститься 5 – 25 мг білка, то використовують довжину хвилі 750 нм, якщо концентрація білка більша, – 500 нм. Нерозчинні білки чи їх осад заздалегідь розчиняють у 0,1 моль/л розчині гідроксиду натрію за кімнатної температури.

Концентрацію білка в досліджуваному розчині визначають за калібрувальною кривою, побудованою заздалегідь за відомою концентрацією досліджуваного білка, а якщо це неможливо, то за стандартними розчинами інших чистих білків (кристалічного яєчного чи сироваткового альбуміну, казеїну тощо). Для побудови калібрувальної кривої готують розчини білка-стандарту (від 20 до 400 мг/мл), що використовують для проведення реакції Фоліна за таких же умов, у яких реагували досліджувані

розчини білка. Потім також вимірюють інтенсивність забарвлення (оптичну густину) всіх проб білка-стандарту.

2.3.3.4 *Визначення кількості білка за методом Лоурі в модифікації Святкіна*

Цей метод використовують для визначення вмісту білка в препаратах з підвищеним вмістом ліпо- і глікопротеїнів: 0,5 мл розчину досліджуваного препарату, що містить 0,50—2,5 мг білка, поміщають у пробірку, додають 0,8 мл розчину 1 моль/л натрію гідроксиду і 0,1 мл 1%-вого розчину натрію дезоксихолату, потім додають 4 мл реактиву 2, суміш перемішують. Після прояснення розчину приливають 0,5 мл реактиву Фоліна, негайно перемішують і залишають на 30 хв у темному місці при кімнатній температурі. Оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 750 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Розчином порівняння є суміш цих же реактивів без фармпрепарату. Калібрувальний графік будують у межах концентрації від 0,5 до 2,5 мг стандартного зразка білка, вимірюючи оптичну густину розчинів при довжині хвилі 750 нм.

2.3.3.5 *Визначення кількості білка за методом Флореса*

Метод ґрунтується на утворенні забарвленого в синій колір комплексу білка з барвником бромфеноловим синім: 5 мл досліджуваного препарату, що містить 0,01—0,08 мг білка, поміщають в пробірку, додають 0,3 мл розчину бромфенолового 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 розчинність 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 іонів 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

pH, 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. Осаджену 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, свинцю, 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

3.2.1 Розчинність білків

В одну пробірку вносять 1 мл нерозведеного яєчного білка, 10 мл дистильованої води, зміст перемішують. При цьому яєчний альбумін

розчиняється, а яечний глобулін випадає у вигляді невеликого осаду. У другу пробірку вносять 1 мл яечного 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 казеїну

У шістьох пронумерованих пробірках готують буферні суміші з різним значенням рН. Вміст пробірок збовтують і в кожену 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 кожену 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 3.1).

Таблиця 3.1 – 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		

3.2.2.2 Визначення ізоелектричної точки желатину

У 6 пробірок відповідно до таблиці 3.2 відміряють відповідний об'єм в мл розчинів оцтової кислоти, натрію ацетату, дистильованої води і желатину. Вміст кожної пробірки перемішують. Потім в кожену 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 3.2 – Співвідношення компонентів реакційної суміші (мл) для визначення рН при визначенні ізоелектричної точки желатину

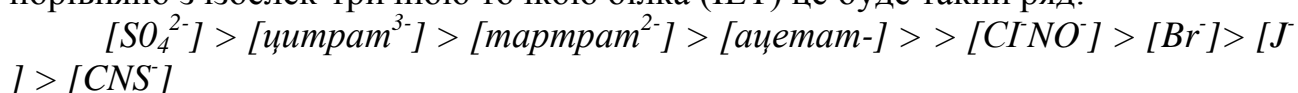
Вода	0,1 моль/л CH ₃ COOH	1 моль/л CH ₃ COOH	0,1 моль/л CH ₃ COONa	1% розчин желатина	рН
3,8	0,8	-	2,0	2,0	5,6
3,5	0,5	-	2,0	2,0	5,3
3,0	1,0	-	2,0	2,0	5,0
2,0	2,0	-	2,0	2,0	4,7
-	4,0	-	2,0	2,0	4,4
3,2	-	0,8	2,0	2,0	4,1

3.2.3 Висолювання білків

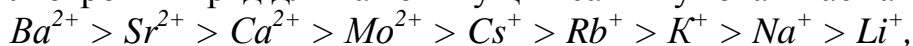
Водна оболонка утворює захисний шар для білкових частинок, не дозволяє їм збільшуватися й коагулювати. Важливим фактором стійкості білкових розчинів є однойменний електричний заряд частинок, що сприяє їх відштовхуванню.

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 Висолювання 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 висолювання	Ступінь насичення розчину амонію сульфатом	Фракція білків, що осаджується

3.2.3.1 Висолювання 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.

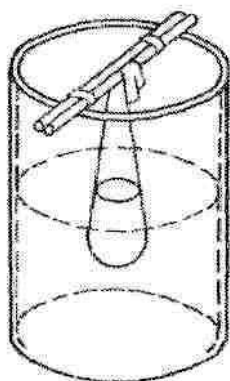


Рисунок 3.1 – Найпростіший діалізатор

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 кожен 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 «алкалоїдними» реактивами

При додаванні до розчину білка так званих «алкалоїдних» реактивів (таніну, пікринової кислоти, фосфатно-вольфраматної, фосфатно-молібдатної кислоти та інш.) білок випадає в осад. Реакція обумовлена наявністю у білку нітрогеновмісних гетероциклічних угруповань, аналогічних тим, які зустрічаються в алкалоїдів (індольні, імідазольні, пірольні та інші кільця). При цьому «алкалоїдні» реактиви являють собою аніони, а білки – катіони. Слабке підкиснення білкового розчину оцтовою кислотою приводить до появи позитивного заряду на частинці білка і полегшує взаємодію білка з негативно зарядженими йонами осаджувача. Білки, що мають лужний характер (протаміни, гістони), добре осаджуються алкалоїдними реактивами в нейтральному середовищі без підкиснення.

У три пробірки вносять по 1 мл 10 % розчину яєчного білка. У першу додають 2 – 3 краплі 10 % розчину пікринової кислоти і 0,5 мл 1 % оцтової кислоти. У другу пробірку додають 1 – 2 краплі насиченого розчину таніну і 0,5 мл 1% оцтової кислоти. У третю 2-3 краплі 1 % розчину калію гексаціано-(II)-феррату і 0,5 мл 1% оцтової кислоти. Спостерігають за випаданням осадів

денатурованого білка і дають пояснення. Додають надлишок реагентів, після додавання надлишку розчину калію гексаціано-(II)-феррату та розчину таніну осад розчиняється. Результати заносять у таблицю 3.5 і роблять висновок.

Таблиця 3.5 – Вплив алкалоїдних реактивів на осадження білка

«Алкалоїдні» реактиви	Ефект при додаванні білку	Надлишок реактиву
Суміш пікринової і оцтової кислот		
Суміш таніну і оцтової кислоти		
Суміш калій гексаціано-(II)-феррату і оцтової кислоти		

3.2.5.5 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 кожен 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 3.6 і роблять висновок.

Таблиця 3.6 – Вплив йонів важких металів на осадження білка

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

3.2.5.5 Денатурація білка при кип'ятінні. Вплив рН на осадження білків

При кип'ятінні нейтральних та слабкокислих розчинів білка останній денатурує та випадає в осад.

У 5 пронумерованих пробірок вносять по 1 мл 1% розчину яєчного білка. Першу пробірку нагрівають до кипіння, відзначають помутніння розчину (відбувається руйнування гідратної оболонки навколо молекули білка та збільшення білкових частинок, але міцели – частинки денатурованого білка несуть заряд і утримуються в завислому стані). Другу пробірку нагрівають до кипіння, додають 1 краплю 1%-вого розчину оцтової кислоти, для створення слабо кислої реакції. При стоянні випадає осад білка (частинки білка втрачають заряд, тому що рН середовища близька до ізоелектричного стану). У третю пробірку додають 1 краплю 10%-вого розчину оцтової кислоти, для створення кислої реакції середовища. При кип'ятінні рідини осад не утворюється. В дуже кислому середовищі частинки білка набувають позитивного заряду, тобто перезаряджаються і відштовхуються одна від одної. У четверту пробірку додають 1 краплю 10% розчину оцтової кислоти і 1 краплю насиченого розчину натрію хлориду. При кип'ятінні випадає осад — йони Na^+ та Cl^- утворюють подвійний електричний шар і нейтралізують позитивний заряд на частинках білка. У п'яту пробірку додають 1 краплю 10 % розчину натрію гідроксиду. При кип'ятінні зсідання білка не спостерігається, оскільки в лужному середовищі негативний заряд на частинках білка підвищується.

Результати осадження білків при кип'ятінні в різноманітних середовищах заносять у таблицю 3.7.

Таблиця 3.7 – Вплив реакції середовища на осадження білка при кип'ятінні

Нейтральне середовище	Слабкокислое середовище	Сильно кислое середовище	Сильно кислое середовище у присутності електроліту	Лужне середовище

3.2.6 Проведення гідролізу білка

А. У термостійку колбу на 100-150 мл наливають 20 мл 1 % розчину білка і 5 мл концентрованої хлоридної кислоти. Колбу із зворотним холодильником кип'ятять на плитці протягом 45 хвилин (з моменту закипання) під тягою.

Відкриття проміжних продуктів розпаду білка.

1. *Біуретова реакція з вихідним розчином білка.*

До 0,5 мл розчину білка додають 1 мл 30 % розчин NaOH і 1 мл 5 % розчин CuSO_4 .

2. *Біуретова реакція гідролізату через 15, 30, 45 хвилин*

Відберіть пробу гідролізу через 15 хвилин. До 0,5 мл гідролізату додайте 1 мл 30 % розчину NaOH і 1 мл 5 % розчину CuSO₄. Теж саме виконайте з пробою через 30 і 45 хвилин. Негативна біуретова реакція вказує на повне розщеплення білка до амінокислот. Дані занесіть до таблиці 3.8.

Таблиця 3.8 – Результати гідролізу білка

Час гідролізу, хвилин	0	15	30	45
Забарвлення				
Продукти реакції				

Б. У невелику колбу із зворотним холодильником, наливають 2-3 мл 2 % розчину альбуміну і 15-20 мл 25 % розчину сульфатної кислоти. Колбу кип'ячать під тягою протягом 60-90 хвилин. Через щопівгодини (з моменту закипання) з гідролізатом проводять біуретову реакцію, для цього до 0,5 мл гідролізата додають 30 % розчин лугу до нейтральної реакції по універсальному індикаторному папері і 1-2 краплі 1 % розчину CuSO₄. Негативна біуретова реакція вказує на повне розщеплення білка до амінокислот.

Для порівняння біуретову реакцію проводять з 2 % розчином альбуміну. Дані занесіть до таблиці.

3.2.7 Визначення карбоксильних і аміногруп у розчині білка та гідролізаті

Гідроліз припиняють. Холодильник відкладають, а у колбу додають (на кінчику шпателя) активоване вугілля для знебарвлення бурого розчину і кип'ячать 5 хвилин. Потім гідролізат охолоджують, переливають у мірний циліндр, і об'єм доводять до 25 мл дистильованою водою і фільтрують.

Титрування карбоксильних груп.

Суть методу полягає у блокуванні аміногруп формальдегідом, а вільні карбоксильні групи відтитрують лугом.

1. Титрування карбоксильних груп у розчині білка.

Відміряють у конічну колбу 1 мл розчину білка, додають 5 крапель 20 % нейтрального розчину фенолфталеїну. Титрують до стійкого рожевого кольору 0,005 н розчином NaOH. Кількість витраченого NaOH на титрування заносять до таблиці.

2. Титрування карбоксильних груп у гідролізаті білка.

Для титрування відбирають 1,25 мл гідролізату (знебарвленого), що відповідає 1 мл розчину білка, додають 3 краплини розчину фенолфталеїну і нейтралізують 10 % розчином NaOH до рожевого забарвлення (кількість лугу не враховують). Якщо забарвлення стане яскраво червоне, використовують 1 % розчин хлоридної кислоти і 0,005 н NaOH для одержання слабо рожевого забарвлення. Після чого додають 5 крапель нейтрального розчину формаліну і титрують 0,005 н NaOH до стійкого рожевого забарвлення. Кількість NaOH, витраченого на титрування, заносять у таблицю 3.9.

Таблиця 3.9 – Хід титрування

Розчини	Кількість NaOH	Кількість вільних карбоксильних груп
Розчин білка		
Гідролізат білка		

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.
Використовуючи метод висолювання амонію сульфатом, визначити, які білки містяться в кожній пробірці.
12. Значення реакції осадження білків у харчовій промисловості.
13. Чи відбувається гідроліз білків у живій клітині? Відповідь обґрунтуйте.
14. Які умови хімічного гідролізу білка?
15. 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 компонента 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 сухожилів і т.д. Значення їх різноманітне і визначається функцією органу і тканини.

До глікопротеїнів відносяться деякі гормони передньої частини гіпофіза – тиреотропін і фолікулолестимулюючий, 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.).

Нуклеопротейни – комплекс нуклеїнових кислот з білками. Нуклеопротейни поділяють на дезоксирибонуклеопротейни (ДНП) та рибонуклеопротейни (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 нуклеопротейни 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 забарвленні нуклеїнових кислот, наприклад у мазках клітин крові.

4.3 Експериментальна частина

4.3.1 Виділення муцину із слини і відкриття в ньому вуглеводного компонента

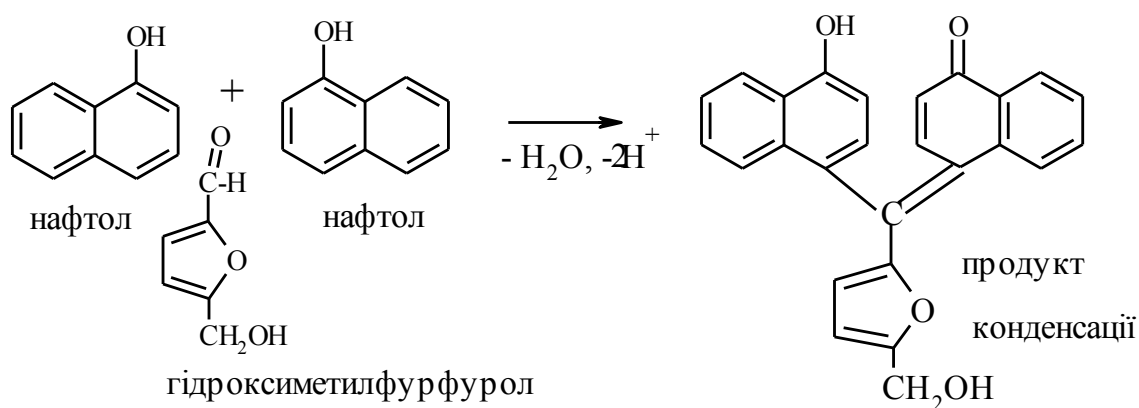
Муцини – глікопротеїди, слизові виділення епітеліальних покривів слизових оболонок харчового каналу, дихальних і сечостатевого шляхів, слинних залоз. Виконують захисну функцію, оберігаючи оболонки від механічних і хімічних пошкоджень. Стійкі до гідролізу.

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 % CuSO₄. 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 Реакція на глікопротеїди курячого яйця

Представником глікопротеїдів є овомукоїд – білок курячого яйця. При гідролізі вуглеводного компонента білка (складає 25 %) утворюється маноза, галактоза, N-ацетилглюкозамін. Наявність вуглеводів в складі овомукоїду можна виявити нагріваючи шматок вареного яєчного білка з концентрованою

хлоридною кислотою. Іншим методом виявлення вуглеводного компонента глікопротеїдів є реакція Подобєдова. Фурфурол, який утворений продуктом взаємодії концентрованої сульфатної кислоти з вуглеводом білка, в реакції з α -нафтолом утворює сполуку синього кольору, а з тимолом – червоного.

4.3.2.1 У пробірку із шматочком вареного курячого білка додають 3 мл концентрованої HCl і обережно нагрівають у полум'ї пальника, не доводячи до кипіння. Білок а потім і рідина при обережному нагріванні набувають фіолетового забарвлення.

4.3.2.2 Реакція Подобєдова: у дві пробірку внести по 1 мл 1 % розчину яєчного білка, додати у першу 1 мл 1 % спиртового розчину α -нафтолу, у другу стільки ж 1% розчину тимолу. Вміст пробірок ретельно перемішати. Після цього обережно, по стінці пробірки, додати 0,5 мл концентрованої сульфатної кислоти й залишити на деякий час. На межі розподілу у пробірці з α -нафтолом утворюється червоно-фіолетове кільце, а в пробірці з тимолом – червоне кільце.

4.3.2 Виділення, якісні реакції нуклеопроетидів

4.3.2.1 Одержання дезоксирибонуклеопроетидів (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 дезоксирибонуклеопроетидів

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 рибонуклеопроетидів (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 рибонуклеопроетидів

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. Нуклеопротеїди вступають у специфічні кольорові реакції з рядом речовин; це дає змогу визначити їх складові компоненти.

4.3.3.1 Відкриття білків у складі нуклеопротеїнів

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 нуклеопротеїдів.

4.3.3.2 Відкриття пентоз у складі нуклеопротеїдів

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

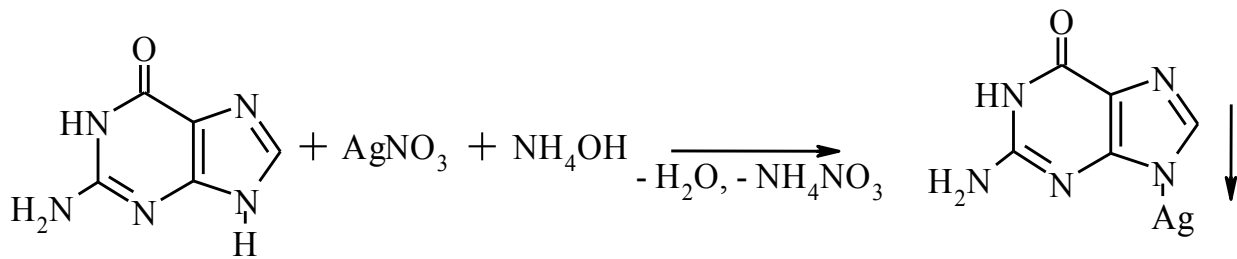
Нуклеопротеїди, що містять рибозу дають з орциновим реактивом синьо-зелене забарвлення. До 1 мл лужного розчину РНП додають рівний об'єм орцинового реактиву, перемішують і кип'ятять на водяній бані впродовж 20 хв. Суміш охолоджують та розводять водою до загального об'єму 4 мл. Відзначають появу забарвлення.

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 дезоксирибонуклеопротеїди 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 аргентуму нітрату утворюють пухкий світло-коричневий осад:



гуанін (енольна форма)

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 осади сполук аргентуму та пуринових основ.

4.3.3.3 Відкриття ортофосфатної кислоти

Ортофосфатну кислоту визначають за реакцією з амонієм молібдатом.

А. У дві пробірки вносять по 1 мл гідролізату ДНП та РНП, додають 1 мл розчину амонію молібдату, перемішують зміст струшуванням і наливають 10 крапель 1 % розчину аскорбінової кислоти. Пробу знову перемішують і залишають стояти до розвитку синього забарвлення.

Б. У дві пробірки вносять по 1 мл гідролізату ДНП та РНП, додають 1 мл розчину амонію молібдату та кип'ятять. 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 Складні білки. Дослідження білків молока

5.1 Мета: провести осадження білків молока та кількісне визначення казеїну формольним титруванням, встановити склад фосфопротеїдів

5.2 Короткі теоретичні відомості

Молоко - полідисперсна система. Молоко і продукти його переробки є цінною сировиною і напівфабрикатами. Їхня висока біологічна цінність обумовлена оптимальним вмістом і майже ідеальним співвідношенням білків, ліпідів, вуглеводів, мінеральних солей і вітамінів. Завдяки складу і збалансованості амінокислот ці речовини засвоюються організмом людини майже повністю.

Ступінь чистої утилізації молочного білка в організмі людини становить 75%). Білки коров'ячого молока багаті на лізин і треонін, лімітуючими амінокислотами є метіонін і цистеїн.

Завдяки колоїдному стану білки молока легкодоступні для дії травних ферментів. Харчова цінність білків збільшується завдяки тому, що вони утворюють комплекси з вітамінами, особливо групи В, і мінеральними речовинами.

Харчова цінність молока і вихід таких молочних продуктів, як кисломолочний сир, сири сичужні залежить від вмісту білка. Білки молока є найціннішими в харчовому відношенні. Вміст білків у молоці коливається в межах 2,8-4,0%.

Молоко містить більше ніж 20 білків. Їх поділяють на дві групи: *казеїни* (складні білки) і *сироваткові* (прості білки). Вони відрізняються один від одного за молекулярною масою, ізоелектричною точкою, співвідношенням амінокислот, особливостями складу і структури.

Вміст казеїну в молоці становить 73-85% усіх білків. Казеїн має вигляд колоїдних частин або міцел (ниток), що складаються з більш дрібних частин (субміцел). Казеїн чутливий до дії іонів кальцію. За їх наявності випадає в осад. Казеїн є фосфопротеїном, оскільки містить у своєму складі фосфорну кислоту. Він приєднує до себе кальцій, магній, натрій, мінеральні речовини. У складі казеїну є чотири фракції, що відрізняються за вмістом амінокислот, фосфорної кислоти, за чутливістю до дії іонів кальцію та сичужового ферменту. Казеїн у молоці міститься у вигляді кальцій-фосфат-казеїнового комплексу. Він складається з казеїнату кальцію, колоїдного фосфату кальцію, лимонної кислоти, магнію, калію і натрію.

Після осадження казеїну в ізоелектричній точці виявляються сироваткові білки. До їх складу входять β -лактаглобулін, α -лактоальбумін, альбумін сироватки крові, імуноглобуліни і протеозопептидна фракція.

Здатність казеїну легко коагулювати під дією кислоти, сичужного ферменту (пепсину) та наростання іонів кальцію широко використовується у виробництві кисломолочних продуктів, сичужних сирів та бринзи. Іншу значну

частину білків складають сироваткові білки (15-20% всіх білків). Відділяють сироваткові білки внаслідок кип'ятіння прозорих фільтратів, отриманих після осадження казеїну. Дані білки містять багато незамінних амінокислот (метіоніну, цистеїну, треоніну), що має важливе значення при їх використанні в подальшому для харчових цілей. У багатьох країнах світу вже давно введені розцінки за молоко з врахуванням вмісту білка. Найближчим часом це планується робити і в Україні.

У нейтральному середовищі білки молока не коагулюють при кип'ятінні, хоча й денатурують. Осадження казеїнів відбувається під впливом молочної кислоти, що утворюється під дією мікроорганізмів у процесі скисання молока.

5.3 Експериментальна частина

5.3.1 Осадження казеїну молока йонами кальцію

При коагуляції білків молока кальцій хлоридом в осад переходять усі їх фракції. Такий метод використовують тоді, коли готують прісний сир з молока для дітей на молочних кухнях, а також білок молочний харчовий з пахти (відходи, що залишаються при виготовленні масла). Ці продукти в 4 – 5 разів багатші на Кальцій та Фосфор, ніж кисломолочний сир.

У пробірку наливають близько 2 мл молока і доводять його до кипіння, потім додають 5-6 крапель 10% розчину кальцій хлориду, спостерігають появу осаду.

5.3.2 Осадження білків молока ацетоном та етанолом

Ацетон у нерозчиненому вигляді, спричиняючи дегідратацію білків, осаджує їх із розчину. Наполовину розбавлений ацетон не викликає коагуляції білків молока. У разі накопичення в молоці кислот стійкість білків знижується, і додавання 50% розчину ацетону викликає їх коагуляцію. Це відбувається при такій кількості кислот у молоці, яка ще не відчувається на смак. Проба з ацетоном використовується для визначення свіжості молока, що особливо важливо для підприємств харчування, які обслуговують дітей, а також для дієтичних їдалень.

У дві пробірки наливають по 1 мл молока. В одну з них додають таку саму кількість лимоннокислого буфера, рН якого дорівнює 5,0, доводячи рН суміші до 5,0 (контролюють за допомогою індикаторного папірця). Струшуючи цю пробірку, переконуються у відсутності на стінках коагулянту (крихти на стінках пробірки). Потім в обидві пробірки доливають по 1 мл 50% розчину ацетону, енергійно струшують, спостерігають появу згустків на стінках пробірки.

Алкогольна проба: пробірку наливають 3-5 мл молока і таку ж кількість 68-70%-го спирту. Нахиливши пробірку, спостерігають за змінами, що відбуваються. Свіже молоко злегка розріджується, тому що в слабокислому молоці (близько 22° Тернера) з'являються окремі зернятка, а в сильнокислому (більш 27° Тернера) - утвориться багато зернят.

Примітка. Градусом Тернера називають кількість мілілітрів 0,1 н розчину лугу, необхідного для нейтралізації 100 мл молока.

5.3.3 Визначення наявності гідроген пероксиду в молоці

У пробірку наливають 2 мл молока, не перемішують; додають 1 мл розчину сульфатної кислоти (розчин 1:3) та 0,2 мл крохмального розчину (3 г KI та 3 г крохмалу у 100 мл води). Через 10 хвилин спостерігають за зміною забарвлення розчину в пробірці, не струшуючи її. Поява в пробірці окремих плям синього кольору свідчить про наявність гідроген пероксиду в молоці.

5.3.4 Реакція на наявність формальдегіду в молоці

До 1 мл розчину (100 мл H_2SO_4 ($\rho = 1,82 \text{ г/см}^3$) і одна крапля HNO_3 ($\rho = 1,30 \text{ г/см}^3$)) обережно по стінці доливають таку саму кількість молока. При додаванні молока пробірку слід нахилити так, щоб рідина не змішувалася, а один шар накладався на інший. За наявності формальдегіду через одну - дві хвилини з'являється фіолетове або темно-синє кільце.

5.3.6 Визначення загальної кількості білка в молоці формольним титруванням

У конічну колбу відмірюють циліндром 10 мл молока, додають 5 крапель розчину фенолфталеїну і з бюретки обережно титрують 0,1 н розчином натрій гідроксиду, увесь час перемішуючи рідину до появи незникаючого протягом хвилини слабкорожевого забарвлення. Потім у рідину додають 2 мл попередньо нейтралізованого розчину формаліну і, коли рідина почне знебарвлюватися, знову продовжують обережно титрувати з тієї самої бюретки до появи слабкорожевого забарвлення, яке не зникає протягом однієї хвилини. Рівень лугу в бюретці записують і за різницею з першим титруванням визначають кількість лугу, який пішов на друге титрування. Отриману цифру помножують на 1,47 і знаходять вміст казеїну в молоці у відсотках, а після множення на 1,94 визначають загальну кількість білка в молоці.

5.3.7 Визначення вмісту казеїногену в молоці

Визначення вмісту казеїногену в молоці полягає в тому, що казеїноген має кислу реакцію й тому різниця між об'ємом розчину, необхідним для нейтралізації зібраного молока, та об'ємом, витраченим на нейтралізацію сироватки після осадження казеїногену, – це об'єм лугу, потрібний для нейтралізації казеїногену. Знаючи еквівалентну масу казеїногену, можна визначити його кількість у молоці.

Готують дві колби (*A* і *B*) об'ємом 200 мл. У колбу *A* наливають 40 мл води і 20 мл сепарованого молока, в колбу *B* – 20 мл води та 10 мл сепарованого молока. Потім у колбу *A* по краплях, перемішуючи, вносять 0,02 моль/л розчин сірчаної кислоти доти, доки казеїноген випаде в осад. Фіксують кількість витраченого на титрування розчину сірчаної кислоти. В колбу *B* також повільно доливають розчин сірчаної кислоти, об'єм якої дорівнює половині об'єму, який додали в колбу *A*.

Розчин у колбі *A* доливають дистильованою водою до об'єму 100 мл і фільтрують в колбу *A*. Фільтрат (50 мл), який є сироваткою молока, з колби *A* переносять у колбу *A*₂. У колби *A*₂ і *B* додають по 1 мл розчину фенолфталеїну та титрують 0,1 моль/л розчином калій гідроксиду до появи блідо-рожевого

забарвлення. Масову концентрацію казеїногену в молоці, мг/мл, розраховують за формулою:

$$C = (A-B)fQIV,$$

де A і B – об'єми, мл, розчину гідроксиду калію, витрачені на титрування зібраного молока та сироватки; f – коефіцієнт поправки на титр 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію (0,98); Q – маса казеїногену, еквівалентна 1 мл 0,1 моль/л розчину гідроксиду калію (11,315 мг); V – об'єм молока, витраченого для аналізу (10 мл).

5.3.8 Вивчення складу фосфопротеїнів молока

Фосфопротеїди – це складні білки, простетичною групою яких є фосфорна кислота, що зв'язана складнофірними зв'язками з залишками серину та треоніну. Один і фосфопротеїдів – це казеїноген, який міститься в молоці у вигляді розчинної кальцієвої солі.

Під час ферментативного згортання молока (дія пепсину) казеїноген зазнає хімічного перетворення, продуктом якого є казеїн. Кальцієва сіль казеїну, на відміну від кальцієвої солі казеїногену, нерозчинна у воді.

Ізоелектрична точка казеїногену відповідає рН 4,7. У підкисленому розчині (рН 4,7) кальцієва сіль казеїногену розщеплюється на білок і фосфатну кислоту, які можна визначати за характерними реакціями: білок – за допомогою біуретової реакції, фосфатну кислоту – за реакцією з молібденовим реактивом.

5.3.8.1 Осадження казеїну із молока

До 30 мл сепарованого молока, розведеного в чотири рази, обережно перемішуючи, по краплях додають 0,1 % розчин оцтової кислоти до припинення осадження казеїну, який відфільтровують, промивають водою, вносять у 0,1 % розчин карбонату натрію, щоб очистити від жиру та інших речовин.

Казеїн у розчині карбонату натрію розчиняється, а жир знаходиться в емульгованому стані.

Суміш фільтрують через вологий фільтр (жир залишається на фільтрі).

Із фільтрату розчином оцтової кислоти знову осаджують казеїн. Осад відфільтровують, віджимають між листками фільтрувального паперу (бажано насухо) й розтирають у ступці з 15 – 20 мл 96 %-го розчину спирту з метою зневоднення. Для знежирення казеїну змішують спочатку з 20 мл ефіру, а потім із 20 мл суміші метилового спирту та хлороформу (1 : 1). Знежирений казеїн висушують на повітрі й розтирають у порошок, який використовують для гідролізу казеїну.

5.3.8.2 Гідроліз казеїну

У пробірку вносять 50 мг подрібненого на порошок казеїну, доливають 3 мл розчину 20 % гідроксиду натрію та гідролізують із зворотним холодильником протягом 1 год. Суміш охолоджують і використовують гідролізат для реакцій на продукти гідролізу.

5.3.8.4 Знаходження білка в гідролізаті казеїну

В пробірку додають 0,5 мл гідролізату, п'ять крапель розчину 10 % гідроксиду натрію й одну краплю купруму (II) сульфату (проводять біуретову

реакцію). Спостерігають появу червоно-фіолетового забарвлення, яке свідчить про наявність білка в гідролізаті казеїну.

5.3.8.5 Відкриття фосфатної кислоти у гідролізаті казеїну

До гідролізату (1–2 мл) додають 12–15 крапель розчину 10 % нітратної кислоти до слабкокислої реакції на лакмус. Після цього суміш фільтрують у суху пробірку, до 0,5 мл фільтрату додають 2 мл молібденового реактиву й кип'ячать на водяній бані 2–3 хв. Спостерігають утворення жовтого забарвлення, а під час охолодження суміші – осаду жовтого кольору амонійної солі фосфорномолібденової кислоти.

3.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання).

1. Які білки входять до складу молока ?
2. Яка ізоелектрична точка казеїну ?
3. Які є методики осадження білків молока ?
4. На якому принципі базується методика кількісного визначення білків молока?

Лабораторна робота № 6

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

6.1 Мета: оволодіти методикою визначення властивостей та функцій ферментів

6.2 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**. Алостеричний центр являє собою ділянку, яка в молекулі ферменту просторово віддалена від активного центру (з грецьк. *allos* – інший, чужий). До алостеричного центру можуть приєднуватися різні хімічні речовини, що отримали назву алостеричних 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 алостеричного 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 – під підклас, 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.

6.3 Експериментальна частина

6.3.1 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 % -вого 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 °С 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.

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

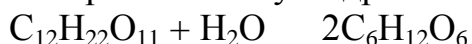
Метод ґрунтується на порівнянні швидкості гідролізу крохмалю в присутності ферменту та небіологічного каталізатора хлоридної кислоти.

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°С, 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.

6.3.3 Дія сахарози

Сахараза 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'яють протягом 3 хв для руйнування сахарози, після чого в обидві пробірки додають (охо! лоджені) по 3 мл розчину сахарози, добре перемішують і ставлять і у термостат за температури 38 °С. 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 (дослід) утворюється червоний осад геміоксиду міді.

6.3.3 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.

6.3.3.1 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.

6.3.3.2 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'ячать 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 уреазу 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 уреазу. Розчин у першій пробірці кип'ячать 5 хв. Потім у всі пробірки додають по 1 мл 5 % розчину сечовини й по п'ять крапель 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.

6.3.3.3 Залежність швидкості ферментативних реакцій від рН середовища

Швидкість ферментативних реакцій залежить від концентрації йонів гідрогену в середовищі. Концентрація H^+ -іонів, при якій спостерігається максимальна швидкість реакції, називається оптимальною. Вплив рН на активність ферментів пояснюється тим, що білкова молекула ферменту є амфотерним поліелектролітом, і його каталітична активність залежить від ступеня йонізації функціональних груп, які входять до активного центру ферменту.

У п'ять пробірок вносять по 1 мл розчинів фосфатно-цитратного буферу з такими значеннями рН: 5,6; 6,4; 6,8; 7,2; 8,0. В усі пробірки додають по 5

крапель розведеної в 10 раз слини і по 10 крапель 0,5 % розчину крохмалю, перемішують і ставлять пробірки на водяну баню при 38 °С. Через 1–2 хв на предметне скло із пробірки № 3 (величина рН в якій припустимо оптимальна) наносять кілька крапель суміші і проводять реакцію з йодом. Якщо з'явилося червоне або жовте забарвлення, усі пробірки виймають з бані і додають у кожну по 1 краплі розчину йоду. Спостерігають за утворенням забарвлення в усіх пробірках і відзначають те значення рН, при якому пройшов найбільш повний гідроліз крохмалю.

6.3.4 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.

6.3.5 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 % -вого розчину гідрогену пероксиду і порівнюють інтенсивність виділення бульбашок газу і роблять висновки.

6.4 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. Що таке метаболіт та антиметаболіт?
12. Механізм дії інгібіторів.
13. Активатори та інгібітори

Лабораторна робота № 7 **Специфічність дії ферментів**

7.1 Мета: оволодіти методикою визначення властивостей та функцій ферментів

7.2 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 *відносною, 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,

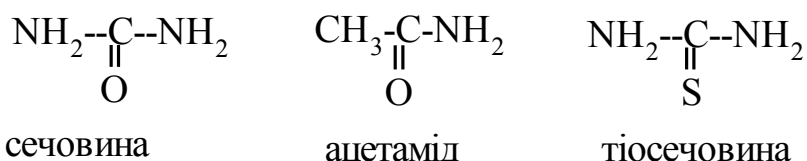
α -амілаза і сахараза проявляють специфічність не до структури субстрату в цілому, а до типу глікозидних зв'язків, що мають місце у відповідних вуглеводах.

7.3 Експериментальна частина

7.3.1 Вивчення специфічності ферменту

7.3.1.1 Визначення абсолютної субстратної специфічності уреазі (карбамідгідролази).

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



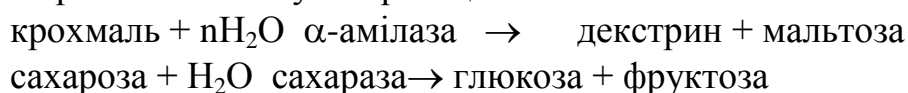
Метод ґрунтується на визначенні амоніаку, що утворюється в результаті дії уреазі соєвого борошна на сечовину:

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.

7.3.3.2 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:



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 7.1:

Таблицю 7.1 – Специфічність дії амілази і сахарози

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>			

7.4 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 № 8 Кількісне визначення активності ферментів

8.1 Мета: оволодіти методикою визначення активності ферментів

8.2 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 флуоресціює 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_0 , (E/мг), де E – концентрація ферменту; C_0 – 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.

8.3 Експериментальна частина

8.3.1 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 А (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 впершу 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 8.1.

Таблиця 8.1 – 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;

$$\frac{2 \cdot 1}{1/160}$$

тоді $X = \frac{2 \cdot 1}{1/160} = 320$ 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.).

Контрольні питання.

1. Види активності ферментів. В яких одиницях її виражають?
2. Чим характеризується активність ферментів?

Лабораторна робота № 9

Обмін речовин та енергії. Біологічне окиснення. Тканинне дихання.

Окислювальне фосфорилування. Окисно-відновні ферменти

9.1 Мета: оволодіти методикою дослідження окисно-відновних ферментів

9.2 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 про-

цесі 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).

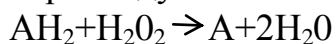
Клас оксидоредуктаз містить ферменти, що беруть участь в окисненні та відновленні різних речовин. Окиснення може здійснюватися кількома шляхами:

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:

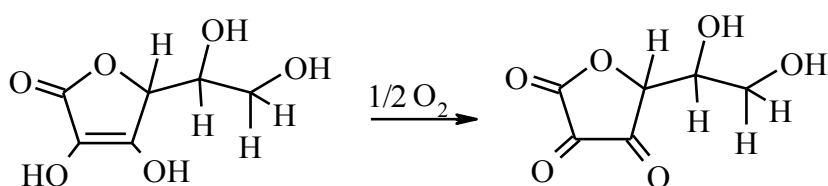


У харчовій промисловості для перевірки ефективності високотемпературної пастеризації молока використовують пероксидазну пробу. Фермент пероксидаза, який міститься в молоці інактивується при температурі пастеризації не нижче 80°C з витримкою 20-30 с. У лабораторіях широко використовують метод визначення активності пероксидази, в основу якого покладене окиснення пірогалолу за наявності Н₂О₂ 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).

Аскорбатоксидаза (ЕС 1.10.3.3.) є ферментом, що містить Купрум. Фермент був відкритий Сент-Дьордьї у 1930 р. у листі капусти. Під впливом

ферменту L-аскорбінова кислота легко окиснюється киснем повітря у L-дегідроаскорбінову кислоту:



Ферментативне окиснення аскорбінової кислоти може здійснюватися прямим шляхом за участі специфічної аскорбатоксидази, а також опосередковано, за участі хінонів та інших окиснених продуктів, які утворюються в результаті діяльності різних оксидаз. Хінони при цьому відновлюються, а аскорбінова кислота, окиснюючись, перетворюється в дегідроформу, яка виконує роль акцептора Гідрогену, що підводиться до неї дегідрогеназами.

Аскорбатоксидаза міститься в рослинах і не виявлена в тваринних організмах. У різних рослинах різна кількість ізоформ аскорбатоксидази. Фермент знайдено в багатьох рослинах — гарбузах, кабачках, огірках, салаті, петрушці, капусті, шпинаті та ін.

Найбільш очищені препарати були отримані з кабачка. Відносна молекулярна маса ферменту - 140000-170000, вміст Купруму-0,34%.

Концентровані водні розчини ферменту мають блакитне забарвлення. Після видалення Купруму фермент знебарвлюється і втрачає активність. До складу молекули входять 18 різних амінокислот і гексози. Вважають, що поліпептидний ланцюг аскорбатоксидази має дві або більше функціональні групи, відповідальні за закріплення Купруму. У зв'язку з цим на каталітичну активність різко впливає вміст Купруму і зміна конформації молекули.

Аскорбатоксидаза за участі кисню повільно інактивується високими концентраціями пероксиду водня. Запропоновано гіпотетичну схему, яка передбачає утворення H_2O_2 в ході каталізу:

1. Аскорбінат + $O_2 \rightarrow$ Дегідроаскорбінат + H_2O_2 (окиснювальна реакція).
2. Аскорбінат + $H_2O_2 \rightarrow$ Дегідроаскорбінат + H_2O (пероксидазна реакція).
3. $H_2O_2 \rightarrow 1/2 O_2 + H_2O$.
4. Дегідроаскорбінат + $H_2O_2 \rightarrow$ Продукти розкладу + $CO_2 + H_2O$.

Таким чином, система аскорбатоксидази може бути пов'язана з пероксидазною. Дія ферменту може поєднуватись з рядом інших реакцій: відновлення цитохромів, з окисно-відновними перетвореннями глутатіону і підключенням через цю систему до циклу ди- і трикарбонових кислот.

Внутрішньоклітинна локалізація аскорбатоксидази і її функціональна активність не мають однозначного вирішення. Аскорбатоксидаза знайдена в розчинній фракції і в міжклітинних стінках, а також в мітохондріях. Вважають, що фермент, локалізований у клітинних стінках, не може відігравати будь-якої ролі в диханні, тоді як розчинний, імовірно, зв'язаний з транспортом електронів. Переносячи Гідроген, аскорбатоксидаза здатна віддавати його на

Оксиген і таким чином може виконувати функцію термінальної оксидази. Крім того, вона зв'язана з усією системою дихальних ферментів, які можуть окиснювати аскорбінову кислоту за допомогою хінонів, відщеплюючи від неї Гідроген.

Встановлено зв'язок між системою аскорбатоксидази і деякими дегідрогеназами. Це свідчить про те, що система «аскорбінат - аскорбатоксидаза» може бути біологічним переносником Гідрогену в дихальному ланцюзі, унаслідок чого аскорбінова кислота пов'язана з усією системою ферментів, які беруть участь у диханні рослини.

Молоді рослинні організми, ембріональні тканини багаті відновленим глутатіоном, який захищений від окиснення. Таку захисну роль відносно системи сполук RSH може відігравати у процесі дихання цитохромна система. В молодих органах рослин цитохромна система відіграє значно більшу роль, ніж у тих органах, що закінчили ріст. Тому природно припустити, що зменшення ролі цитохромної системи в диханні під час старіння рослини призводить до посиленого використання системи «глутатіон - аскорбінова кислота».

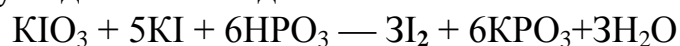
Перебудова дихальних шляхів рослин відбувається також у разі їх захворювання. У цьому випадку дихання переважно здійснюється не за циклом Кребса, а шляхом аеробного бродіння, оскільки кінцеві продукти бродіння (спирт, молочна кислота) можуть бути окиснені системою «аскорбінова кислота – аскорбатоксидаза».

Найвищу активність аскорбатоксидаза має: при рН 6,0. Фермент інактивується ціанідами, H_2S , CO .

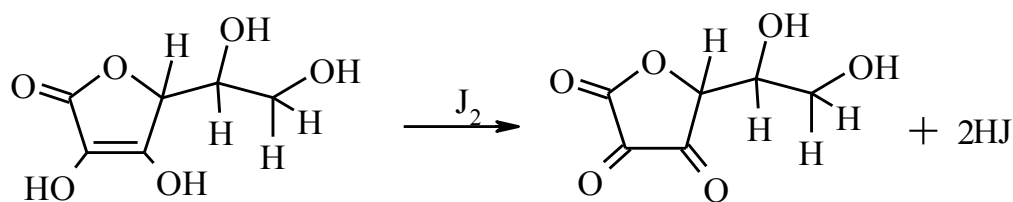
9.3 Експериментальна частина

9.3.1 Визначення активності аскорбатоксидази в рослинах

Свіжий рослинний матеріал гомогенізують. До частини гомогенату додають фосфатний буфер з рН 6,4, аскорбінову кислоту і інкубують при $20^{\circ}C$ протягом 10 хвилин, рівномірно струшуючи. При цьому аскорбінова кислота окиснюється під дією ферменту, що міститься в гомогенаті. Через 10 хвилин припиняють реакцію, додаючи розчин HPO_3 і надлишок аскорбінової кислоти титрують калій йодатом за участі калій йодиду і крохмалю до появи синього забарвлення. Калій йодат у кислому середовищі реагує з калій йодидом, при цьому виділяється йод:



Йод, що виділився, вступає в реакцію з аскорбіновою кислотою, окиснюючи її в дегідроаскорбінову кислоту:



Визначивши залишок аскорбінової кислоти і знаючи масу аскорбінової кислоти, внесеної в інкубаційну суміш, за різницею знаходять масу аскорбінової кислоти, яка характеризує активність аскорбатоксидази.

Хід роботи: рослинний матеріал (листя, бульби та, ін.) масою 2-4 г розтирають у ступці з дистильованою водою, суспензію переносять у мірну колбу на 100 мл, доводять водою до риски і ретельно перемішують. Не даючи осаду осісти, відбирають 20 мл в конічну колбу на 250 мл для визначення активності аскорбатоксидази. Туди ж додають 1 мл фосфатного буферного розчину з рН 6,4, 5 мл розчину аскорбінової кислоти ($C(1/2) = 0,04$ моль/л) і протягом 10 хвилин струшують колбу. Після цього реакцію припиняють додаванням 5 мл 5% розчину метафосфатної чи ортофосфатної кислоти, додають 1 мл 0,5% розчину калій йодиду. Залишок аскорбінової кислоти, що не вступив у ферментативну реакцію, титрують розчином калій йодату ($C(1/5) = 0,01$ моль/л) за участі розчину крохмалю до появи синього забарвлення.

Паралельно проводять контрольне титрування досліджуваного розчину. Для цього відбирають 20 мл досліджуваної суспензії (після попереднього збовтування) у конічну колбу, додають 5 мл 5% розчину мета- чи ортофосфатної кислоти і перемішують. Потім додають 5 мл розчину аскорбінової кислоти ($C(1/2) = 0,04$ моль/л), 1 мл 0,5% розчину КІ і титрують розчином KIO_3 ($C(1/5) = 0,01$ моль/л) за участі крохмалю до появи синього забарвлення.

Активність аскорбатоксидази розраховують за формулою:

$$A = \frac{V_1 \cdot (a - b) \cdot T}{V_2 \cdot t \cdot n \cdot m}$$

де A - активність аскорбатоксидази (у мкмоль аскорбінової кислоти, окисненої за 1 хвилину при 20°C ферментом з 1 г досліджуваного матеріалу);

V_1 - загальний об'єм суспензії досліджуваної тканини, мл;

a - об'єм розчину KIO_3 ($C(1/5) = 0,01$ моль/л), витрачений на титрування контрольної проби, мл;

b - об'єм розчину KIO_3 ($C(1/5) = 0,01$ моль/л), витрачений на титрування досліджуваної проби, см³;

V_2 - об'єм суспензії, взятий для визначення активності аскорбатоксидази, мл; i - час дії ферменту, хвилин;

n - маса досліджуваного матеріалу, г;

T - титр розчину KIO_3 ($C(1/5) = 0,01$ моль/л) за аскорбіновою кислотою, мг/мл (1,096 мг/мл);

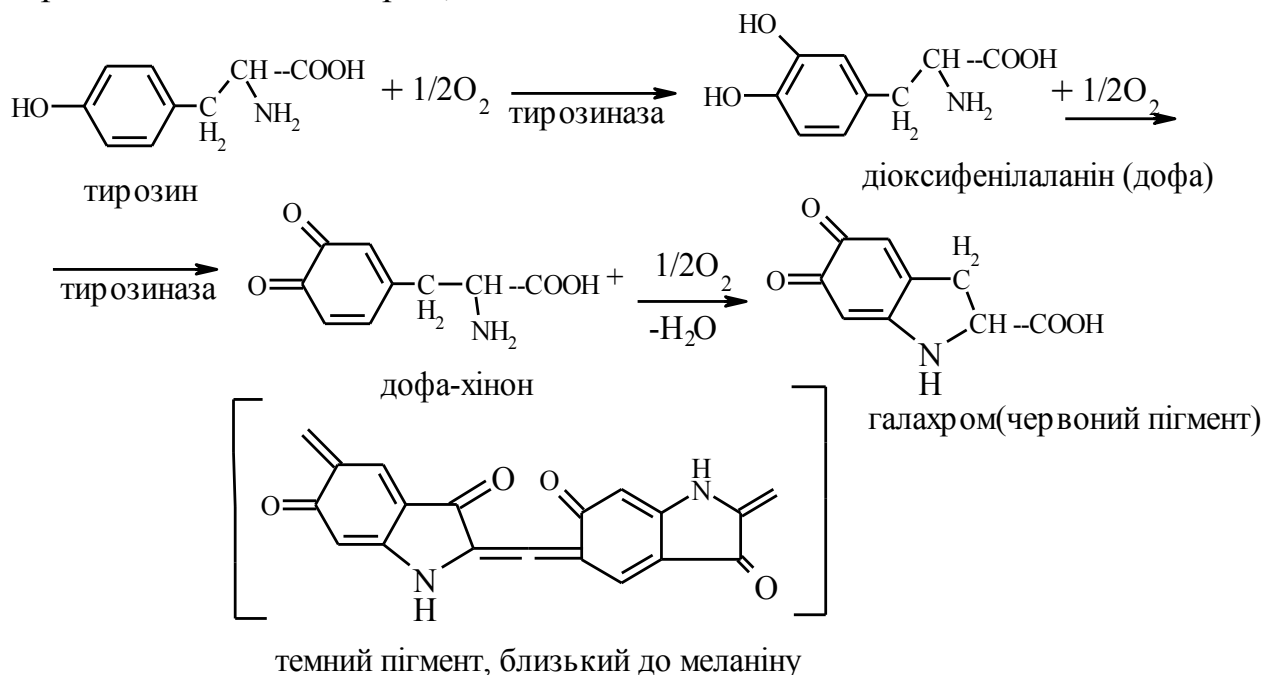
m - мікромоль аскорбінової кислоти (0,176 мг/моль).

9.3.2 Отримання тирозинази і окиснення тирозину в присутності кисню повітря

Тирозиназа бере участь в окисненні амінокислоти тирозину до темного пігменту меланіну (від грец. *melanos* -чорний).

Отримання тирозинази з картоплі: 10 г картоплі розтирають у ступці з 30 мл води і проціджують крізь подвійний шар марлі.

У дві пробірки наливають по 1 мл витяжки з картоплі, що містить фермент тирозиназу. Вміст однієї пробірки кип'ятять 3 хв і охолоджують у склянці з холодною водою. В обидві пробірки додають по 0,5 мл насиченого розчину тирозину, перемішують і обидві пробірки поміщають на баню при 40—45 °С. Кожні 5 хв пробірки виймають і вміст їх сильно струшують. Рідина в пробірці з активною витяжкою поступово забарвлюється в рожевий, бурий і остаточно в чорний колір. У процесі окиснення із тирозину утворюється червоний пігмент галахром, а потім темний пігмент меланін:



У контрольній пробі з прокип'яченою витяжкою колір рідини не змінюється. Аналогічний дослід можна провести, якщо взяти замість тирозину 0,1 % розчин адреналіну.

9.3.3 Окиснення гваякової кислоти киснем в присутності тирозинази

На поверхню зрізу сирі і звареної картоплі наносять по 1–2 краплі свіжоприготовленого 1 %-вого спиртового розчину гваякової смоли. Через 1–2 хв на поверхні сирі картоплі, особливо по краях біля шкірки, з'являється сине забарвлення. У досліді з вареною картоплею зміни забарвлення не спостерігається. Реакція обумовлена утворенням забарвленого в синій колір продукту окиснення – озоніду гваякової смоляної кислоти.

9.3.4 Окиснення пірогалолу гідроген пероксидом в присутності пероксидази

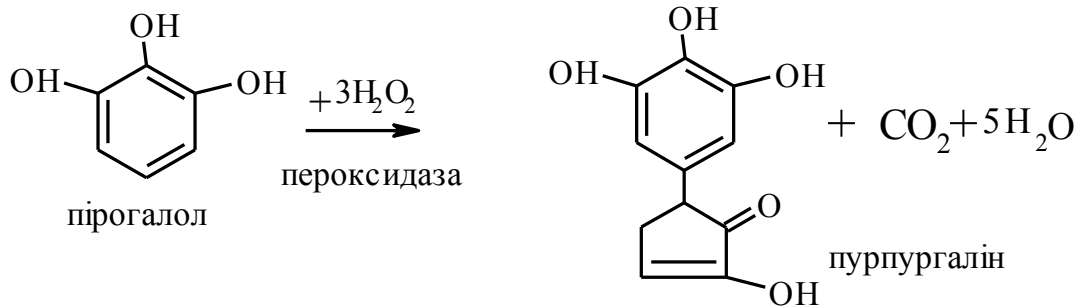
Пероксидазами називають ферменти, які каталізують окиснення деяких фенолів, поліфенолів і ароматичних амінів гідроген пероксидом або органічними пероксидами. Гідроген пероксид, що бере участь у реакції, утворюється в організмі в результаті дії аеробних дегідрогеназ. Органічні пероксиди виникають при 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)

9.3.5 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 peroкид 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 °С. Заповніть таблицю та зробіть висновки.

9.3.6 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 хвилинах, необхідних для знебарвлення МС. Одержані результати записують і роблять висновок.

В дослідях 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.

9.3.7 Іон хлору – інгібітор поліфенолоксидази

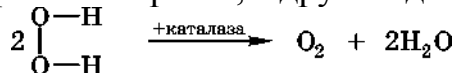
Дією поліфенолоксидази пояснюється потемніння поверхні розрізаного яблука або картоплини. Цей фермент окиснює полі- і монофеноли, дубильні речовини та інші органічні сполуки з утворенням темнозабарвлених продуктів.

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⁻.

9.3.8 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.

9.4 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 № 10 Вуглеводи, структура та обмін

10.1 Мета: освоїти методику кількісного визначення лактози у молоці. Визначити метаболіти внутріклітинного обміну вуглеводів

10.2 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).

Кількісне визначення лактози в молоці

Молекула лактози утворена залишками D-галактози і D-глюкози і є галактозидом: 4-(β -Галактозидо)-глюкоза, 4-(β -D-Галактопіранозил)-D-глюкоза. За положенням напівацетального гідроксилу залишку глюкози існують α - і β -аномери.

Лактоза є складовою частиною молока ссавців, знайдена також у пильниках деяких рослин. Входить до складу глікопротеїнів і гліколіпідів. Рівноважна суміш α - і β -форм має питоме обертання $+52,2^\circ$. Залишок глюкози в молекулі лактози здатний до циклооксотаутомерії і в альдегідній формі може окиснюватись у відповідну кислоту.

Отримують лактозу упарюванням молочної сироватки. Лактоза – єдиний вуглевод молока майже всіх ссавців. У 100 мл молока корів міститься в середньому 4,5 г лактози. Найбільший вміст молочного цукру в жіночому молоці – 7,5 г/100 мл. Чим більше в молоці жиру, тим менше лактози. У дуже жирному (40-50%) молоці деяких ластоногих: тюленів, морських левів, тихоокеанських моржів – лактози немає зовсім.

Основна функція лактози, як і молочного жиру, – забезпечити організм енергією.

Особливість лактози полягає в тому, що вона міститься практично тільки в молоці і гідролізується за участі ферменту лактази. Лактаза синтезується в клітинах, що розташовані на внутрішній поверхні середньої частини тонкого кишечника. Тут відбувається розщеплення лактози і всмоктування продуктів її гідролізу – галактози і глюкози.

Кількість лактази, що синтезується в кишечнику, не є постійною протягом життя людини і тварин. Максимум лактазної активності спостерігається в перші дні після народження. Потім, по мірі розвитку організму, лактазна активність зменшується, стає з часом більш-менш постійною і дуже низькою порівняно з періодом грудного харчування. У людини зниження лактазної активності закінчується у 1,5-3 роки. Подібне спостерігається у всіх ссавців, за винятком ластоногих, у молоці яких лактоза відсутня. Ці тварини не виробляють лактази і тому не здатні засвоювати лактозу. Спроби вигодовувати тюленят і моржат молоком корів призводили до тяжких наслідків для цих тварин.

Буває, що й деякі грудні діти не можуть засвоювати лактози. Лактозна інтолерантність може бути спадковою або ж виникнути в результаті деяких захворювань, недоїдання. При довготривалому вигодовуванні дитини молоком

надходження лактози може досягати 30-40 г на добу і перевищувати лактазну активність.

Неперетравлена лактоза частково всмоктується в кров і потім виводиться з організму з сечею; частина лактози надходить у товстий кишечник, де зброджується під дією мікрофлори, унаслідок чого виникає серйозний розлад травного тракту, у деяких випадках може наступити смерть дитини.

Здатність засвоювати лактозу в дорослих людей скоріше виняток, ніж правило. Лактозну інтолерантність виявили у жителів багатьох країн Азії, у тому числі японців і китайців, а також у ескімосів, південноамериканських індіанців, євреїв, у представників багатьох африканських народностей. Причому в деяких випадках кількість людей з лактозною інтолерантністю наближається до 100%.

У більшості жителів Північної і Центральної Європи і їх нащадків, що живуть в інших регіонах світу, лактозної інтолерантності немає. Найбільша лактазна активність виявлена у дорослих шведів, швейцарців, білих громадян США, фінів.

Вживання молока 0,5-1 мл на день навіть у людей з лактозною інтолерантністю не може спричинити серйозних наслідків. Тільки у разі щоденного вживання декількох літрів молока, можна чекати тяжких симптомів.

Молоко – чудова їжа, виготовлена самою природою, але ця їжа створена тільки для немовлят. Дивно те, що організм деяких дорослих ще може засвоювати молоко.

Здатність засвоювати лактозу дорослими – спадкова ознака, вироблена в ході біологічної еволюції людини. Ця здатність властива лише народам, пращури яких довгий час займалися скотарством і протягом життя вживали молоко, тоді як для землеробських і мисливських народів типова лактозна інтолерантність. Ця закономірність особливо чітко проявляється у народностей Африки. Серед скотарського племені туссі лактозу засвоює 80% дорослих, а серед землеробів ганда – тільки 20%.

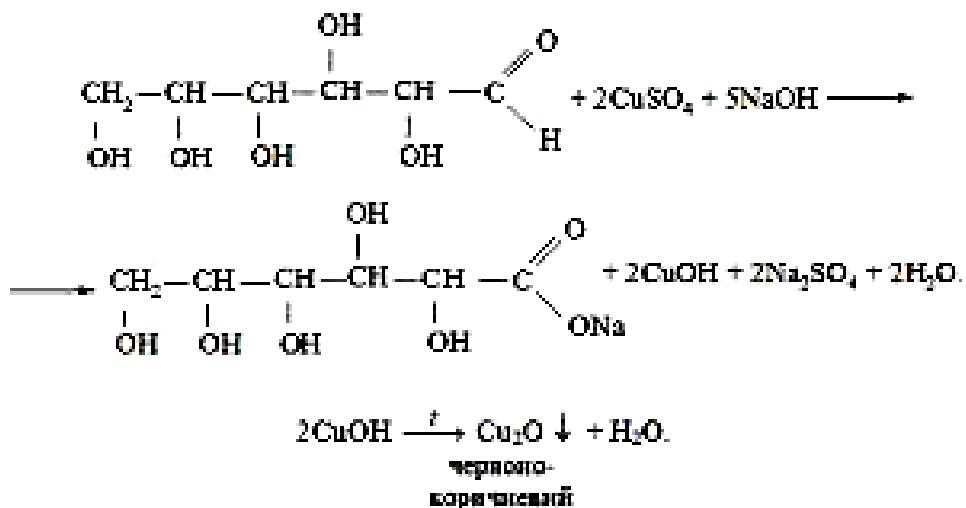
Можна припустити, що здатність засвоювати лактозу, яка випадково виникла в результаті мутацій, у скотарів у ході природного відбору закріпилась як корисна ознака. Для людей, що не займалися скотарством, ця здатність не мала особливого значення і тому втрачалася. Отже, для більшості дорослих лактоза молока не може бути джерелом енергії.

10.3 Експериментальна частина

10.3.1 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:

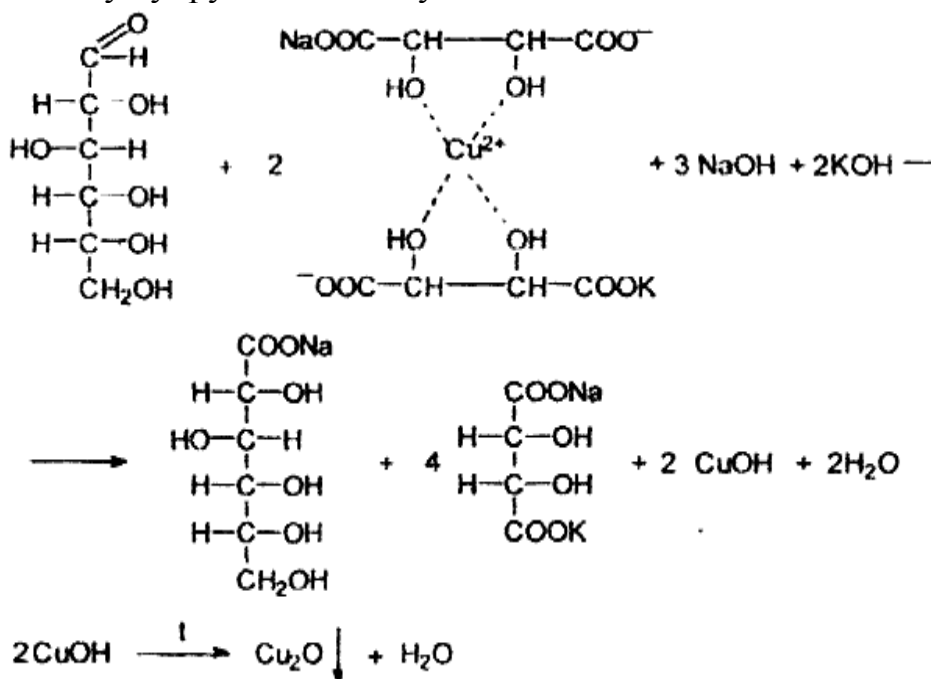


В пробірку до 3 мл розчину глюкози додають 1 мл 5 % розчину натрій гідроксиду і п'ять крапель 5 % розчину купруму (II) сульфату. Випадає осад купруму (II) гідроксиду, який внаслідок струшування пробірки розчиняється, а розчин набуває волошкового забарвлення. Під час його обережного нагрівання в полум'ї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

10.3.2 Реакція Фелінга

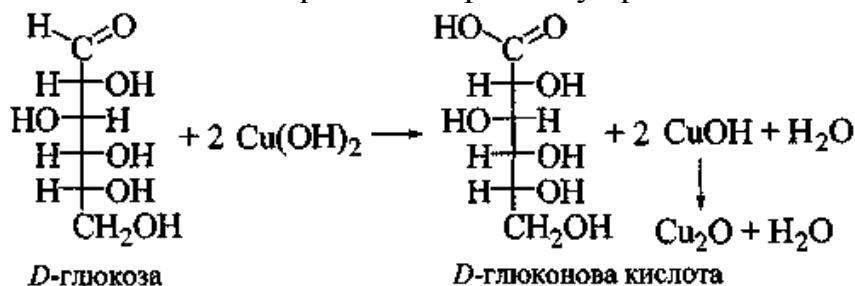
В реактиві Фелінга йони купруму (II) перебувають у вигляді комплексної сполуки з тартратами. Механізм реакції гексоз (і всіх редуруючих вуглеводів) із реактивом Фелінга такий же, як і в реакції Троммера. Перевагою реактиву Фелінга є те, що купрум у разі надлишку реактиву не випадає у вигляді купрум (II)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



10.3.3 Відновлення аміачного розчину аргентум гідроксиду глюкозою

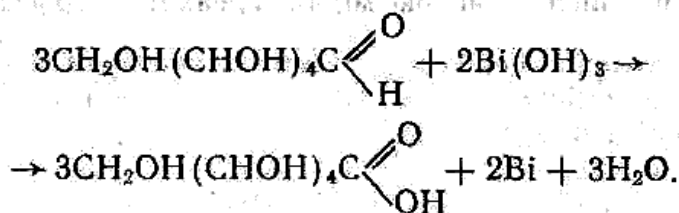
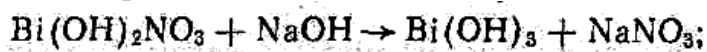
Глюкоза відновлює аміачний розчин гідроксиду срібла:



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.

10.3.4 Реакція з солями, вісмуту (реакція Ніландера)

В лужному середовищі вісмуту нітрат гідроксиду за наявності гексоз відновлюється до металевого вісмуту. Цю реакцію для глюкози можна представити у вигляді таких рівнянь:



В пробірку до 3 мл 5 %-го розчину глюкози додають 1 мл 5 %-го розчину натрій гідроксиду й на кінці лопаточки чи шпателя сухого порошку вісмуту нітрат дигідроксиду. Суміш перемішують і нагрівають обережно в полум'ї пальника. Спостерігають утворення коричневого, а потім чорного осаду металічного вісмуту.

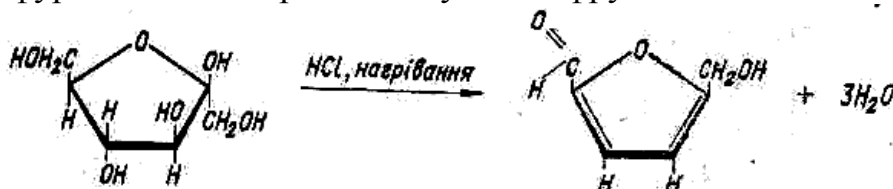
10.3.5 Реакція Подобєдова – Моліша з α -нафтолом

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.

10.3.6 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:

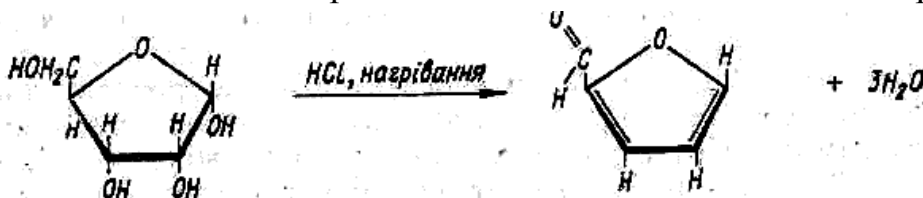


Оксиметилфурфурол із резорцином утворюють сполуку (продукт конденсації), забарвлену у вишнево-червоний колір. Ця реакція дає можливість визначити як вільні, так і зв'язані кетози. Швидше реакція Селіванова відбувається з фруктозою.

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 концентрованої розчину хлоридної кислоти й декілька кристалів резорцину. Суміш нагрівають на водяній бані протягом 5 – 10 хв за температури 80 °С до появи вишнево-червоного кольору.

10.3.7 Реакція з орцином (реакція Біалія) та флороглюцином на пентози. Пентози під дією концентрованої соляної кислоти під час нагрівання перетворюю



Фурфурол із орцином за наявності слідів хлориду заліза (III) утворює сполуку (продукт конденсації), забарвлену в зелений колір, а з флороглюцином – сполуку вишнево-червоного кольору.

В дві пробірки вносять по 2 мл 0,1 % розчину рибози. В одну з них додають також 2 мл концентрованої хлоридної кислоти та декілька кристалів орцину, а в іншу – 3 мл 0,1 % розчину флороглюцину й перемішують. Пробірку з орцином кип'ятять на водяній бані 6 хв, а з флороглюцином нагрівають до кипіння. Спостерігають утворення зеленого забарвлення в пробірці з орцином і вишнево-червоного – з флороглюцином.

10.3.8 Реакція дезоксипентоз із дифеніламіном

Під час нагрівання дезоксипентоз у кислому середовищі утворюється фурфуроловий спирт, оксилевулиновий альдегід і подібні хромогени, які, конденсуючись із дифеніламіном, утворюють забарвлені в синій колір сполуки.

В пробірку наливають 1 мл 0,2 % розчину дезоксирибози та 1 мл 1 % розчину дифеніламіну, перемішують і кип'ятять 10 хв. Спостерігають утворення сполук, забарвлених у синій колір.

10.3.9 Виявлення моносахаридів у моркві Кладуть у пробірку трохи протертої моркви, додають 5 мл води, струшують 2 – 3 хвилини, фільтрують і фільтрат ділять на дві частини. В одній пробірці відкривають моносахариди реакцією Фелінга, у другій – фруктозу – реакцією Селіванова.

10.3.10 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.

10.3.11 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.

10.3.12 Виявлення редуруючого вуглеводу лактози в молоці.

У мірний циліндр місткістю 50 мл наливають 2,5 мл молока, додають 40 мл дистильованої води і 1 мл 1% розчину КОН. Об'єм суміші доводять до 50 мл. Струшують вміст. Фільтрують. Відміряють в окрему пробірку 2-3 мл фільтрату і проводять реакцію Фелінга.

10.3.12 Кількісне визначення вуглеводів

10.3.12.1 Визначення глюкози за наявності фруктози йодо-метричним методом

Основу цієї методики складає здатність молекулярного йоду (I_2) у лужному середовищі окиснювати тільки альдегідоспирти, не діючи на кетоспирти. При внесенні надмірної кількості йоду, який не прореагував, можна визначити у кислому середовищі титруванням натрій тіосульфатом (індикатор – розчин крохмалю).

У дві колби наливають по 50 мл 0,05 моль/л розчину йоду. В одну з них (проба) додають 10 мл розчину, який досліджується (гідролізат сахарози або інвертний цукор), а в другу (контроль) - 10 мл дистильованої води. Потім, збовтуючи, доливають краплями 10 мл розчину 0,5 моль/л калій гідроксиду і залишають у стані спокою за кімнатної температури на 15 хв.

Після цього до обох колб додають по 10 мл 10 % розчину хлоридної кислоти і 2 – 3 краплі розчину крохмалю. Вміст колб титрують розчином 0,05

моль/л натрій тіосульфату до зникнення синього забарвлення, яке з'явилося в результаті додавання крохмалю.

Масову концентрацію глюкози у досліджуваному розчині (мг/мл) обчислюють за формулою:

$$C = (B-A)fQV_0/V_1.$$

де A і B – об'єми розчину натрій тіосульфату, який необхідний для титрування проби і контролю;

f – коефіцієнт поправки на титр 0,05 н розчину натрій тіосульфату, що дорівнює 0,97 ;

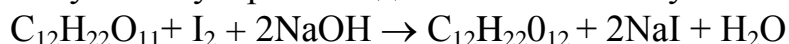
Q – маса глюкози (9 мг), еквівалентна 1 мл 0,05 н розчину натрій тіосульфату;

V_0 – загальний об'єм проби: 50+10 (вуглевод)+10 (KOH) + 10(HCl) = 80 (мл);

V_1 – об'єм досліджуваної суміші, яку взяли для аналізу – 10 мл.

10.3.12.2 Кількісне визначення лактози в молоці

Лактоза в лужному середовищі окиснюється по напівацетальному гідроксилу молекулярним йодом в лактобіонову кислоту:



Надлишок йоду, що не вступив у реакцію, визначають титруванням розчину натрій тіосульфату, використовуючи індикатор крохмаль.

У дві мірні колби вносять по 5 мл 7 % розчину купруму (II) сульфату, по 5 см³ 2% розчину натрій гідроксиду, по 2,5 мл 5% розчину натрій фториду. В одну з колб додають 5 мл молока, у другу - 5 мл дистильованої води (контроль), перемішують і доводять дистильованою водою до об'єму 50 мл, через 30 хвилин фільтрують. Переносять у конічні колби по 20 мл фільтрату дослідної проби і контролю, додають по 20 мл розчину йоду ($C = 0,05$ моль/л) і, постійно перемішуючи, по 10 мл 2% розчину натрій гідроксиду. Колби ретельно закривають. Через 20 хвилин до вмісту колб додають по 10 см³ 5% розчину хлоридної кислоти, по декілька крапель 1% розчину крохмалю і титрують розчином натрій тіосульфату ($C(1/2) = 0,05$ моль/л) до знебарвлення розчину.

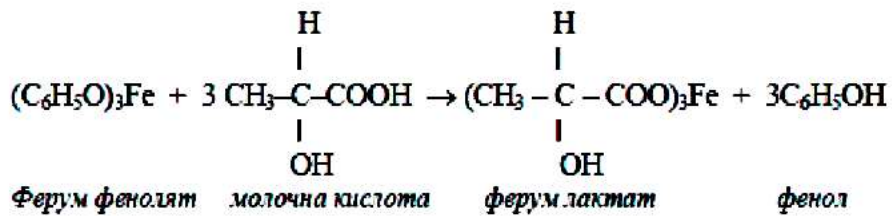
Масову концентрацію лактози в молоці, мг/мл, розраховують за формулою:

$$C = (A - B)fQV_0/V_1V_2,$$

де A і B – об'єм розчину тіосульфату натрію, витрачений на титрування проби та контролю; f – коефіцієнт поправки на титр 0,05 моль/л розчину тіосульфату натрію (0,97); Q – маса лактози. (18,1 мг), еквівалентна 1 мл 0,05 моль/л розчину натрій тіосульфату; V_0 – загальний об'єм проби; V_1 і V_2 – об'єми фільтрату та, молока, взяті для дослідження.

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

Ферум фенолят (реактив Уффельмана) при взаємодії з молочною кислотою утворює ферум лакта 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:

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

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

10.4 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 № 11

Визначення глюкози в сечі. Функціональні проби на патологію вуглеводного обміну

11.1 Мета: експериментально провести функціональні проби на патологію вуглеводного обміну

11.2 Короткі теоретичні відомості

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.

11.3 Експериментальна частина

11.3.1 Проба Фелінга

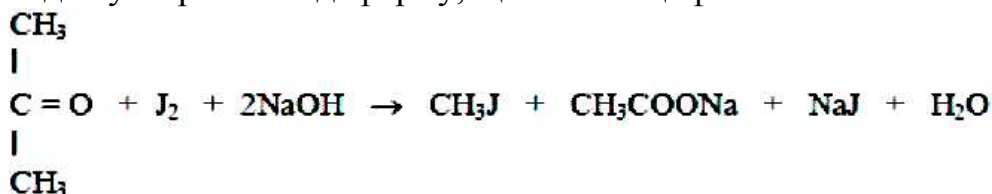
До 5 крапель реактиву Фелінга додають 5 крапель сечі, що підлягає дослідженню. Рідину перемішують і нагрівають до початку кипіння. При цьому випадає жовтий осад купруму (I) гідроксиду або червоний осад купруму оксиду. Слід відзначити, що в сечі міститься багато органічних речовин (сечова кислота, креатинін та інші), які при довгому кип'ятінні також можуть відновлювати важкі метали. На відміну від цього відновлення металів в присутності глюкози відбувається до кипіння.

11.3.2 Напівкількісне визначення глюкози в сечі (орієнтовний експрес-метод). У ступці розтирають у тонкий порошок 1 г купруму (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 %.

11.3.3 Функціональні проби на патологію вуглеводного обміну

11.3.3.1 Взаємодія ацетону з йодом

При додаванні розчину йоду до підлужненої сечі, яка містить ацетон, рідина мутніє внаслідок утворення йодоформу, що має специфічний запах:

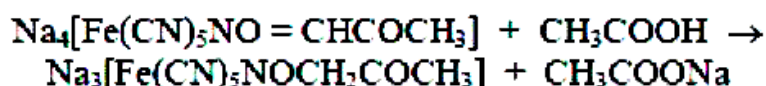


Ця реакція неспецифічна оскільки при взаємодії йоду з ацетальдегідом і етанолом також утворюється йодоформ.

У пробірку внести 5 мл сечі, додати 1 мл 10% розчину нагрій гідроксиду і по краплях 10 % розчин йоду в калій йодиді до появи жовтуватого забарвлення. Спостерігати за змінами у пробірці. Пояснити результати досліду та записати висновок.

11.3.3.2 Реакція на ацетон

Проба Легалья. При взаємодії ацетону чи ацетоацетатної кислоти з натрій нітропрусидом в лужному середовищі утворюються комплексні сполуки оранжево-червоного кольору, які за присутності концентрованої ацетатної кислоти набувають темно-червоного забарвлення:



Ця реакція неспецифічна для ацетону та ацетоацетатної кислоти, оскільки креатинін сечі також взаємодії з нітропрусидом з утворенням подібного забарвлення, однак при додаванні концентрованої ацетатної кислоти рідина набуває жовтого кольору.

У пробірку 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 пробірку додати 1 мл концентрованої ацетатної кислоти та спостерігати за зміною забарвлення.

Пояснити результати досліду та записати висновок.

11.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання).

1. Пояснити поняття "ацетон сечі". Яке діагностичне значення проби на ацетон?
2. Записати хімізм реакції взаємодії ацетону з йодом.
3. Що означають назви "кетонемія" і "кетонурія"
4. Що являє собою ацетон і за яких умов він утворюється в організмі
5. Яке діагностичне значення має визначення ацетону та ацетоацетатної кислоти
6. Записати схему утворення кетонових тіл.
7. За яких умов вміст ацетону і ацетоацетатної кислоти в рідинах організму зростає
8. Записати будову ацетоацетатної кислоти
9. Вказати головні ознаки цукрового діабету

Лабораторна робота № 12

Фізико-хімічні властивості ліпідів

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

12.2 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.

12.3 Експериментальна частина

12.3.1 Утворення масляної плями

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

12.3.2 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 кожному, потім в першу додають 3 мл води, в другу- 3 мл спирту, в третю - 3 мл ефіру, в четверту- 3 мл хлороформу. Вміст всіх пробірок енергійно струшують і відзначають зміни, які відбулися в кожній пробірці.

12.3.3 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 розшаровувалася, використовують спеціальні речовини – емульгатори або стабілізатори (мила, жовчні кислоти, карбонати). Утворення емульсії обумовлено тим, що у поверхневій водній 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.

12.3.4 Виявлення ненасиченості ліпідів

В одну пробірку вносять 1 мл розчину рослинної олії в хлороформі, в другу- 1 мл вершкового масла в хлороформі. В кожен пробірку вливають по краплям бромну воду до припинення знебарвлення. Фіксують кількість бромної води, яку додали в кожен пробірку.

12.3.5 Омилення жирів

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

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

12.3.6 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.

12.3.7 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_3 (NaHSO_3) або H_3BO_3 та обережно нагрівають. Написати рівняння реакції. Зробити висновки з дослідів.

12.3.8 Визначення хімічних показників жирів. Визначення числа омилення жиру

Жири характеризуються рядом хімічних показників. Основні з них: кислотне число, ефірне, йодне, пероксидне, число омилення.

Числом омилення називається кількість мг KOH , яка необхідна для нейтралізації всіх як вільних жирних кислот так і тих, що входять до складу триацилгліцеролів, які містяться в 1 г жиру.

В одну колбу (дослідна проба) вміщують 0,5 г жиру, в другу (контрольна проба) – 0,5 мл води. В обидві колби доливають по 15 мл 0,5 М спиртового розчину KOH , який попередньо приготовлений. Колби кип'ячать із зворотнім холодильником на водяній бані 40-50 хв. до повного омилення гліцеридів та нейтралізації вільних жирних кислот, періодично струшуючи. В обидві колби доливають по 10 крапель 0,1% розчину фенолфталеїну та титрують теплий розчин 0,5 М розчином HCl до зникнення рожевого забарвлення (до нейтральної реакції).

Кількість KOH (мг) або число омилення (ЧО), яке пішло на нейтралізацію жирних кислот в 1 мг жиру, дорівнює:

$$\text{ЧО} = (B-A) \cdot Q / a$$

де $B-A$ – різниця результатів титрування контрольного та дослідного зразків розчином хлоридної кислоти (мл);

a – наважка жиру (г);

Q – кількість KOH (28,05 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,5 М розчину KOH .

12.3.9 Визначення кислотного числа жиру

Кислотністю жиру чи кислотним числом називається кількість мг KOH , яка необхідна для нейтралізації вільних жирних кислот, які містяться в 1 г жиру.

До 1 г жиру (рослинна олія) додають 5 мл спирту, нейтралізованого за фенолфталеїном, ретельно перемішують для максимального розчинення вільних жирних кислот та титрують 0,1 М розчином KOH до появи рожевого забарвлення, незникаючого після збовтування.

Кількість KOH (мг) або кислотне число (КЧ), яке пішло на нейтралізацію вільних жирних кислот в 1 г жиру, дорівнює:

$$\text{КЧ} = A \cdot fQ / a$$

де A – об'єм розчину KOH в мл, який витрачений на титрування дослідної проби

a – наважка жиру (г);

f – коефіцієнт поправки на титр 0,1 М розчину КОН;

Q – кількість КОН (5,61 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,1 М розчину КОН.

Для характеристики кислотності рослинної олії крім кислотного числа часто визначають % вміст вільної олеїнової кислоти O за формулою:

$$O = 0,53 \cdot \text{к.ч.}, \text{ к.ч. в мг}$$

12.3.10 Визначення ефірного числа жиру

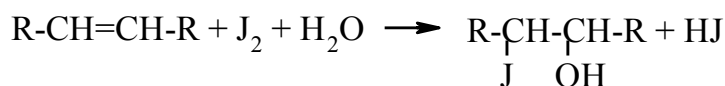
Ефірним числом називається кількість мг КОН, яка необхідна для нейтралізації жирних кислот, які утворюються при омиленні триацилгліцеролів, які містяться в 1 г жиру. Це число визначають як різницю між числом омилення жиру та його кислотним числом.

$$EЧ = ЧО - КЧ$$

12.3.11 Визначення йодного числа жиру

Йодним числом називається кількість г йода, яка прореагувала зі 100 г жиру. Це число вказує на наявність в жиру ненасичених жирних кислот.

Визначення йодного числа базується на реакції приєднання йоду до подвійного зв'язку, яка відбувається за рівнянням:



У колбу з корком вносять близько 5 мл олії. До другої колби (контрольної) вносять рівний об'єм дистильованої води. В обидві додають по 5 мл хлороформу. Колби закривають корками і струшують. У колби (точно) піпеткою додають по 10 мл 0,1 н розчину йоду, закривають корками, струшують і ставлять у темне місце на 5 хвилин. Через 5 хв вміст колб відтитровують 0,05 М розчином $Na_2S_2O_3$ спочатку до появи слабо жовтого забарвлення, а після додавання 1 мл 1% розчину крохмалю титрують до зникнення синього забарвлення.

Йодне число розраховують за формулою:

$$ЙЧ = (B-A) \cdot f \cdot Q \cdot 100 / a \cdot 1000 \quad \text{де}$$

$B-A$ – різниця результатів титрування контрольного та дослідного зразків розчином гіпосульфіту (мл);

a – наважка жиру (г);

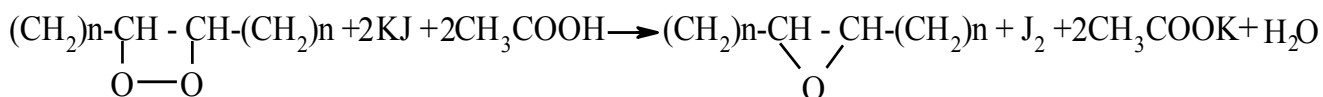
f – коефіцієнт поправки на титр 0,05 М розчину $Na_2S_2O_3$;

Q – кількість J_2 (12,69 мг), яка еквівалентна 1 мл 0,05 М розчину $Na_2S_2O_3$.

12.3.12 Визначення пероксидного числа в прогірклому жиру

Пероксидним числом називається кількість мл розчину $Na_2S_2O_3$, яка необхідна для титрування вільного йоду, який виділяється при окисненні КІ пероксидним угрупованням 1 г жиру.

Метод базується на здатності пероксидних угруповань жиру реагувати з КІ в кислому середовищі:



Оскільки можливо утворення йоду при окисненні КJ киснем повітря, необхідно проводити контрольні проби.

В першу колбу ємністю 50 мл вміщують наважку жиру 1 г, в другу - 1 мл води (контрольна проба), потім в обидві колби додають по 5 мл льодяної оцтової кислоти, 6 мл хлороформу та 1 мл свіжоприготованого насиченого розчину КJ. Після цього вміст колб струшують, колбу укупорюють і ставлять у темне місце на 10 хвилин. Потім додають 50 мл дистильованої води, титрують йод, що виділяється, 0,005 М розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, додаючи 10 крапель 0,1% розчину крохмалю в якості індикатора.

Пероксидне число (мл) розраховують за формулою:

$$C=(A-B) \cdot 0,0002538 \cdot 100 \cdot f,$$

де $B-A$ – різниця результатів титрування дослідного та контрольного зразків розчином $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (мл);

f – коефіцієнт поправки на титр розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$,

0,0002538 – титр 0,002 н розчину натрій тіосульфату за йодом.

12.3.13 Реакція на альдегіди з реактивом Шиффа

Однією з найбільш специфічних є реакція з фуксинсульфатною кислотою (реактивом Шиффа). Безбарвний розчин фуксинсульфатної кислоти під дією альдегідів набуває червоно-фіолетового або синьо-фіолетового забарвлення.

У пробірку наливають 1 мл олії, додають 0,5 мл реактива Шиффа і перемішують. Якщо в рідині є альдегіди, то з'являється червоно-фіолетове або синьо-фіолетове забарвлення. Якщо забарвлення не з'явилося через 20 хвилин після початку дослідження, то це свідчить про відсутність альдегідів в олії.

12.3.14 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.

12.4 Питання для самоконтролю

(домашнє завдання)

1. Перерахуйте хімічні показники жирів?
2. Яка різниця між числом омилення та кислотним числом?
3. Що таке ефірне та пероксидне число?
4. Як визначити йодне число жиру?
5. Як визначити наявність альдегідів у олії?
6. Реакція Вітбі на наявність стеринів в олії.
7. Метод виявлення ненасиченості ліпідів.

Лабораторна робота № 13

Обмін ліпідів. Вплив жовчі на активність ліпази

13.1 Мета: дослідити кінетику дії ліпаз і вплив жовчних кислот на її активність.

13.2 Короткі теоретичні відомості

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.

13.3 Експериментальна частина

13.3.1 Вплив жовчі на активність ліпази

Швидкість дії ліпази в окремих порціях жиру молока можна встановити за кількістю жирних кислот, які утворюються при гідролізі жиру за визначений проміжок часу. Кількість жирних кислот визначають титруванням лугом в присутності фенолфталеїну. У випадку додавання в пробу жовчі ліпаза активується і гідроліз жирів молока протікає з більшою швидкістю.

Результати визначення виражають в мл титрованого розчину лугу, будують графік, де на осі ординат відкладають кількість 0,05 н розчину лугу, яку витратили на нейтралізацію жирних кислот (мл), а на осі абсцисс — час (в хв).

В колбу з прокип'яченим і розведеним дистильованою водою 1:1 молоком (10 мл) додають 1 мл 5% розчину панкреатину та 1 мл жовчі. Паралельно ставлять контроль: 10 мл молока, 1 мл 5% розчину панкреатину та 1 мл води. З кожної колби відбирають по 1 мл суміші, додають 1-2 краплі фенолфталеїну та титрують 0,05% розчином NaOH до слабо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30 с. Обидві колби з сумішшю, що залишилась, ставлять в термостат при 38°C. Через кожні 10 хв. з колби відбирають по 1мл суміші (5 – 6 разів), добавляють по 1 – 2 краплі фенолфталеїну та титрують розчином NaOH до слабо-рожевого забарвлення.

13.3.2 Якісна реакція на жовчні кислоти

При додаванні до розчину жовчі або жовчних кислот розчину сахарози і підшаруванні суміші концентрованою сульфатною кислотою на межі двох рідин з'являється червоне кільце.

Реакція обумовлена утворенням забарвлених продуктів жовчних кислот з фурфуролом, який утворюється із фруктози при дії на сахарозу концентрованої сульфатної кислоти. Реакція використовується для ідентифікації фармпрепаратів, що містять жовч.

До 10 крапель розведеної (1:2) жовчі додають 1 краплю 5 % розчину сахарози і обережно по стінці пробірки, нахиленої під кутом 45°, нашаровують рівний об'єм концентрованої сульфатної кислоти. Відзначають появу червоного кільця.

13.3.3 Емульгування триацилгліцеролів жовчними кислотами

Жовчні кислоти є поверхнево-активними речовинами і при збовтуванні триацилгліцеролів з розчином жовчі утворюється стійка емульсія, тому що молекули жовчних кислот обволікують краплинки жиру і перешкоджають їх злипанню.

У дві пробірки наливають по 20 крапель: у першу – жовч, розведену вдвічі; у другу – воду. У кожну пробірку додають по 2 краплі рослинної олії і ретельно збовтують. Відзначають результати досліду і роблять висновки.

13.4 Питання для самоконтролю

(домашнє завдання)

1. Особливості обміну ліпідів.
2. Процеси розщеплення жирів у шлунково-кишковому тракті.

3. Роль жовчі в розщепленні жирів.
4. Характеристика жовчних кислот.

Лабораторна робота № 14 **Дослідження фосфоліпідів.**

14.1 Мета: виділити лецитин з яєчного жовтка та дослідити його склад і властивості

14.2 Короткі теоретичні відомості

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

14.3 Експериментальна частина

14.3.1 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.

14.3.2 Емульгуюча дія лецитину

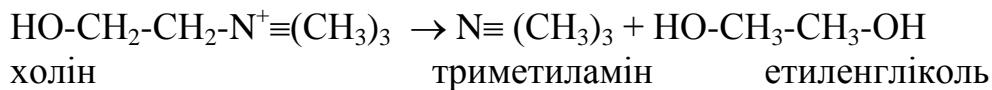
До 5 крапель спиртового розчину лецитину додають 2 мл води та 0,2 мл олії, пробірку струшують. Утворюється стійка емульсія у воді.

14.3.3 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.

14.3.4 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:



Фосфатну кислоту можна відкрити при нагріванні з амонію молібдатом.

14.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Чим відрізняються жир, що був синтезований у стінках кишечника, від харчового жиру?
2. Напишіть рівняння синтезу тристеарину з фосфатидної кислоти.
3. Написати процес β – окиснення на прикладі капронової кислоти.
4. Яка біологічна роль розпаду фосфоліпідів?
5. Яку роль відіграють фосфоліпіди в обміні жирів?

Лабораторна робота № 15 Обмін білків

15.1 Мета: провести кількісне визначення кислотності шлункового соку та активності пепсину шлункового соку. Дослідити гідроліз білка під впливом травних ферментів

15.2 Короткі теоретичні відомості

Обмін білкових сполук посідає провідне місце в різноманітних перетвореннях речовин, характерних для всіх живих організмів. Білкові речовини виконують ряд унікальних функцій, що властиві живій матерії, та визначають не тільки мікро- і макроструктуру окремих субклітинних утворень, специфіку клітин, органів і цілісного організму (пластична функція), але й значною мірою динамічний стан організму і його зв'язок із зовнішнім середовищем. Білки виконують унікальні каталітичні функції, забезпечують травну, транспортну, скорочувальну, енергетичну та інші функції в організмі. Білки і амінокислоти беруть безпосередню участь у біосинтезі біологічно активних речовин: гормонів, медіаторів, біогенних амінів та ін. Здатність до росту та репродукції тісно пов'язана з наявністю в організмі комплексу білків з нуклеїновими кислотами — нуклеопротеїнів.

Повна відсутність білків та амінокислот в їжі призводить до загибелі організму. За харчовою цінністю білки поділяються на *повноцінні*, що містять усі вісім незамінних для людини амінокислот (АК) (як правило, це білки тваринного походження), і *неповноцінні*, в яких відсутня хоча б одна незамінна амінокислота (більшість білків рослинної природи).

Нативні білки їжі не утилізуються організмом без попереднього розщеплення в шлунково-кишковому тракті. Біологічний сенс ентерального обміну полягає у втраті видової та тканинної специфічності білків їжі і перетворенні їх на імунологічно індиферентні амінокислоти, що використовуються надалі для потреб організму.

Для правильної оцінки стану обміну білків достатнім критерієм може бути визначення нітрогенового балансу, тобто відношення кількості нітрогену, що надійшов до організму з їжею, до виведеного з організму у формі кінцевих продуктів нітрогенового обміну. Основна маса нітрогену їжі міститься в білках. Якщо кількість виведеного з організму нітрогену менша за кількість того, що надійшов з їжею, то має місце позитивний нітрогеновий баланс. При негативному нітрогеновому балансі кількість виділеного нітрогену перебільшує кількість нітрогену, що надходить до організму. При нітрогеновій рівновазі кількість виведеного з організму нітрогену дорівнює кількості нітрогену, що надходить з їжею. Позитивний баланс характерний для молодого організму, у жінок під час вагітності, після голодування і затяжних хвороб. Він виникає, оскільки в організмі йде процес накопичення білків. Нітрогенова рівновага характерна для дорослої людини, якщо вона з їжею отримує достатню кількість повноцінних білків, оскільки для біосинтезу білка необхідна наявність усіх незамінних амінокислот. Негативний нітрогеновий баланс спостерігають при різних захворюваннях, пов'язаних з посиленням розпадом білків тканин, при білковому голодуванні, у старечому віці. Визначення нітрогенового балансу є важливим для клінічної біохімії і широко використовується для визначення норми білка в харчуванні.

Ентеральний обмін білків – це перетворення їх у шлунково-кишковому тракті. Після першого етапу ентерального перетворення білків у шлунку під дією пепсину та гастриксину утворена суміш поліпептидів і більш коротких олігопептидів надходить до дванадцятипалої кишки, де підлягає наступному протеолізу під дією трипсину і хемотрипсину – протеолітичних ферментів, що синтезуються в підшлунковій залозі і надходять до дванадцятипалої кишки протокою підшлункової залози. Подальше розщеплення до амінокислот відбувається під дією карбоксипептидаз А і В, амінопептидази та інш.

Перетворення білків в організмі людини починається в шлунку. Протеолітичні ферменти виробляються клітинами слизової оболонки шлунка, тонкого кишечника, клітинами підшлункової залози в неактивній формі – у вигляді проферментів, які перетворюються на відповідні активні форми вже в травному каналі.

Під дією протеолітичних ферментів харчові білки розщеплюються до окремих амінокислот, які всмоктуються з кишок до кров'яного руслу.

Шлунковий сік – складна біологічна рідина, що містить різні органічні та неорганічні речовини (серед яких особливе місце посідає хлоридна кислота), білки-ферменти та воду до 99,2 %. Перетравлювання білків значною мірою залежить від кислотності шлункового соку.

При визначенні кислотності розрізняють загальну кислотність (сума всіх кислореагуючих речовин), загальну хлоридну кислоту: вільну і зв'язану хлоридну кислоту. У нормі загальна кислотність становить 40-60 од., вміст вільної хлоридної кислоти – 30- 40 од., зв'язаної 5-20 од.

Головне призначення шлунка – перетворення білків. Під дією хлоридної кислоти шлункового соку відбувається набухання, розрихлення і денатурація

харчових білків, що полегшує їх подальше розщеплення. Процес гідролізу білків каталізується ферментами протеазами, що також містяться в шлунковому соку. Найбільш активною протеазою шлункового соку є *пепсин*, який секретується клітинами у вигляді неактивного попередника – пепсиногену. Утворення активного пепсину відбувається шляхом відщеплення від пепсиногену так званого інгібіторного пептиду. Це відщеплення спершу ініціюється йонами гідрогену, що є в шлунковому соку, а надалі відбувається під дією активного пепсину. Пепсин ендопептидаза швидко гідролітично розщеплює в білках внутрішні пептидні зв'язки, що утворені ароматичними амінокислотами – фенілаланіном, тирозином і триптофаном. Оптимум дії пепсину знаходиться при $\text{pH} = 1,5 \dots 2,0$. Шлунковий сік містить й інші протеази, зокрема гастринсин, який має оптимум дії при $\text{pH} = 3,0 \dots 3,5$ і гідролізує пептидні зв'язки, що утворені дикарбоновими амінокислотами (глутаміновою і аспарагіновою).

Серед продуктів розщеплення білків у шлунку знаходяться ще досить складні поліпептиди, багато олігопептидів і незначна кількість вільних АК. Пепсин також може згущувати молоко(зсідання), при цьому розчинний білок молока, казеїноген, переходить у казеїн і з солями кальцію утворює кальцію казеїнат, який випадає в осад (сир).

При патології кислотність шлункового соку може бути як знижена, так і підвищена. Відсутність хлоридної кислоти (ахілія) часто спостерігають при пухлинних новоутвореннях шлунка. Знижену кислотність (гіпохлоргідрія) зустрічають при гіпоацидному гастриті, інколи при виразковій хворобі шлунка. Підвищена кислотність (гіперхлоргідрія) має місце при гіперацидному гастриті і часто супроводжується виразковою хворобою шлунка і дванадцятипалої кишки.

Подальше розщеплення продуктів пептидного перетворення білків проходить у дванадцятипалій кишці під дією панкреатичних ферментів, зокрема, трипсину і хімотрипсину, що продукуються підшлунковою залозою у вигляді неактивних проферментів: трипсиногену та хімотрипсиногену. Перетворення трипсиногену на трипсин проходить під впливом ентеропептидази кишкового соку, яка відщеплює від трипсиногену інгібіторний пептид. Активний трипсин здатний каталізувати утворення нових порцій трипсину з трипсиногену (аутокаталіз). Крім того, трипсин перетворює хімотрипсиноген на активний хімотрипсин. Трипсин гідролізує пептиди за місцем пептидних зв'язків, в утворенні яких беруть участь карбоксильні групи аргініну та лізину, а хімотрипсин – між ароматичними амінокислотами. У результаті утворюються низькомолекулярні пептиди і окремі амінокислоти. Подальше розщеплення до амінокислот проходить під впливом екзополіпептидаз. Аміноацилпептидази відщеплюють амінокислоти з N-кінця, карбоксипептидази – з C-кінця. Дипептидази розщеплюють дипептиди. Послідовна дія численних протеолітичних ферментів закінчується тим, що білки їжі в травному каналі перетворюються на амінокислоти. Таким чином білки їжі втрачають свою видову специфічність.

Повного розщеплення харчових білків під дією травних ферментів шлунка і тонкого кишечника найчастіше не відбувається. Недорозщеплені пептиди та амінокислоти, що не всмокталися в тонкому кишечнику, потрапляють до товстого кишечника, де підпадають під вплив ферментних систем мікрофлори.

Мікрофлора кишечника має ферментні системи, які каталізують різноманітні перетворення харчових амінокислот, у тому числі до невластивих організму людини. При цьому в кишечнику утворюються високотоксичні сполуки розпаду амінокислот: фенол, крезол, індол, скатол, сірководень, метилмеркаптан, путресцин, кадаверин, а також нетоксичні для організму речовини: спирти, оксикислоти, жирні кислоти, альдегіди, аміни та ін. Усі ці перетворення амінокислот, що спричинені діяльністю мікроорганізмів кишечника, отримали загальну назву «гниття білків у кишечнику». Після всмоктування ці речовини потрапляють до печінки, де знешкоджуються внаслідок хімічного зв'язування сульфатною або глюкуроною кислотами з утворенням нетоксичних, так званих «парних сполук», які виділяються із сечею. У печінці знаходяться специфічні ферменти: УДФ-глюкуроніл-трансфераза і арилсульфотрансфераза, що каталізують перенесення залишків глюкуронової або сульфатної кислоти на будь-яку з вищевказаних сполук за участю 3'-фосфаденозин-5'-фосфосульфату (ФАФС) та уридиндифосфоглюкуронової кислоти (УДФГК).

Калієва або натрієва сіль індоксилсульфатної кислоти називається «індиканом». За кількістю утвореного індикану можна робити висновки про інтенсивність процесів гниття в кишечнику, а також про функціональну активність печінки. УДФГК і ФАФС використовуються організмом також і при знешкодженні окремих ліків або продуктів їх метаболізму.

У здорової людини вміст індикану в крові коливається в межах 1,0 – 4,7 мкмоль/л. Кількість його у сечі за добу становить 40 – 80 мкмоль. При надлишку вмісту індикану сеча набуває коричневого кольору. Збільшення вмісту індикану спостерігають при ретенційних азотеміях, порушенні функції кишечника (запори, заворот кишечника, поява великої кількості гнильних бактерій), у післяопераційний період у хворих, які були прооперовані з приводу «гострого живота», при перитонітах.

Декарбоксілювання (втрата карбоксильної групи у вигляді CO_2) амінокислот здійснюється в організмі за участю ферментів декарбоксілаз. Декарбоксілази амінокислот – це складні білки, в яких простетичною групою є піридоксальфосфат (ПФ), як і у трансаміназ. При декарбоксілюванні утворюються аміни (у нормі в дуже невеликих кількостях).

Деякі з них відіграють важливу роль в обміні речовин. При декарбоксілюванні гістидину утворюється гістамін, тирозину – тирамін, 5-гідрокситриптофану – серотонін, глутамінової кислоти – ГАМК, діоксифенілаланіну – дофамін, з якого – норадреналін і адреналін та ін. Біогенні аміни регулюють тонус судин і кишечника, тиск, секрецію. Аміни у великих концентраціях є токсичними, і їх надлишок може призвести до тяжких порушень обміну. Нако-

пиченню біогенних амінів сприяє гіпоксія та деструкція тканин. Накопичення біогенних амінів може негативно впливати на фізіологічні процеси і викликати ряд значних порушень в організмі. Проте організм має спеціальні механізми знешкодження біогенних амінів, які в загальному вигляді зводяться до окиснювального дезамінування (втрата NH_2 -групи) з утворенням відповідних альдегідів та амоніаку. Ферменти, які каталізують ці реакції, отримали назву моноаміно- і діамінооксидаз (MAO і DAO). MAO – флавінаденін-динуклеотидвмісний фермент, що переважно локалізується в мітохондріях та відіграє виключно важливу роль в організмі, регулюючи швидкість біосинтезу і розпаду біогенних амінів. DAO знаходиться в цитоплазмі, її простетичною групою є піридоксальфосфат.

У клініко-біохімічних лабораторіях визначення вмісту деяких біогенних амінів має діагностичне значення. При тяжкому нефросклерозі підвищується вміст у плазмі крові тираміну, у випадку шоку – серотоніну, при деструкції шкіри, м'язів – гістаміну. Процеси декарбоксілювання амінокислот здійснюються і бактеріями в кишечнику при «гнитті» білків, при абсцесуванні тканин. При цьому утворюються сильні токсини (з орнітину – путресцин; з лізину – кадаверин, із триптофану – індол та ін.).

15.3 Експериментальна частина

15.3.1 Кількісне визначення кислотності шлункового соку

Метод ґрунтується на визначенні кислотних речовин шлункового соку при титруванні їх розчином натрію гідроксиду з використанням двох різних індикаторів: *n*-диметиламіноазобензену (зона переходу забарвлення при рН = 2,3- 4,2) та фенолфталеїну (зона переходу забарвлення при рН = 8,2 -10,0). За зміною забарвлення (від червоного до оранжевого) індикатору *n*-диметиламіноазобензену визначається вільна хлоридна кислота, а за переходом забарвлення фенолфталеїну (від безбарвного до рожевого) – загальна кислотність шлункового соку.

У колбу для титрування вносять 5 мл дослідного шлункового соку. Додають 1 – 2 краплі 0,5 % розчину *n*-диметиламіноазобензену в 36 % етанолі і 2 краплі 0,5 % розчину фенолфталеїну в 70 % етанолі і титрують розчином 0,1 моль/л натрію гідроксиду до появи оранжево-червоного забарвлення і відмічають об'єм лугу (у мл), що пішов на титрування вільної хлоридної кислоти (I пункт титрування).

Продовжують титрування до появи лимонно-жовтого забарвлення (II пункт титрування) і знову відмічають об'єм лугу, що пішов від початку титрування до II пункту.

Потім титрування продовжують до появи рожевого забарвлення (III пункт титрування) і відзначають кількість лугу, що пішов на титрування від початку до III пункту.

За одиницю кислотності шлункового соку приймають об'єм розчину 0,1 моль/л натрію гідроксиду (в мл), що пішов на титрування 100 мл шлункового соку. Тому розрахунок кислотності дається на 100 мл.

Наприклад: на титрування 5 мл шлункового соку до I пункту витрачено 1,5 мл розчину 0,1 моль/л натрію гідроксиду, тоді кількість вільної хлоридної кислоти складає:

$$X = \frac{1,5 \cdot 100}{5} = 30 \text{ од.}$$

Для розрахування кількості зв'язаної хлоридної кислоти необхідно знати концентрацію загальної хлоридної кислоти. Останню визначають на підставі даних титрування. Відомо, що кількість лугу, яку необхідно витратити на зв'язування всієї хлоридної кислоти, дорівнює середній арифметичній кількості лугу, що витрачена на титрування до другого і третього пунктів.

Отже, якщо до II пункту титрування витрачено, наприклад, 2 мл, а до III – 3 мл лугу, то середнє арифметичне складає 2,5 мл. Звідси вміст загальної хлоридної кислоти в 100 мл шлункового соку становить;

$$X = \frac{2,5 \cdot 100}{5} = 50 \text{ од.}$$

Зв'язана з білками хлоридна кислота визначається різницею між кількістю загальної і вільної хлоридної кислоти: 50 од.-30 од. = 20 од.

Крім того, III пункт титрування служить для визначення загальної кислотності. Якщо на титрування 5 мл шлункового соку пішло 3 мл розчину 0,1 моль/л натрію гідроксиду, то загальна кислотність дорівнює:

$$X = \frac{3,0 \cdot 100}{5} = 60 \text{ од.}$$

15.3.2 Кількісне визначення активності пепсину шлункового соку за методом Н. П. Пятницького

В основу методу покладено здатність пепсину в шлунковому соку згурджувати білок молока – казеїноген. Згурдження молочно-ацетатної суміші при рН = 4,9 і температурі 25 °С пепсином відбувається строго паралельно його здатності перетравлювати білки. За одиницю активності пепсину приймають ту його кількість, яка при вказаних умовах згурджує 5 мл молочно-ацетатної суміші за 60 с (ця одиниця відповідає 0,010 мг кристалічного пепсину). Шлунковий сік людини в нормі містить в 1 мл 40 – 60 одиниць пепсину.

На дно пробірки за допомогою мікропіпетки вносять 0,1 мл шлункового соку, а в другу пробірку наливають 5 мл молочно-ацетатної суміші. Поміщають обидві пробірки на водяну баню, нагріту до 25°C на 5 хв. Швидко переливають молочно-ацетатну суміш у пробірку з дослідним шлунковим соком і одночасно вмикають секундомір, пробірку струшують. Момент приливання суміші відзначають за секундоміром. Пробірку із сумішшю витримують на водяній бані, нахиляють її і спостерігають за появою на її стінках перших пластівців кальцію казеїнату. У момент їх появи секундомір вимикають і записують час згортання суміші в секундах.

Для розрахунку активності пепсину в 1 мл шлункового соку ділять число 60 на кількість знайдених секунд і таким чином знаходять кількість одиниць

пепсину в 0,1 мл шлункового соку, а помноживши на 10 – в 1 мл. Наприклад: згортання суміші пройшло за 15 с, отже, в 0,1 мл шлункового соку буде 4 одиниці пепсину ($60 : 15 = 4,0$ од.), а в 1 мл соку – 40 одиниць, або 0,4 мг кристалічного пепсину ($40 \cdot 0,01$ мг = 0,4 мг).

15.3.3 Перетравлення білків під дією шлункового соку

У шлунку, під впливом шлункового соку, що містить пепсин і хлоридну кислоту, білки гідролітично розщеплюються до олігопептидів, які можуть бути виявлені за допомогою біуретової реакції. У лужному середовищі і при відсутності пепсину розщеплення білка не відбувається. Дію шлункового соку на білок можна спостерігати на прикладі розщеплення звареного курячого білка.

Беруть три пробірки і в кожену наливають по 1 мл нативного шлункового соку. Потім шлунковий сік у пробірці № 1 кип'ятять для інактивації пепсину і охолоджують холодною водою. У пробірку № 2 додають 3 краплі 10 %-вого розчину натрію гідрокарбонату до слаболужної реакції за лакмусом (нейтралізація). Вміст третьої пробірки залишають без змін. У кожену пробірку поміщають шматочки звареного курячого білка і ставлять у термостат при 38 °С на 30 хв. Після інкубації відкривають продукти гідролізу за допомогою біуретової реакції. Відзначають, в якій з пробірок пройде перетравлення денатурованого білка, і роблять висновки.

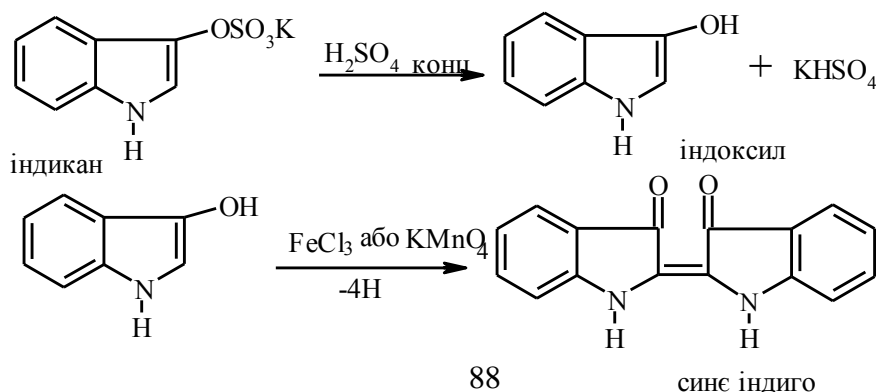
15.3.4 Гідроліз білка під дією трипсину

Беруть три пробірки і наливають в одну з них 2 мл 0,4 % розчину натрію карбонату, у другу – води, у третю – 0,1М розчину хлоридної кислоти. У першу і третю пробірки додають по 1 мл 0,1% розчину трипсину (або панкреатину) і в другу – 1 мл заздалегідь провареного розчину трипсину (або панкреатину). Перемішують проби струшуванням.

У кожену пробірку поміщають по однаковому шматочку звареного курячого яйця і ставлять їх у термостат при 38°С на 10 хв, слідкують за розчиненням білка. Відзначають зміни, що проходять з денатурованим білком у ході інкубації. Потім вміст пробірок зливають в інші пробірки і проводять біуретову реакцію.

15.3.5 Якісні реакції на індикан у сечі

В основу методу покладено реакцію перетворення індикану на індоксил після гідролізу естерного зв'язку в присутності концентрованих кислот з наступним окисненням індоксилу феруму (III) хлоридом або калію перманганатом з утворенням синього індиго:



1. До 4 мл сечі додають 0,4 мл розчину 100 г/л плюмбуму ацетату для осадження жовчних пігментів, солей та інших речовин, що заважають реакції. Фільтрують, 1 – 2 мл фільтрату змішують з рівним об'ємом реактиву, що містить 0,4 г феруму (III) хлориду в 100 мл концентрованої хлоридної кислоти, додають 0,5 – 1 мл хлороформу і обережно перемішують. Нижній шар хлороформу забарвлюється в синій або червоний колір, який не зникає при додаванні розчину 200 г/л натрію тіосульфату.

2. До 20 крапель сечі додають рівний об'єм концентрованої хлоридної кислоти, 1 – 2 краплі 1 %-вого розчину калію перманганату і 2 – 3 краплі хлороформу. Пробірку закривають пробкою і протягом 1 – 2 хв обережно перевертають. У присутності індикану нижній хлороформний шар забарвлюється в блакитний або синій колір.

15.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

1. Що таке повноцінний і неповноцінний білок?
2. Під дією яких ферментів травного тракту і через які проміжні продукти відбувається послідовний розпад білків до амінокислот?
3. Де та в результаті яких перетворень відбувається утворення токсичних продуктів – фенолу, крезолу, індолу, скатолу та інші? Яким чином і де відбувається їх знешкодження в організмі?
4. Написати рівняння реакції переамінування аспарагінової кислоти з пірвіноградною кислотою, декарбоксілювання лізину.
5. У чому біологічне значення синтезу сечовини?
6. Яке значення має синтез білку для організму?
7. Яка роль соляної кислоти при перетравлюванні білків у шлунку?
8. Які умови необхідні для перетравлювання білків у шлунку?
9. Як визначаються загальна кислотність, рівень вільної та зв'язаної хлоридної кислоти в шлунковому соку?

Лабораторна робота № 16 Водорозчинні вітаміни

16.1 Мета: оволодіти методиками якісного визначення водорозчинних вітамінів

16.2 Короткі теоретичні відомості

Вітаміни – 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, вітаміни 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 вітаміни: 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: вітаміни 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.

16.3 Експериментальна частина

16.3.1 Реакції на тіамін (вітамін В₁, антинеуритний)

16.3.1.1 Реакція з діазореактивом

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

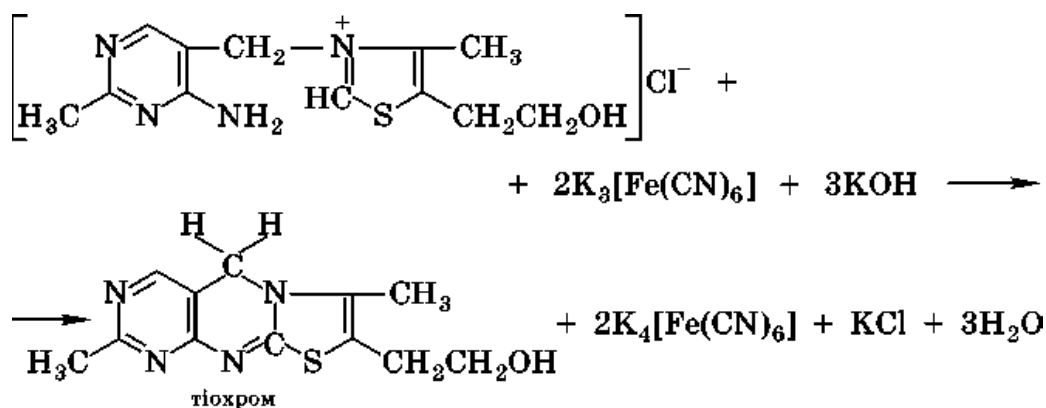
У пробірку вносять 1 мл 1% розчину сульфанілової кислоти і 1 мл 5% розчину натрію нітрату. Утворюється діазореактив. Сюди ж додають невелику

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.

16.3.1.2 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:

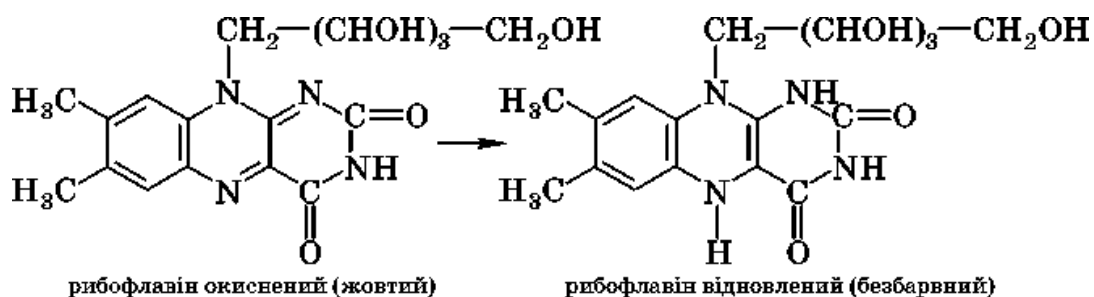


У пробірку вносять 1 мл 5 % розчину вітаміну В₁, додають 2 мл суміші, що складається з 1 мл 1% розчину K₃Fe(CN)₆ та 1мл 30% розчину NaOH, ретельно перемішують і залишають на 3 хвилини. Потім додають 5 мл ізобутилового спирту, інтенсивно струшують протягом 2 хвилин. Ізобутиловий екстракт тіохрому в ультрафіолетових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

16.3.2 Реакція на рибофлавін (вітамін В₂, антисеборейний)

16.3.2.1 Реакція відновлення рибофлавіну

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

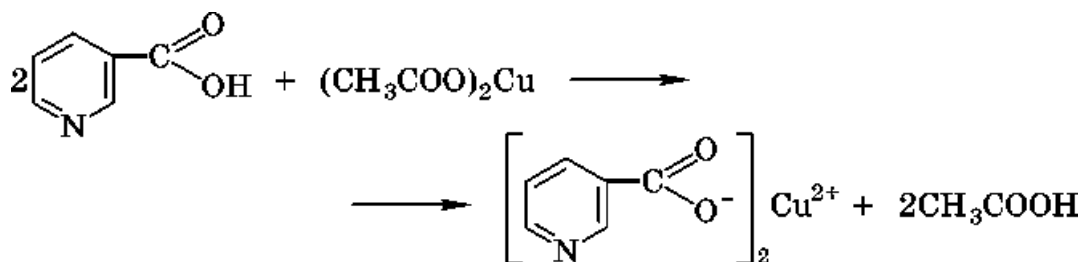


В пробірку наливають 1 мл 0,025% розчину вітаміну В₂ (суспензія рибофлавіну у воді), 0,5 мл концентрованої соляної кислоти та кидають шматочок металічного цинку. Виділяється водень, який вступає в реакцію з рибофлавіном, рідина поступово забарвлюється у рожевий колір, а потім знебарвлюється. Під час збовтування знебарвлений розчин лейкофлавіну знову окиснюється киснем повітря до рибофлавіну.

16.3.3 Реакція на вітамін РР (вітамін В₅, нікотинова кислота, антипелагричний)

16.3.3.1 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.

Якісні реакції на таблетки нікотинової кислоти 0,05 г.

0,5 г порошку розтертих таблеток розчиняють при нагріванні в 10 мл води та фільтрують. До 3 мл теплого фільтрату додають 1 мл 5% розчину купрум (II) ацетату. Зазначте зміни, що відбуваються.

До 5 мл того ж фільтрату додають 0,5 мл 5% розчину купрум (II) сульфату і 2 мл 1% розчину амонію роданіду. З'являється зелене забарвлення розчину.

16.3.3.2 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.

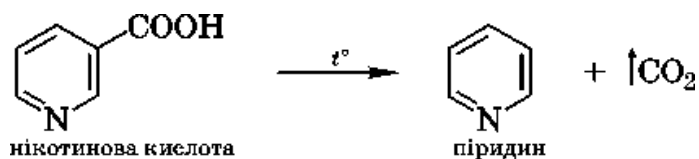
16.3.3.3 Реакція з 2,4-динітрохлорбензолом

Вітамін РР під час нагрівання з 2,4-динітрохлорбензолом у лужному середовищі утворює сполуку червоно-фіолетового кольору. Ця реакція може бути використана для відкриття нікотинової кислоти і її похідних у мочі. Відсутність позитивної реакції на нікотинову кислоту у мочі може вказувати на авітаміноз РР.

В фарфорову чашку наливають 1 мл 0,1% спиртового розчину нікотинової кислоти (або нікотинаміду), розчин випаровують на водяній бані. До сухого залишку додають 1 мл 1% спиртового розчину 2,4-динітрохлорбензолу та інтенсивно перемішують скляною паличкою. Одержаний розчин знову випаровують на водяній бані у витяжній шафі, потім сухий осад нагрівають 10-15 хв, чашу охолоджують до кімнатної температури і додають 5 мл спиртового розчину натрію гідроксиду. Утворюється червоно-фіолетове забарвлення, яке через певний час поступово зникає.

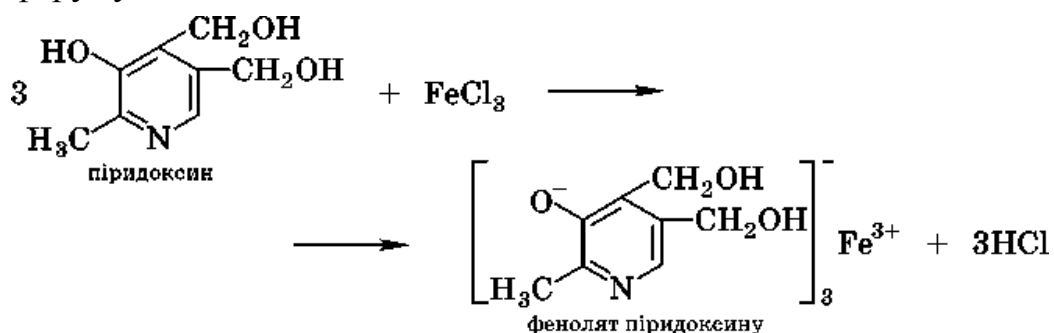
16.3.3.4 Піроліз

При нагріванні в сухому вигляді нікотинової кислоти з натрію карбонатом відбувається декарбоксілювання і утворюється піридин, який має характерний запах:



16.3.4 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.

16.3.5 Реакція на ціанокобаламін (вітамін В₁₂, антианемічний)

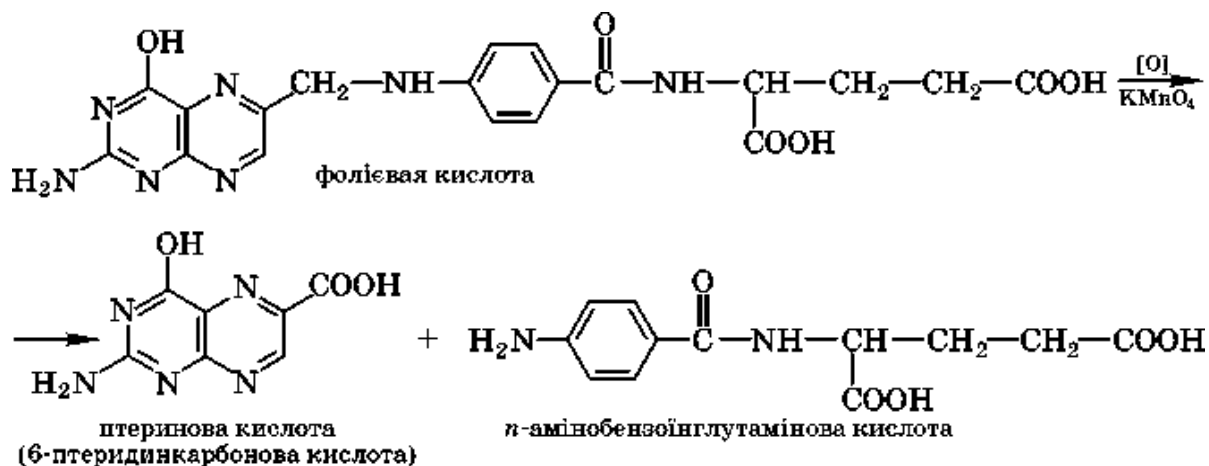
Вітамін В₁₂ розкладається внаслідок його сплавлення з калію гідросульфідом (KHSO₃) або під дією сильного окиснювача. Кобальт, який входить до складу вітаміну, при цьому звільняється. Його виявляють за допомогою α-нітрозо-β-нафтолу, з яким кобальт утворює комплексну сполуку оранжево-червоного кольору.

Половину ампули розчину вітаміну В₁₂ вносять у фарфоровий тигель, випаровують досуха при нагріванні на вогні. Після охолодження доливають 1 мл концентрованої нітратної кислоти та 3 мл концентрованої хлоридної кислоти. Суміш кип'ятять у витяжній шафі до повного випаровування рідини й охолоджують. Осад розчиняють у краплині дистильованої води, додають краплину 1% ацетонового розчину α-нітрозо-β-нафтолу та по краплях 10% розчин натрій гідрофосфату (Na₂HPO₄) до появи слабколужної реакції (за лакмусом). При наявності йонів Со²⁺ з'являється червоно-буре забарвлення. Якщо йонів Со немає, розчин має жовто-зелений колір.

16.3.6 Виділення фолієвої кислоти (вітамін В₉) з дріжджів та її виявлення.

Фолієва кислота добре розчинна в розчині 0,1 моль/л натрію гідроксиду. При екстрагуванні фолієвої кислоти з дріжджів в присутності окисників і ультрафіолетовому опромінюванні спостерігається інтенсивно блакитна

флуоресценція. Фолієва кислота окиснюється калію перманганатом з утворенням птеринової кислоти, яка і обумовлює флуоресценцію:



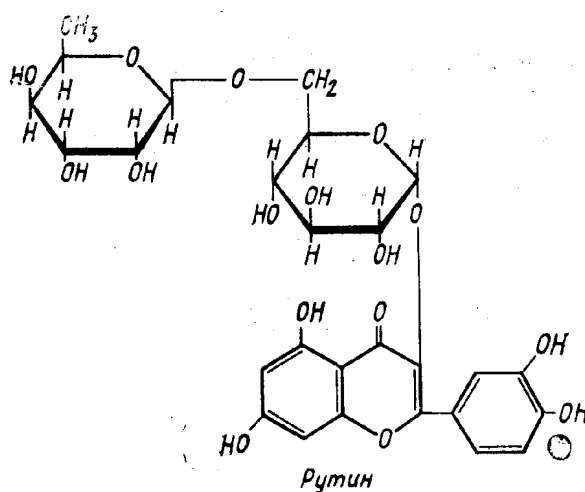
В ступці розтирають 10 г дріжджів з 10 мл 0,1 М NaOH, 2 г кварцевого піску протягом 5 хв, потім центрифугують 15 хв за 800 г.

До 10 краплин надосадової рідини додають 20 краплин концентрованої оцтової кислоти (рН 3,0) і 10 краплин 0,4% розчину KMnO_4 так, щоб рожеве забарвлення не зникало протягом 10 хв (якщо забарвлення зникає, слід додати ще декілька крапель KMnO_4). Через 10 хв надлишок калію перманганату видаляють чотирма-п'ятьма краплинами 3% розчину H_2O_2 , а потім додають 4-5 мл 0,005 М розчину NaOH до рН 4,0-5,0 (за наявності універсального індикатора).

Під час ультрафіолетового опромінення фолієвої кислоти у лужному розчині з'являється інтенсивна блакитна флуоресценція.

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

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



16.3.7.1 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.

16.3.7.2 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.

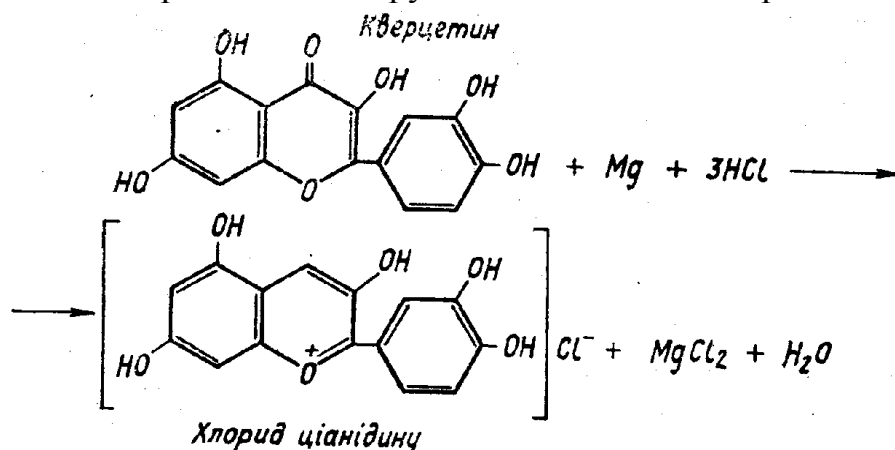
До 2 мл насиченого водного розчину рутину обережно по стінці пробірки доливають 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. На межі розділення двох рідин виникає кільце жовтого кольору.

16.3.7.3 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 свіжевикотовленого реактиву Фелінга й знову нагрівають до кипіння. Спостерігають утворення осаду купрум геміоксиду червоного кольору.

16.3.7.4 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 краплі концентрованої хлоридної кислоти. Рідина спочатку забарвлюється в рожевий колір, який з часом змінюється на малиновий або фіолетово-червоний.

16.3.7.5 Кількісне визначення вітаміну Р у чаї за методом Левенталя

Метод ґрунтується на здатності рутину окиснюватися калію перманганатом. Індикатором є індігокармін, який вступає в реакцію з KMnO_4 після того, як окислиться весь рутин. Встановлено, що 1 мл 0,02 М розчину KMnO_4 окиснює 6,4 мкг рутину.

Чай (100 мг) заливають 50 мл гарячої дистильованої води й кип'ятять протягом 5 хв. Одержаний екстракт охолоджують, відбирають 10 мл і переносять у колбу або склянку, куди наливають ще 10 мл дистильованої води та 5 крапель індігокарміну. З'являється синє забарвлення. У контрольну колбу замість екстракту чаю вносять 10 мл дистильованої води. Рідину в колбах

титрують 0,01 М розчином KMnO_4 , інтенсивно помішуючи, до появи стійкого жовтого забарвлення. Різниця кількості розчину KMnO_4 , витраченого на титрування дослідної та контрольної проб, - це об'єм 0,01 М розчину KMnO_4 , який потрібний для окиснення рутину.

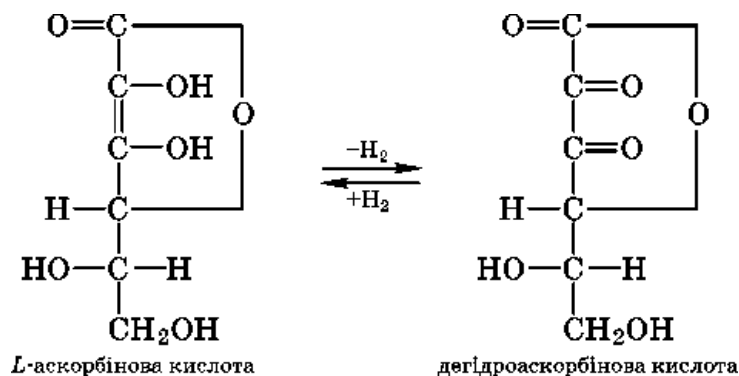
Для підрахунку вмісту вітаміну Р (у мкг) використовують формулу:

$$x = AV_1k/V_2P,$$

де k – стандартний коефіцієнт титрування (3,2 – кількість рутину, що відповідає 1 мл 0,05 н калій перманганату, мкг); A – кількість 0,01 М розчину KMnO_4 , використана для титрування, мл; V_1 – об'єм, у якому розчинена проба для аналізу, мл; V_2 – об'єм розчину, взятого для титрування, мл; P – кількість сухої речовини, г, взятої для аналізу.

16.3.8 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 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ – до $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, який з йонами III валентного заліза утворює сіль $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ синього або зеленого кольору:



16.3.8.1 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.

16.3.8.2 Реакція з метиленовим синім

У дві пробірки вносять по крапліні 0,01% розчину метиленового синього та по крапліні 10% розчину натрію бікарбонату (Na_2CO_3). У першу пробірку додають 5 крапель 0,1% розчину аскорбінової кислоти, в другу – 5 крапель води й залишають у термостаті (t 37- 40 $^{\circ}\text{C}$). Через деякий час у пробірці з розчином аскорбінової кислоти рідина знебарвлюється.

16.3.8.3 Реакція з калію гексаціаноферратом (III)

Аскорбінова кислота може легко вступати в окисно-відновні реакції й відновлювати $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ до $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, який з йонами III валентного феруму утворює сіль $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ синього або зеленого кольору.

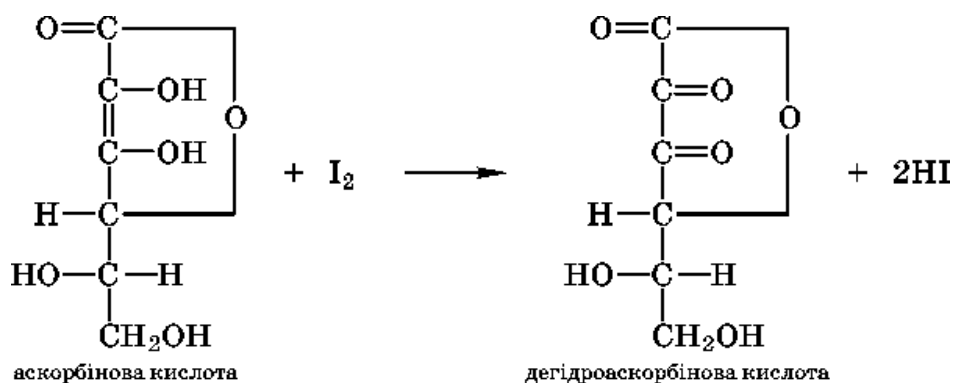
До 1 мл 0,1 % розчину аскорбінової кислоти додають 1 мл 1% розчину $K_3Fe(CN)_6$ і 0,5 мл 1 % розчину $FeCl_3$. Спостерігають утворення синьо-зеленого забарвлення. Напишіть рівняння реакцій.

16.3.8.4 Реакція з аргентуму нітратом

До 2 мл 0,1% розчину аскорбінової кислоти додають 0,5 мл 1% розчину аргентуму нітрату; випадає темний осад. Напишіть рівняння реакції.

16.3.8.5 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:



16.3.8.6 Кількісне визначення вітаміну С за методом Тильманса

Метод ґрунтується на здатності аскорбінової кислоти окиснюватися 2,6-дихлорофеноліндофенолом до дегідроаскорбінової кислоти. За кількістю 2,6-дихлорофеноліндофенолу, витраченого на титрування, визначають кількість аскорбінової кислоти в досліджуваному матеріалі. Коли весь вітамін С окислиться, розчин, що титрується, набуває рожевого кольору за рахунок утворення недисоціюючих молекул 2,6-дихлорофеноліндофенолу (в кислому середовищі). У лужному середовищі 2,6-дихлорофеноліндофенол має синє забарвлення, в кислому – червоне, а після відновлення знебарвлюється.

У фарфоровій ступці 1 г харчового продукту (капуста, шипшина, картопля, хвоя) ретельно розтирають із кварцевим піском. До розтертої маси додають 9 мл 2% розчину хлоридної кислоти, відстоюють і через 10 хв фільтрують. Для кількісного визначення беруть 3 мл фільтрату, вносять у колбу та титрують 0,0005 М розчином 2,6-дихлорофеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення, яке зберігається протягом 30 с.

Зазначимо, що 1 мл 0,0005 М розчину 2,6-дихлорофеноліндофенолу відповідає 0,088 мг аскорбінової кислоти.

Масову концентрацію аскорбінової кислоти, мг, розраховують за формулою:

$$C = QAV_0/V_1\alpha,$$

де Q – кількість аскорбінової кислоти (0,088мг), якій відповідає 1 мл 0,0005 М розчину 2,6-дихлорофеноліндофенолу; A – кількість 0,0005 М розчину 2,6-дихлорофеноліндофенолу, витрачена на титрування, мл; V_0 –

загальна кількість екстракту, мл; V_1 – об'єм екстракту, взятого для титрування, мл; α – наважка харчового продукту, г.

16.3.8.7 Кількісне визначення аскорбінової кислоти за допомогою калію гексаціаноферрату (III)

Аскорбінова кислота за рахунок наявності у молекулі двох енольних груп легко окиснюється і переходить в дегідроаскорбінову кислоту. У кислому середовищі аскорбінова кислота стехіометрично відновлює калій гексаціаноферрат (III) до калій гексаціаноферрату (II), який за присутності йонів трьохвалентного заліза утворює $KFe [Fe (CN)_6]$ (берлінську блакить). Якщо при цьому у середовищі присутні йони фтору, то берлінська блакить не випадає в осад, а утворюється розчин синього кольору, оптичну густину якого можна виміряти за допомогою фотоелектроколориметру.

Подрібнену наважку рослинного матеріалу (цедра лимону) 10-20 г розтирають у фарфоровій ступці з кварцовим піском у невеликому об'ємі буфера (рН = 3,69: 0,1н HCl змішують із 0,1М натрій цитратом у співвідношенні 1:1 до однорідної кашки). Суміш кількісно переносять у мірну колбу на 100 мл. Ступку і пестик обмивають невеликою порцією буферного розчину і зливають у мірну колбу та доводять об'єм буфером до 100 мл. Вміст мірної колби добре перемішують і через 5-10 хвилин фільтрують через складчастий фільтр або центрифугують 10-15 хв при 3000г. 20 мл фільтрату відбирають і переносять у мірну колбу на 100 мл та додають 1 мл 1%-вого розчину калій гексаціаноферрату (III), 1 мл 2 % калій фториду. Суміш струшують і додають дистильованої води 80-90 мл, після чого приливають 2 мл 2 % розчину ферум (III) хлориду і доводять об'єм розчину в колбі дистильованою водою до мітки. Розчин витримують 5 хв., струшуючи його час від часу, а потім визначають оптичну густину, використовуючи кювету 1 см. Вміст аскорбінової кислоти розраховують за калібрувальним графіком.

Приготування стандартних розчинів і побудування калібрувального графіка. Для приготування стандартного розчину у мірну колбу на 100 мл приливають 20 мл буферу, 1 мл 1%-вого розчину калію гексаціаноферрату (III), 1 мл 2%-вого розчину натрій фториду, 2 мл 2%-вого розчину ферум (III) хлориду і доводять об'єм розчину в колбі до 100 мл дистильованою водою.

Для побудування калібрувального графіка готують серію розчинів з концентрацією від 2 до 12 мкг/мл. Для цього у мірні колби на 100 мл добавляють по 1,2,3 ...6 мл 0,02%-вого розчину аскорбінової кислоти, усі компоненти стандартного розчину і доводять водою до 100 мл. Через 5 хв вимірюють оптичну густину розчинів і за отриманими результатами будують калібрувальний графік. Розраховують вміст аскорбінової кислоти у рослинному матеріалі за формулою:

$$C = K \cdot V / m \cdot 10$$

K – визначена маса аскорбінової кислоти за калібрувальним графіком в 1 мл розчину, що аналізується мкг/мл.;

V - розбавлення;

m - наважка рослинної сировини, г;

C – вміст аскорбінової кислоти, мг на 100 г рослинної сировини.

16.3.8.8 Кількісне визначення вітаміну C 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 дегідроаскорбінову кислоту.

Підготувати екстракт з харчових продуктів для виявлення вітаміна C. 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 HCl. 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 вітаміна C в продукті використати формулу визначення маси:

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

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 вітаміна C в 100 г продукта (*X*) використати формулу:

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

16.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

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

Лабораторна робота № 17

Жиророзчинні вітаміни

17.1 Мета: оволодіти методиками якісного визначення жиророзчинних вітамінів

17.3 Експериментальна частина

17.3.1 Якісні реакції на вітамін А (ретинол, антиксерофтальмічний)

17.3.1.1 Реакція з стибій трихлороцтовим

Хлороформний розчин вітаміну А або риб'ячого жиру з *стибій трихлороцтовим* забарвлюється в специфічний синій колір.

В суху пробірку до 1-2 краплин 0,05% масляного розчину вітаміну А в хлороформі або розчину риб'ячого жиру в хлороформі в співвідношенні 1:5 додають 4-5 краплин 33% хлороформного розчину *стибій трихлороцтового* й перемішують. З'являється інтенсивне синє забарвлення.

17.3.1.1 Реакція Друммонда

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

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

17.3.1.1 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.

17.3.2 Кількісне визначення вітаміну А в риб'ячому жирі

В основу методу покладено колориметричне визначення інтенсивності забарвлення, яке утворюється в реакції вітаміну А з стибій трихлороцтовим за наявності оцтового ангідриду.

В пробірку до 0,4 мл хлороформного розчину риб'ячого жиру (2,5 мл риб'ячого жиру розчиняють у 25 мл хлороформу) додають 1-2 краплі оцтового ангідриду, щоб запобігти появі каламуті в розчині, і 4 мл розчину стибій трихлороцтового. Через 10 хв суміш фотометрують за λ 620 нм (червоний фільтр), використовуючи розчин стибій трихлороцтового.

Концентрацію вітаміну А в риб'ячому жирі визначають за калібрувальним графіком, де кожному значенню знайденої екстинкції відповідає вміст вітаміну А в 0,4 мл розчину.

Для побудови калібрувального графіка використовують стандартний концентрат вітаміну А в риб'ячому жирі. Якщо вміст вітаміну А і 1 мл концен-

трату становить 500 одиниць, то для приготування початкового розчину 10 мл рибачого жиру розчиняють у 50 мл хлороформу. В 1 мл такого розчину міститься 100 одиниць вітаміну А. Із цього розрахунку готують ще 5-6 розведень із таким розрахунком, щоб у 0,4 мл одержаних розчинів містилось від 20 до 70 одиниць вітаміну А. Цю кількість (0,4 мл) стандартних розчинів обробляють трихлористою сурмою й визначають їх оптичну густина.

Одержані значення оптичної густини використовують для побудови калібрувального графіка. Залежність оптичної густини розчину вітаміну А від його концентрації є лінійною. Вміст вітаміну А в 1 мл рибачого жиру розраховують за формулою: $C = \alpha V/Q$,

де С – вміст вітаміну А в 1 мл рибачого жиру;

α – кількість вітаміну А в 1 мл досліджуваного розчину (для одержання цієї величини необхідно знайдену за графіком кількість вітаміну А в 0,4 мл розчину розділити на 0,4);

V – загальний об'єм дослідного хлороформного розчину рибачого жиру, мл;

Q – взята в пробі кількість рибачого жиру, мл.

17.3.3 Якісні реакції на вітамін D (кальциферол, антирахітичний)

17.3.3.1 Реакція з стибій (V) хлоридом

У суху пробірку до 2 мл розчину вітаміну D у хлороформі доливають 0,2 мл насиченого розчину $SbCl_5$. Спостерігають появу жовтого забарвлення.

Вітамін D у хлороформному розчині з насиченим розчином *стибій (V) хлориду* утворює жовте забарвлення.

17.3.3.2 Реакція з аніліном

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

У суху пробірку вносять 1-2 краплі рибачого 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 забарвлення змінюється на червоне. Через 1-2 хв емульсія розділяється на два шари. Нижній шар забарвлений у інтенсивно червоний колір.

17.3.3.3 Реакція з бромом

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

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

17.3.4 Реакції на вітамін K (нафтохінон, антигеморагічний)

17.3.4.1 Реакція з диетилдитіокарбонатом

Спиртовий розчин вітаміну K за наявності диетилдитіокарбонату в лужному середовищі утворює сполуку, яка забарвлена в блакитний колір.

У пробірку до 2 мл 0,05% спиртового розчину вікасола додають 2 мл 5% розчину диетилдитіокарбонату та 0,5 мл 4% спиртового розчину NaOH. Розчин забарвлюється в блакитний колір.

17.3.4.2 Реакція з аніліном

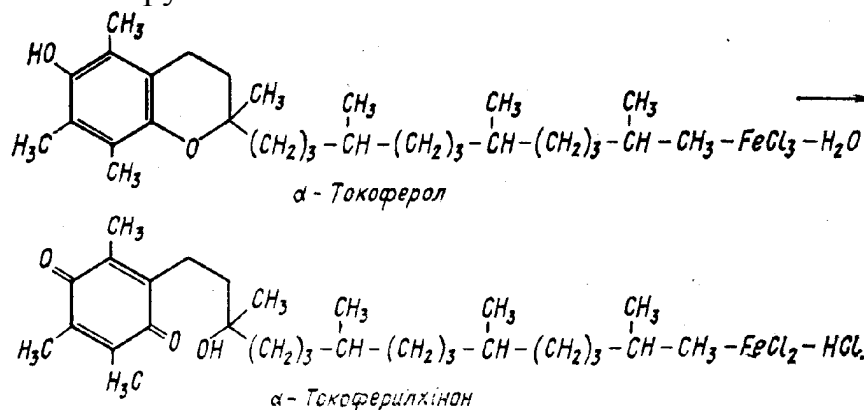
За наявності аніліну спиртовий розчин вітаміну К забарвлюється в червоний колір, що зумовлено утворенням 1-метил-2-фениламінонафтохінолу.

У пробірку з 1мл 0,05% спиртового розчину вікасола додають 2 краплі аніліну. Після перемішування вміст пробірки забарвлюється в червоний колір.

18.3.5 Якісні реакції на вітамін Є (токоферол)

18.3.5.1 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.

17.3.5.1 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.

17.3.6 Кількісне визначення вітаміну Є

Під час взаємодії розчину α -токоферолу з концентрованою нітратною кислотою суміш забарвлюється в червоний колір, інтенсивність якого пропорційна концентрації вітаміну Є й може бути визначена за допомогою фотоелектроколориметра.

В дві пробірки наливають по 2,5 мл 0,1% спиртового розчину α -токоферолу, додають 0,5 мл 70% розчину нітратної кислоти й ставлять на киплячу водяну баню на 3 хв. Потім пробірки охолоджують і залишають у темному місці на 15 хв. Об'єм рідини у кожній пробірці доводять абсолютним спиртом до 5 мл, перемішують і фотометрують за λ 470 нм (синій світлофільтр).

Концентрацію α -токоферолу в дослідному розчині визначають за калібрувальним графіком, де кожному значенню знайденої екстинкції відповідає певний вміст вітаміну Є в 1 мл розчину.

Для побудови калібрувального графіка використовують спиртовий розчин, який містить в 1 мл 100 мг α -токоферолу. З цією метою 0,5 мл такого препарату розчинюють абсолютним спиртом у колбі об'ємом 50 мл (у 1 мл міститься 1 мг препарату). У чотири пробірки наливають по 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 мл цього розчину й доводять загальний об'єм рідини абсолютним етанолом до 2,5 мл в кожній пробірці.

За значенням оптичної густини розчинів, які мають різну кількість α -токоферолу, будують калібрувальний графік. На осі ординат відкладають екстинкції; на осі абсцис – відповідні концентрації вітаміну Є в 1 мл.

17.4 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.

Лабораторна робота № 18 Гормони

18.1 Мета: оволодіти методиками якісного визначення гормонів

18.2 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.

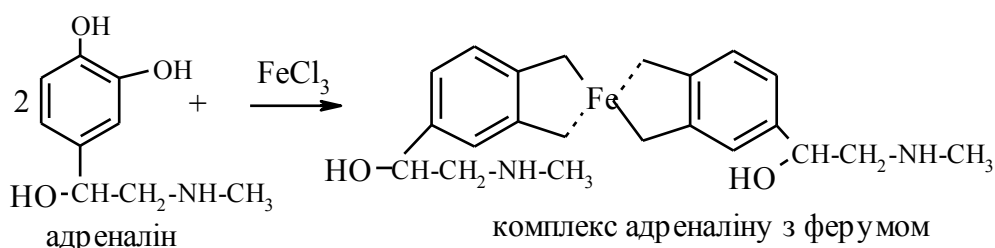
18.3 Експериментальна частина

18.3.1 Якісні реакції на адреналін та норадреналін

18.3.1.1 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:

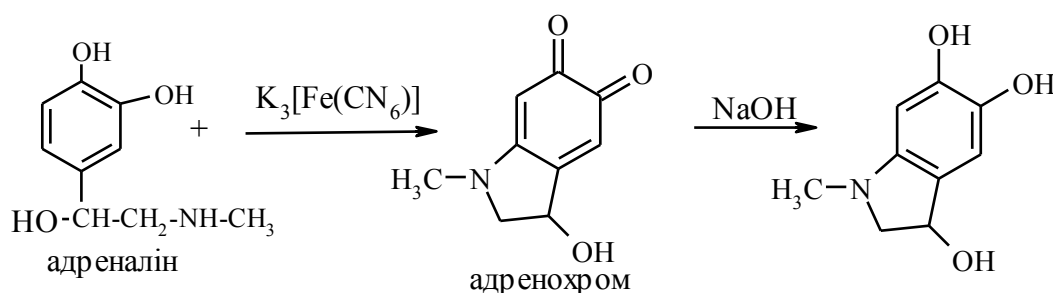


У пробірку приливають 10 крапель 0,1 %-вого розчину адреналіну з ампули та додають 1 краплю розчину 0,15 моль/л феруму (III) хлориду. Спостерігають появу характерного забарвлення.

18.3.1.3 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.



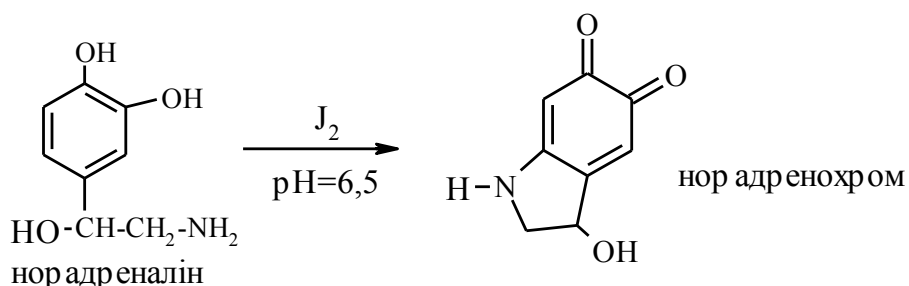
У дві інші пробірки відмірюють по 4 мл розведених розчинів адреналіну, приливають по 0,3 мл 0,2 %-вого розчину калію гексаціаноферату (III) та залишають на 5 хв (при цьому адреналін окиснюється в адренохром).

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.

18.3.1.4 Ідентифікація адреналіну та норадреналіну

Для ідентифікації цих сполук рекомендують проводити окиснення розчином йоду при рН = 3,6 та 6,5. Адренохром 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 адренохром, 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.

18.3.2 Якісні реакції на гормони коркової частини надниркових залоз

18.3.2.1 Реакція з концентрованою сульфатною кислотою

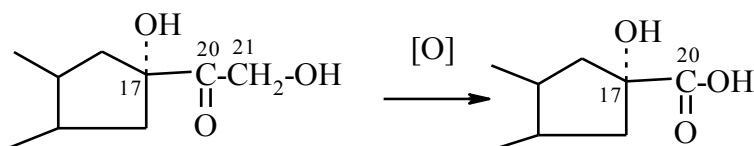
Концентрована сульфатна кислота є загальним внутрішньогруповим специфічним реактивом, який підтверджує наявність стероїдного циклу. У результаті зазначеної реакції кортизон дає жовте забарвлення із зеленою флуоресценцією, дезоксикортикостерон – вишневе забарвлення із зеленувато-коричневою флуоресценцією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

18.3.2.2 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).

18.3.3 Якісні реакції на статеві гормони та їх метаболіти.

18.3.3.1 Реакція на прогестерон з концентрованою сульфатною кислотою.

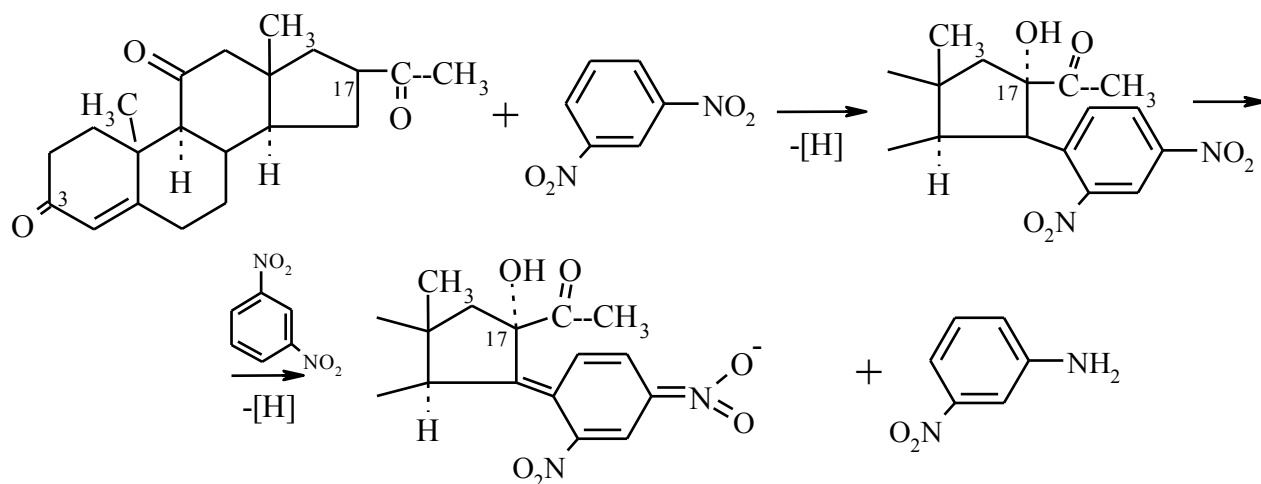
При взаємодії прогестерону із сульфатною кислотою утворюється сполука, що має жовте забарвлення із зеленою флуоресценцією.

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.

18.3.3.2 Реакція прогестерону з *m*-динітробенzenом.

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



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

18.3.3.3 Реакція на тестостерон пропіонат з концентрованою сульфатною кислотою.

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

18.4 Питання для самоконтролю (домашнє завдання)

Контрольні питання.

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 № 19

Біохімія м'язів

19.1 Мета: навчитись виділяти та розпізнавати за допомогою якісних реакцій білкові та небілкові речовини м'язової тканини.

19.2 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.

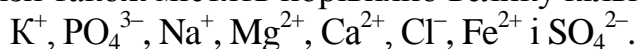
До структурних білків у першу чергу відносяться **міозин** – скорочувальний білок м'язових фібрил, який володіє ферментативними властивостями аденозинтрифосфатази і каналізує реакцію розщеплення АТФ на АДФ і неорганічний фосфат. Інші структурні білки – **актин** і **міостромін** – представляють основу 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 **хромопротейд** 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.

19.3 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 жезела, 3% розчин молібденовокислого амонію $(NH_4)_2MoO_4$, концентрована HNO_3 , 1% розчин $BaCl_2$, 1 M розчин $NaOH$ і 1 мл 0,05 M розчину $CuSO_4$.

19.3.1 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 .

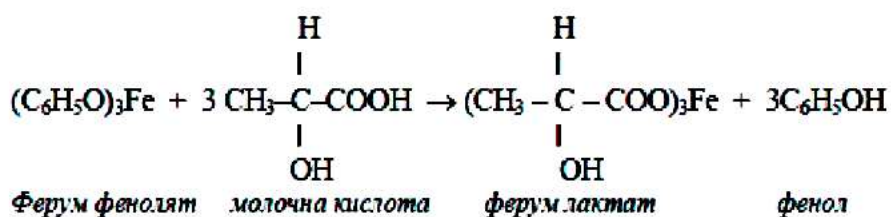
Готують водний екстракт м'язів – м'язи розтирають з скляним піском, переносять в стаканчик, заливають 30 мл води і настоюють 15 хв, час від часу помішуючи скляною паличкою. Потім рідину фільтрують через 3 шари марлі в чисту колбочку. Залишок тканини в стаканчику знову заливають 30 мл води, настоюють, 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 водній 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.

19.3.2 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:

$$C_x = \frac{C_{ст} \cdot E_x}{E_{ст}} \cdot d$$

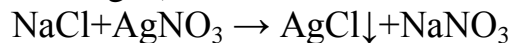
C_d - вміст молочної кислоти в дослідній пробі, (мг%); $C_{ст}$ - вміст молочної кислоти у стандартній пробі (мг%); E_d - екстинкція дослідної проби; $E_{ст}$ - екстинкція стандартної проби.

Провести розрахунки та записати висновок

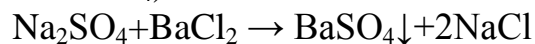
19.3.3 Відкриття мінеральних іонів

Відкриття мінеральних іонів 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 $(NH_4)_2 MoO_4$, 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 добавляють декілька краплин 1%-ного розчину $BaCl_2$. Випадає білий осад.

Результати та реакції досліду і його пояснення записують в протокол.

19.3.4 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.

19.3.5 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.

19.3.6 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 відмиту 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.

19.3.7 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 водній 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.

Висновок: за допомогою якісних реакцій визначили у м'язовій тканині ...; виділили основні білки м'язів –....., користуючись їх різною розчинністю у воді.

Контрольні питання

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 № 20

Дослідження біохімічних властивостей сечі

20.1 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.

20.2 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 слабкокисло. 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.

20.3 Експериментальна частина.

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 молибденовокислого 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.

20.3.1 Визначення фізичних показників сечі

20.3.1.1 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.

20.3.1.2 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 урочетричному 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 урочетра визначають густину розчину. Якщо вона дорівнює 1,006, то істинна густина сечі, взятої для дослідження, рівна 1,012.

20.3.2 Визначення хімічних показників сечі.

20.3.2.1 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 дослідження записують в протокол.

20.3.2.2 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.

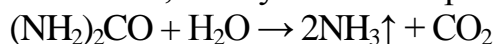
20.3.2.3 Відкриття креатиніну.

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 дослідження і рівняння реакції записують в протокол.

20.3.2.4 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 дослідження і рівняння реакції записують в протокол.

20.3.2.5 Відкриття хлоридів в сечі.

У пробірку наливають 2 см³ сечі, додають 1-2 краплини 5% HNO₃, і 1-2

краплини 5% розчину AgNO_3 . Випадає білий осад.

Результати досліду і рівняння реакції записують в протокол.

20.3.2.6 Відкриття фосфатів в сечі.

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

20.3.2.7 Відкриття йонів кальцію в сечі.

У пробірку наливають 2 см^3 сечі і додають 4 краплини насиченого розчину щавлевокислого амонію. Відразу ж випадає осад щавлевокислого кальцію.

Результати досліду і рівняння реакції записують в протокол.

20.3.2.8 Відкриття білку в сечі.

Проба з сульфосаліциловою кислотою.

До $3-4 \text{ см}^3$ 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 $1-1,5 \text{ см}^3$ концентрованої HNO_3 . 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 см^3 води. Потім в 1-у пробірку доливають 2 см^3 профільтрованої сечі. Вміст пробірки перемішують і 2 см^3 розведеної сечі з цієї пробірки переносять в наступну пробірку і т.д. Із 5-ої пробірки (після перенесення в неї 2 см^3 з 4-ої і перемішування) 2 см^3 виливають геть. Таким чином одержують сечу, розведену в 2, 4, 8, 16, 32 рази.

В кожную пробірку 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.

20.3.2.9 Відкриття і визначення вмісту глюкози в сечі.

Виявлення глюкози в сечі.

У пробірку 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 пробірку наливають 5 см³ реактиву Бенедикта, додають точно 8 краплин 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.

20.3.2.10 Відкриття кетонів в сечі.

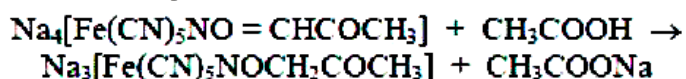
Ацетон і ацетооцтова кислота (кетонів тіла) з нітропрусидом натрію в лужному середовищі утворюють продукти реакції, забарвлені в червоний колір.

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 Легалья).

У пробірку 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 пробірку додати 1 мл концентрованої ацетатної кислоти та спостерігати за зміною забарвлення.



Результат досліду і висновки записують в протокол.

Реакція з хлоридом заліза.

У пробірку наливають 2 см³ дистильованої сечі і додають по краплинах 10% розчину FeCl₃, до припинення утворення осаду фосфатів. Осад

відфільтровують, до фільтрату додають ще декілька краплин FeCl_3 , і спостерігають за появою вишневого забарвлення. Результати дослідів і висновки записують в протокол.

Висновок: за допомогою якісних реакцій визначили фізичні показники сечі: колір – ...; запах – ...; наявність осаду – ...; густина... а також хімічні показники сечі: рН –...; наявність білку –...; наявність глюкози – ...; наявність кетонів – ...

Контрольні питання

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 кетонів.
 17. За яких умов вміст ацетону і ацетоацетатної кислоти в рідинах організму зростає?
 18. Записати будову ацетоацетатної кислоти
- Вказати головні ознаки цукрового діабету

Лабораторна робота № 21

Біохімічне дослідження крові

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

21.2 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.

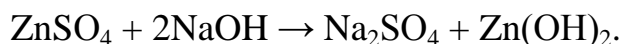
Оскільки швидкість і ступінь мобілізації вуглеводів і ліпідів, інтенсивність гліколізу і швидкість заміни його аеробним окисненням при м'язовій діяльності, як і швидкість процесу біохімічної реституції в період відпочинку, залежать від ступеня тренування спортсмена, дослідження змін вмісту цукру, жирних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

21.3 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.

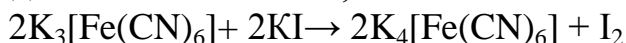
21.3.1 Визначення вмісту цукру в крові по Хагедорну і Іенсену

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

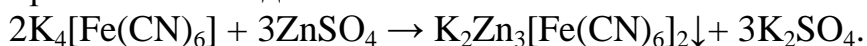


Безбілковий фільтрат нагрівають з калій гексаціанофератом (III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), який при взаємодії з глюкозою відновлюється до $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

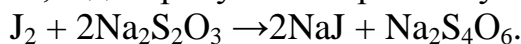
Калій гексаціаноферат (III) береться у надлишку, його залишок відтитрують йодометрично. При взаємодії з калій йодидом $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ у $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, а йод виділяється в кількості, еквівалентній кількості $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$:



Ця реакція оборотна, тому її ведуть у присутності ZnSO_4 , який утворює з $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ нерозчинний осад:



Йод, який виділився, відтитрують натрій тіосульфатом:



За кількістю виділеного йоду визначають кількість $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, який залишився, визначають, скільки $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ пішло на окислення глюкози, а отже, і її вміст.

Техніка виконання аналізу. У 2 пробірки наливають по 1 см^3 0,1 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 г $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 10,6 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 16.1. 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 досліду 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 досліду 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 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

Висновок: вміст цукру у дослідженій пробі крові становить...Норма складає...

Контрольні питання

1. Що таке плазма і сироватка крові?
2. В яких межах може коливатися рН крові здорової людини?
3. Коли рівень цукру в крові вище – натщесерце або через 2 години після сніданку і чому?
4. Чи однаково буде змінюватися він при виконанні тривалих фізичних навантажень натщесерце або після сніданку?

ДОДАТОК А

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 1 об'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 закрити 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 А.1 об'єм 1 моль/л HCl і доводять водою до 1000 мл.

Таблиця А.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 феруму (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 А.2.

Таблиця А.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.

ДОДАТОК Б

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 нахилившись до посудини і не вдихаючи на повні груди;
- категорично забороняється затягувати 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 зазирати 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 пахнучі 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.

Рекомендована література

1. Губський В.В. Біологічна хімія. – К. :КНУХТ, 2000. – 349 с.
2. Біохімія: Підручник / М.Є.Кучеренко та ін. - Київ: Либідь, 1995.- 464 с.
3. Босчко Ф.Ф. Біологічна хімія. - Київ: Вища школа, 1995. - 536 с.
4. Скарбовійчук О. М., Кочубей-Литвиненко О. В., Чернюшок О. А., Федоров В. Г. Хімічний склад і фізичні характеристики молочних продуктів: довідник: навч. посіб. К.: НУХТ, 2012. 311 с.
5. Лисиця А.В. Біологічна хімія. Практикум. – Суми.: Університетська книга, 2009. – 240 с..
6. Черевко О. І., Крайнюк Л. М., Касілова Л. О. і др. Методи контролю якості харчової продукції. Навчальний посібник. Харків: ХДУХТ. 2018. 230 с.
7. Левандовський Л. В. та інші Біологічна хімія: підруч. К.: НУХТ, 2012. 363 с.
8. Павлоцька Л. Ф. Біологічна хімія. Практикум. Суми.: Університетська книга, 2011. 63 с.
9. Павлоцька Л. Ф. та інші Біологічна хімія. Суми.: Університетська книга, 2011. 510 с.
- 10.Ленинджер А. Биохимия. - М.: Мир, 1976, -957с.
11. Страйер Л. Биохимия. - М.: Мир, 1985,-398с..
12. Уайт А. Основы биохимии. - М.: Мир, 1981,-535с.