

**НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ «ЧЕРНІГІВСЬКИЙ КОЛЕГІУМ»
імені Т.Г. ШЕВЧЕНКА**

кафедра хімії, технологій та фармації

МЕТОДИЧНІ ВКАЗІВКИ

до виконання лабораторних робіт з курсу

«Біохімія харчування і здоров'я людини»

для студентів спеціальності 181 Харчові технології

ОПП Харчові технології оздоровчих продуктів

Чернігів 2024

УДК 577.176

Укладачі: кандидат технічних наук, доцент Савченко Олеся Миколаївна,
доктор технічних наук, професор Сиза Ольга Іллівна
доктор філософії, доцент Лапицька Н.В.

Савченко О.М., Сиза О.І., Лапицька Н.В.

Біохімія харчування і здоров'я людини Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт з курсу “***Біохімія харчування і здоров'я людини***” для студентів спеціальності 181 Харчові технології / Укладачі: О.М. Савченко, О.І. Сиза, к.т.н., Н.В. Лапицька, 2024. 68 с.

Затверджено на засіданні кафедри хімії, технологій та фармації:
протокол № 1 від 26 серпня 2024 року

Біохімія харчування і здоров'я людини є нормативною навчальною дисципліною. Вивчення цієї дисципліни дає майбутнім спеціалістам можливість розуміти та кваліфіковано керувати технологічним процесом, науково його обґрунтовувати та вдосконалювати з метою отримання високоякісних оздоровчих 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 студенти вивчають запропонований теоретичний матеріал, опрацьовують методичні вказівки до роботи та отримують у викладача дозвіл на її виконання. Після обробки результатів студенти готують звіт.

© О.М.Савченко, 2024

© О.І. Сиза, 2024

© Н.В.Лапицька, 2024

Лабораторна робота № 1

Якісні 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

Білки- незамінні компоненти раціону, без яких неможливе життя, ріст і розвиток організму. З білками пов'язані основні прояви життя: обмін речовин, скорочення м'язів та рух, подразливість нервів, здатність до росту, розмноження та мислення.

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

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

Хронічна нестача білків призводить до різноманітних захворювань, зменшуючи тим самим середню тривалість життя.

Дефіцит білків у дитячому організмі призводить до пластичних, гормональних, імунних та ферментативних розладів, а саме:

- ◆ затримується ріст;
- ◆ гальмується кістко утворення;
- ◆ порушується фізичний та психічний розвиток;
- ◆ порушуються процеси травлення, кровотворення.

Тривалий **надлишок** надходження білка до організму, що розвивається, призводить до:

- ◆ прискореного окостеніння епіфізів кісток;
- ◆ затримання росту;
- ◆ порушення гармонійності статури;
- ◆ збільшення темпів продукції статевих гормонів та прискорення статевого розвитку.

В організмі дорослих при дефіциті білків порушуються такі функції організму:

- ◆ знижується апетит та маса тіла;
- ◆ збільшується втомлюваність та знижується працездатність;
- ◆ уражається імунна система та підвищується рівень захворюваності;
- ◆ знижується активність ферментів, порушуються процеси травлення і кровотворення;
- ◆ негативно впливає на печінку, серцево-судинну та дихальну системи;
- ◆ знижується функціональна здатність статевого апарату.

При надлишку надходження білка до дорослого організму відбуваються біохімічні перетворення невикористаних амінокислот, що призводить до:

- ◆ інтоксикації організму продуктами метаболізму білків;

- ◆ зниження фізичної працездатності (сприяє розвитку втоми);
- ◆ накопичення кислих радикалів;
- ◆ утворення сечокислового каміння та новоутворень у суглобах;
- ◆ гальмування нервово-психічних реакцій.

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.

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

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.).

У харчовій промисловості 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, глютамінова кислота, метіонін та інші); похідні амінокислот (ацетилцистеїн, цистамін та інші).

1.3 Експериментальна частина

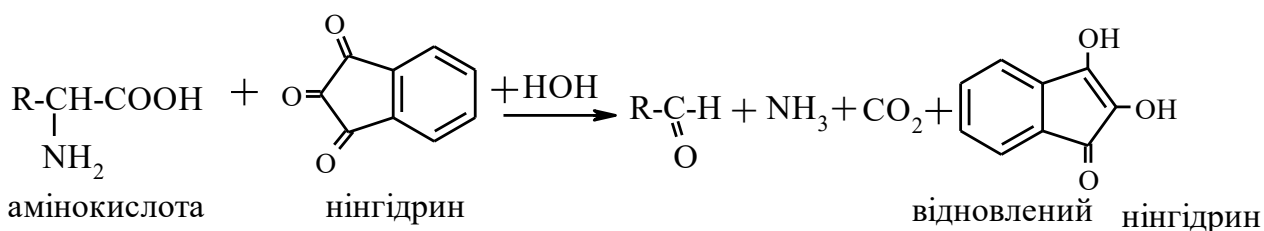
1.3.1 Біуретова реакція на пептидну групу (реакція Піотровського).

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. Таку реакцію дають усі білки, а також пептиди, що містять не менше двох пептидних зв'язків. З двох трипептидами забарвлення нестійке.

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

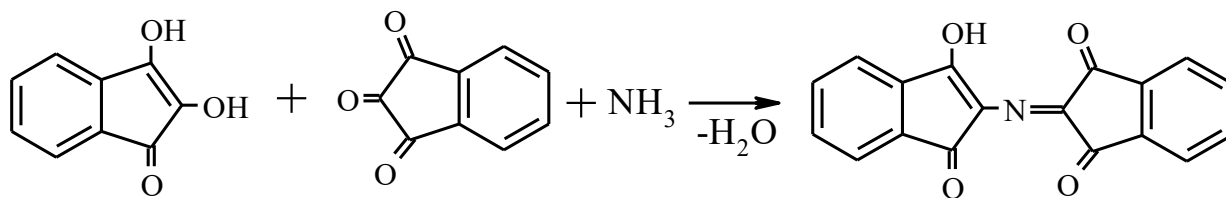
1.3.2 Нінгідрінова реакція на α -аміногрупу

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



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

Нінгідрінова реакція з використанням спиртового (або ацетонового)



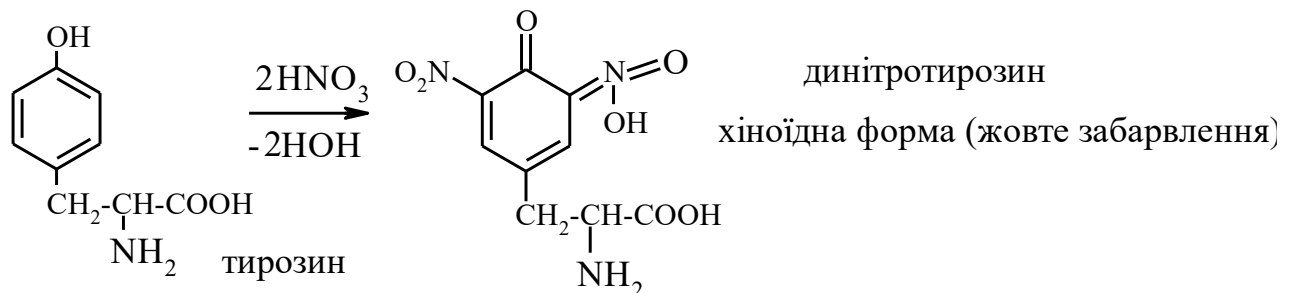
розчину широко використовується в хроматографічному аналізі, а також для колориметричного кількісного визначення, амінокислот (цистеїн, метіонін, глутамінова кислота, гістидин; амінокислот у гідролізатах білків).

В одну пробірку наливають 1 мл 1 % -ого розчину яєчного білка, в другу – 1 мл 0,1 % -ого розчину α -аланіну і в третю – 1 мл 0,1% -ого розчину β -аланіну. Приливають у всі пробірки по 5-10 крапель 0,5 % -ого 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 луку перетворюються на хіноїдні структури, забарвлені в оранжевий колір:

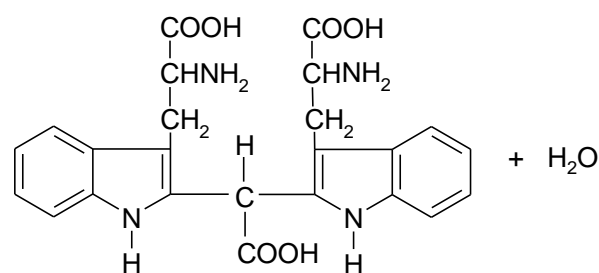
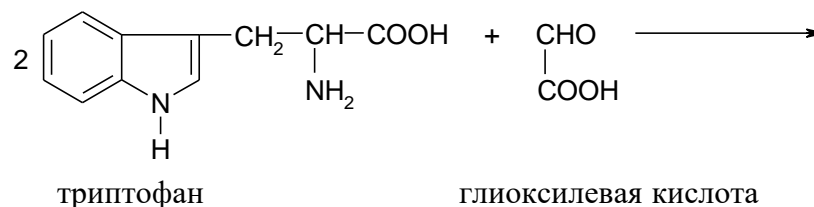


Фенілаланін нітрється важче. Білки, що не містять циклічних амінокислот, не дають ксантопротеїнової реакції.

В одну пробірку наливають 1 мл 1 % -ого розчину яєчного білка, в другу – 1мл 0,1 % -ого розчину тирозину, в третю – 1 % -ого розчину желатини, в четверту – 1 мл 0,1% -ого 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 краплинами 20 % розчин натрію гідроксиду, доки не почнеться зміна забарвлення. Дають пояснення результатам досліду в кожній пробірці, порівнюють забарвлення і записують хімізм реакції.

1.3.7 Реакція на триптофан (реакція Адамкевича)

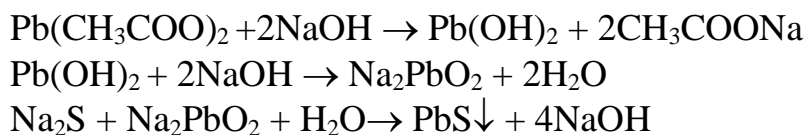
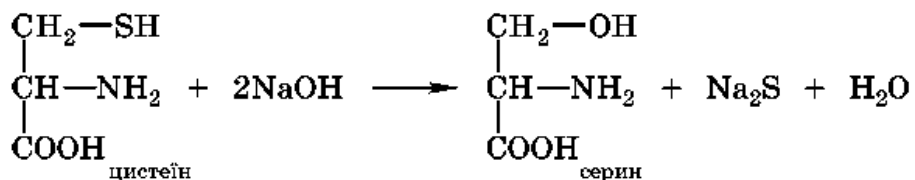
Амінокислота триптофан і білки, що її містять, у кислому (лужному) середовищі реагують з гліоксильною кислотою (альдегідами), утворюючи продукт конденсації червоно-фіолетового кольору:



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.

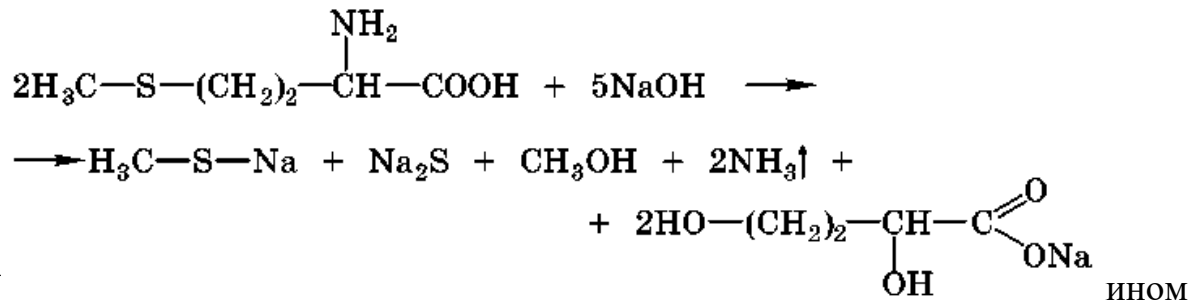
1.3.9 Реакція на амінокислоти, що містять слабозв'язаний сульфур (реакція Фоля)

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



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

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



натрію плюмбіту або нітропрусиду.

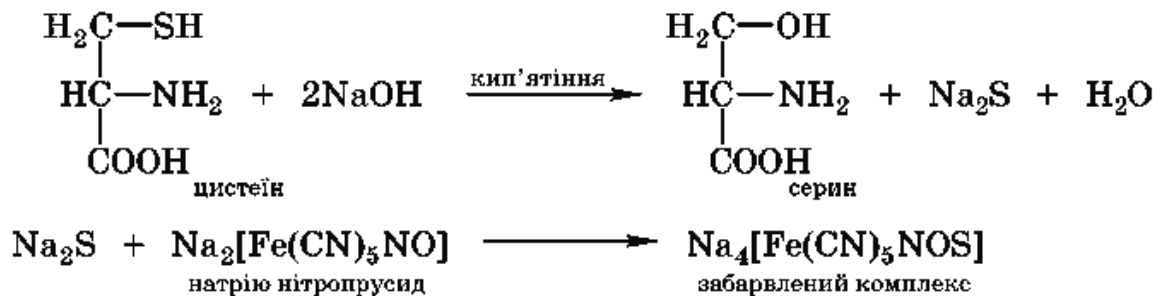
У три пронумеровані пробірки вливають по 10 крапель 5 % розчину плюмбуму ацетату і краплями додають 20 % розчин натрію гідроксиду до

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'яють. 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'яють 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 Висновки

Лабораторна робота № 2

Методи виділення і кількісного визначення вільних амінокислот та білків

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 нітрогенвмісні 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.

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 фотонейтриметричні методи.

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 Виділення вільних амінокислот із біологічного матеріалу

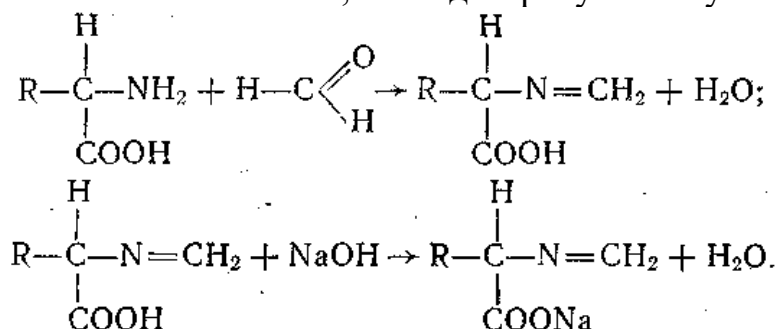
У ступку вмішують 2 г розмолотого сухого біологічного матеріалу та заливають 10 мл 75%-вого розчину етилового спирту, нагрітого до 60-70⁰С на водяній бані. Отриману суміш розтирають протягом 15 хвилин і фільтрують через вставлений у лійку складчастий паперовий фільтр в чашку для випарювання, використовуючи 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 густина 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 кожну 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 А і В – 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 реактиву, перемішують і залишають на 30 хв при кімнатній температурі. Оптичну густину розчину вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі в діапазоні від 540 до 650 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Розчином порівняння є суміш цих же реактивів без препарату. Калібрувальний графік будують в межах концентрації від 1 до 10 мг стандартного зразка білка, вимірюючи оптичну густину розчинів при відповідній довжині хвилі.

2.3.3.2 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.

2.3.3.3 Мікрометод визначення кількості білка з реактивом Бенедикта

2 мл розчину препарату, що містить 0,1 – 2 мг досліджуваного білка, поміщають у пробірку, додають 2 мл 6 %-вого розчину натрію гідроксиду, 0,2 мл реактиву Бенедикта, перемішують і залишають на 15 хв при кімнатній температурі. Оптичну густину вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 330 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Розчином порівняння є суміш цих реактивів без препарату. Калібрувальний графік будують у межах концентрації від 0,1 до 2 мг стандартного зразка білка, вимірюючи оптичну густину розчину при довжині хвилі 330 нм.

2.3.3.4 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 Висновки

Лабораторна робота № 3 Складні білки: глікопротеїни

3.1 Мета: виділити і дослідити будову, властивості глікопротеїнів та нуклеопропротеїнів

3.2 Короткі теоретичні відомості

Складні білки (гемопропротеїни, фосфопропротеїни, глікопротеїни, нуклеопропротеїни) 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 остеоумукоїди 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 фолікулостимулюючий, речовини які визначають групу крові, імуноглобуліни, деякі білки крові і тканин протромбін, ферменти та ін.

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

3.3 Експериментальна частина

3.3.1 Виділення муцину із слини і відкриття в ньому вуглеводного компонента

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

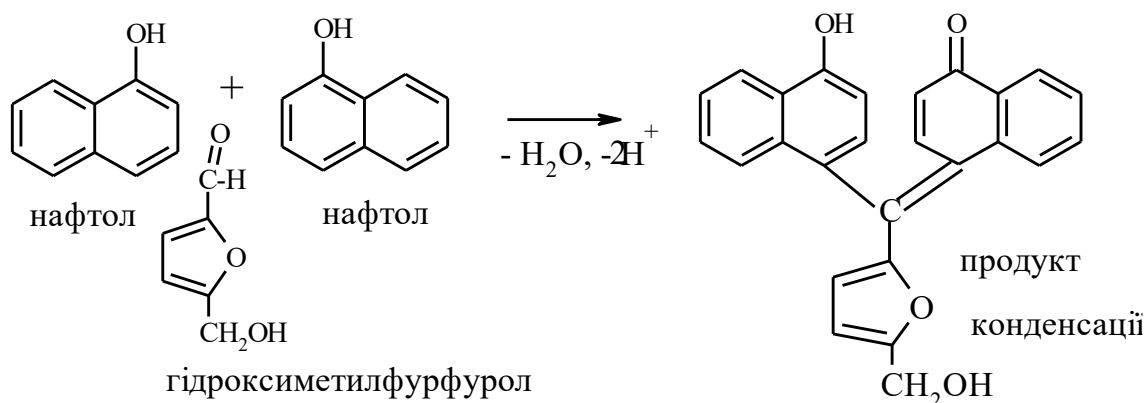
Сліна – це змішаний секрет усіх слинних залоз, в'язка, злегка замутнена рідина (99,5% H₂O), рН якої коливається в межах 5,8-7,4 (до 7,8 при інтенсивній саливації). Сухий залишок складають неорганічні (хлориди і гідрокарбонати, фосфати і інші солі натрію, калію, кальцію й ін.) й органічні (амілолітичні ферменти, білки, вільні амінокислоти, сечовина, аміак, муцин, креатинін і ін.).

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.

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.

3.3.2 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.

3.3.3 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 нагрівуючи 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.

У пробірку із шматочком вареного курячого білка добавляють 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.

3.3.4. 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.

3.4 Висновки

Лабораторна робота № 4 Кількісне визначення активності ферментів

4.1 Мета: оволодіти методикою визначення активності ферментів

4.2 Короткі теоретичні відомості

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

Користуючись сучасними методами (спектрофотометричними, колориметричними, полярографічними, флуориметричними, хроматографічними та іншими), визначають активність ферментів або після зупинки ферментативної реакції через певний час, або реєструючи безперервно в ході реакції. Останній спосіб зручніший. Він можливий, якщо субстрат або продукт реакції поглинає світло в певній ділянці спектру або флуоресцює і т. д. Оскільки в ряді випадків кількість ферментів не може бути визначена в абсолютних величинах (в міліграмах), його доводиться подавати в умовних одиницях.

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

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

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

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

4.3 Експериментальна частина

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

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

У всі пробірки додають по 1 мл води і по 2 мл 0,1 % розчину крохмалю, перемішують, струшують і поміщають у термостат при 38 °С на 30 хв. Після інкубації пробірки охолоджують водопровідною водою, додають по 1 краплі 0,1 % розчину йоду і перемішують. При реакції з йодом рідина забарвлюється в жовтуватий, червоний і фіолетовий колір. Відмічають пробірку з жовтуватим забарвленням, де гідроліз крохмалю пройшов повністю, і роблять розрахунок. Отримані дані записують у вигляді таблиці 8.1.

Таблиця 4.1 – 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.).

4.4 Висновки

Лабораторна робота № 5

Біологічне окиснення. Окисно-відновні ферменти

5.1 Мета: оволодіти методикою дослідження окисно-відновних ферментів

5.2 Короткі теоретичні відомості

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

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

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

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

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

Принциповою особливістю біологічного окиснення є те, що воно проходить поступово, через численні проміжні ферментативні стадії, тобто проходить багаторазова передача протонів і електронів (або тільки електронів) від однієї сполуки — донора, до другої — акцептора, при цьому протони транспортуються лише частиною проміжних переносників. Деякі організми, зокрема бактерії або клітини багатоклітинного організму, можуть вивільняти енергію і без ланцюга транспорту електронів. Таким організмам та клітинам для життєдіяльності не потрібен кисень, і тому їх називають анаеробними. В аеробних організмів (тобто тих, для існування яких необхідний кисень) кінцевим акцептором електронів і протонів є кисень. Переміщення електронів від початкових речовин до кисню супроводжується виділенням надлишку енергії. При цьому 40—50 % її виділяється у вигляді тепла, а 50—60 % акумулюється у макроергічних зв'язках АТФ. За рахунок цієї енергії здійснюються життєві процеси клітини. Отже, тканинне дихання — це основний процес, що забезпечує аеробний організм енергією.

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

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

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

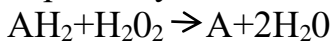
1. $AO + 1/2 O_2 \rightarrow AO_2$ (приєднання Оксигену).
2. $AH_2 + B \rightarrow A + BH_2$ (відщеплення Гідрогену).
3. $A^{2+} \rightarrow A^{3+} + e$ (відщеплення електрона).

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

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

киснем повітря, тому досліди проводять за відсутності повітря (у пробірках Тунберга або звичайних пробірках під шаром рослинної олії).

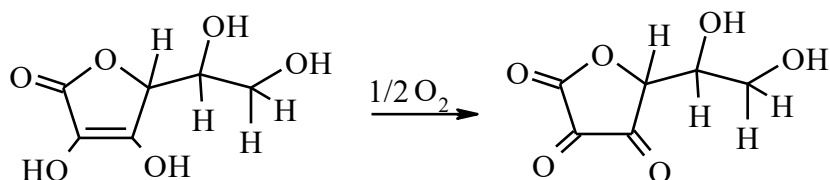
Пероксидаза каталізує окиснення субстрату за участі Оксигену гідроген пероксиду за схемою:



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

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

Аскорбатоксидаза (ЕС 1.10.3.3.) є ферментом, що містить Купрум. Фермент був відкритий Сент-Дьордь 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 + $\text{O}_2 \rightarrow$ Дегідроаскорбінат + H_2O_2 (окиснювальна реакція).
2. Аскорбінат + $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ Дегідроаскорбінат + H_2O (пероксидазна реакція).
3. $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 1/2 \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$.
4. Дегідроаскорбінат + $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ Продукти розкладу + $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$.

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».

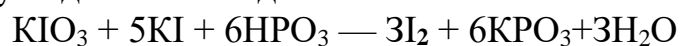
Перебудова дихальних шляхів рослин відбувається також у разі їх захворювання. У цьому випадку дихання переважно здійснюється не за циклом Кребса, а шляхом аеробного бродіння, оскільки кінцеві продукти бродіння (спирт, молочна кислота) можуть бути окиснені системою «аскорбінова кислота – аскорбатоксидаза».

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

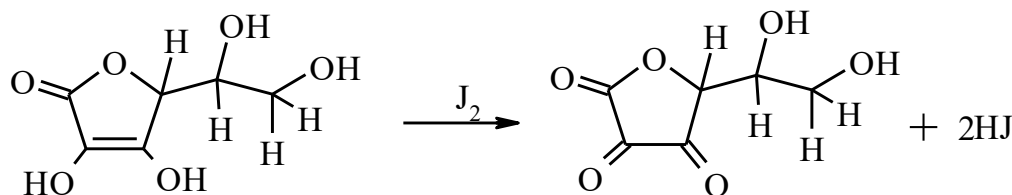
5.3 Експериментальна частина

5.3.1 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 KI 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).

5.3.2 Визначення активності пероксидази молока

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

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

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

5.3.3 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 KClO_3 показує, що хлор гальмує дію ферменту тільки у вигляді іона Cl^- .

5.4 Висновки

Лабораторна робота № 6 Вуглеводи

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

6.2 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 полігідроксикарбонільні 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.

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

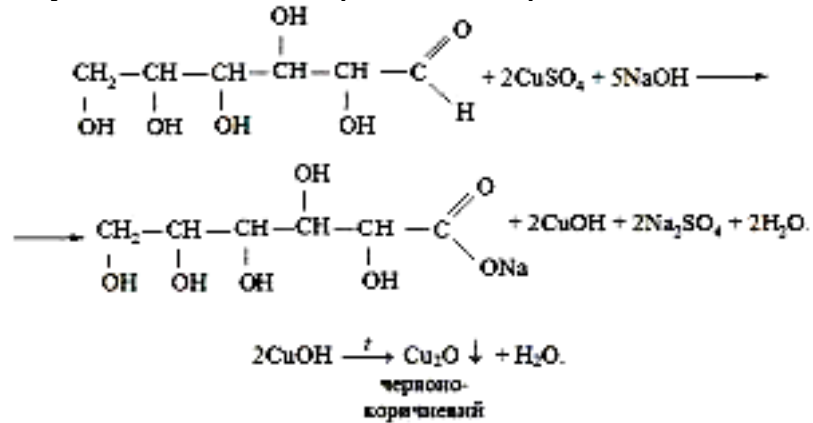
6.3 Експериментальна частина

6.3.1 Реакція Троммера

Моносахариди, завдяки наявності вільного кетонного 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:

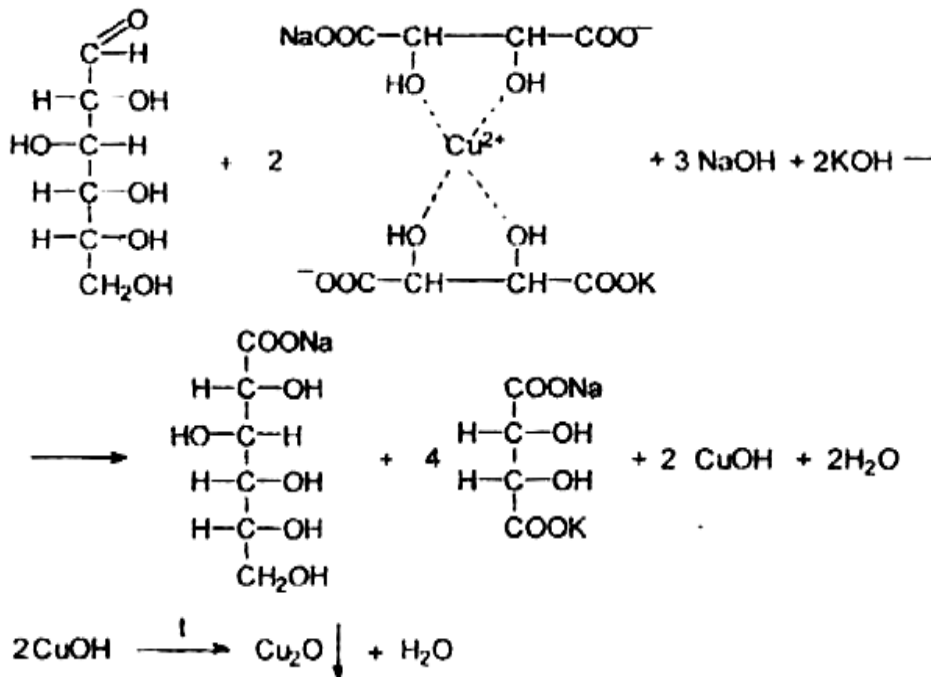


В пробірку до 3 мл розчину вуглеводів додають 1 мл 5 % розчину натрій гідроксиду і п'ять крапель 5 % розчину купруму (II) сульфату. Випадає осад купруму (II) гідроксиду, який внаслідок струшування пробірки розчиняється, а розчин набуває волошкового забарвлення. Під час його обережного нагрівання в полум'ї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

6.3.2 Реакція Фелінга

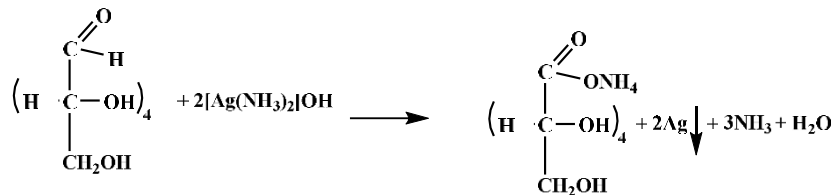
В реактиві Фелінга йони купруму (II) перебувають у вигляді комплексної сполуки з тартратами. Механізм реакції гексоз (і всіх редукуючих вуглеводів) із реактивом Фелінга такий же, як і в реакції Троммера. Перевагою реактиву Фелінга є те, що купрум у разі надлишку реактиву не випадає у вигляді купрум (II)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



6.3.3 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.

Спостереження і реакцію записують у зошит, роблять висновки.

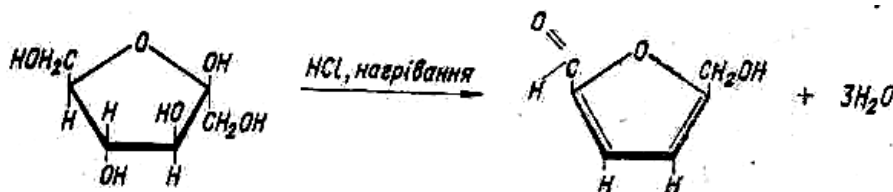
6.3.4 Реакція Подобєдова – Моліша з α -нафтолом

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

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

6.3.5 Реакція Селіванова на кетози

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



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

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

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

6.3.6 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.

6.3.7 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.

6.3.8 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 (І) оксиду? Поясніть результати досліду. Напишіть рівняння реакцій з купрум (ІІ) гідроксидом для тих дисахаридів, які дають позитивну реакцію з реактивом Фелінга.

6.3.9 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.

6.3.10 Кількісне визначення вуглеводів

Визначення глюкози за наявності фруктози йодо-метричним методом

Оснoву 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:

$$C = (B-A) f Q V_0 / V_1.$$

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 ;

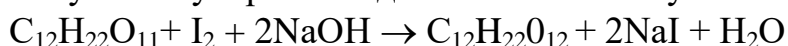
Q – маса глюкози (9 мг), еквівалентна 1 мл 0,05 н розчину натрій тіосульфату;

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.

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.

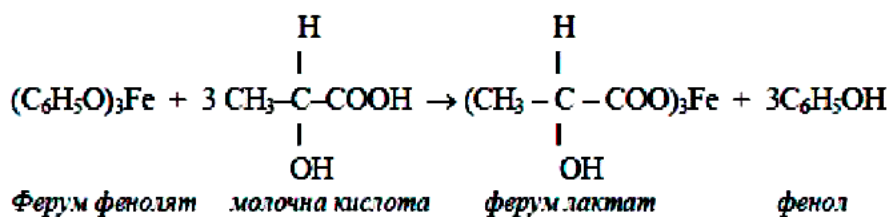
Масову концентрацію лактози в молоці, мг/мл, розраховують за формулою:

$$C = (A - B) f Q V_0 / V_1 V_2,$$

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.

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

6.4 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 № 7

Визначення глюкози в сечі. Функціональні проби на патологію вуглеводного обміну

7.1 Мета: експериментально провести функціональні проби на патологію вуглеводного обміну

7.2 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.

7.3 Експериментальна частина

7.3.1 Проба Фелінга

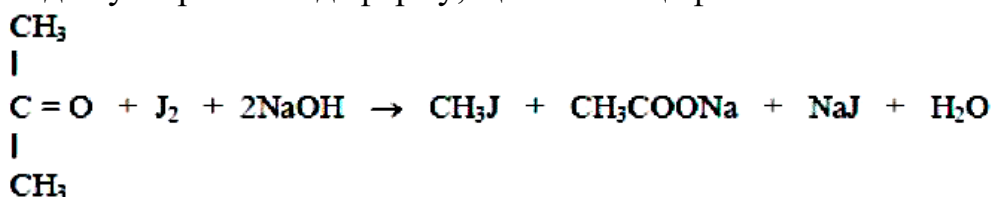
До 5 крапель реактиву Фелінга додають 5 крапель сечі, що підлягає дослідженню. Рідину перемішують і нагрівають до початку кипіння. При цьому випадає жовтий осад купруму (I) гідроксиду або червоний осад купруму оксиду. Слід відзначити, що в сечі міститься багато органічних речовин (сечова кислота, креатинін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

7.3.2 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 %.

7.3.3 Функціональні проби на патологію вуглеводного обміну

7.3.3.1 Взаємодія ацетону з йодом

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

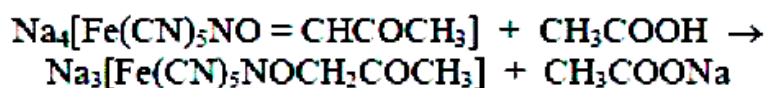


Ця реакція неспецифічна оскільки при взаємодії йоду з ацетальдегідом і етанолом також утворюється йодоформ.

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.

7.3.3.2 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.

7.4 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 № 8

Визначення хімічних показників жирів.

8.1 Мета: оволодіти методиками визначення хімічних показників жирів

8.2 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.

8.3 Експериментальна частина

8.3.1 Визначення числа омилення жиру

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

Числом омилення називається кількість мг КОН, 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 КОН, який попередньо приготовлений. Колби кип'яють 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 НСІ до зникнення рожевого забарвлення (до нейтральної реакції).

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

$$ЧО = (B-A) \cdot Q / a$$

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

a – наважка жиру (г);

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

8.3.2 Визначення кислотного числа жиру

Кислотністю жиру чи кислотним числом називається кількість мг КОН, 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 КОН до появи рожевого забарвлення, незникаючого після збовтування.

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

$$КЧ = A \cdot f \cdot Q / a$$

де A – об'єм розчину КОН 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:

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

8.3.3 Визначення ефірного числа жиру

Ефірним числом називається кількість мг КОН, яка необхідна для нейтралізації жирних кислот, які утворюються при омиленні триацилгліцеролів,

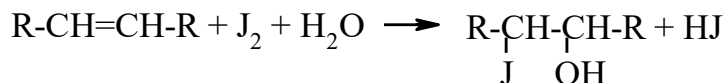
які містяться в 1 г жиру. Це число визначають як різницю між числом омилення жиру та його кислотним числом.

$$EЧ = ЧО - КЧ$$

8.3.4 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);

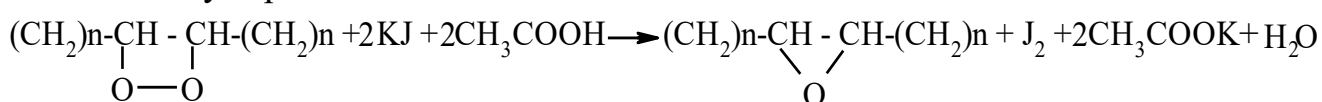
f – коефіцієнт поправки на титр 0,05 М розчину $Na_2S_2O_3$;

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

8.3.5 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 КІ 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 КІ. Після цього вміст колб струшують, колбу укупувають 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.

8.3.6 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.

8.4 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. Метод виявлення ненасиченості ліпідів.

Лабораторна робота № 9

Обмін ліпідів. Вплив жовчі на активність ліпази

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

9.2 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.

9.3 Експериментальна частина

9.3.1 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.

9.3.2 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.

9.3.3 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 кожену пробірку додають по 2 краплі рослинної олії і ретельно збовтують. Відзначають результати досліду і роблять висновки.

9.4 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 № 10 **Дослідження фосфоліпідів.**

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

10.2 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.

10.3 Експериментальна частина

10.3.1 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.

10.3.2 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.

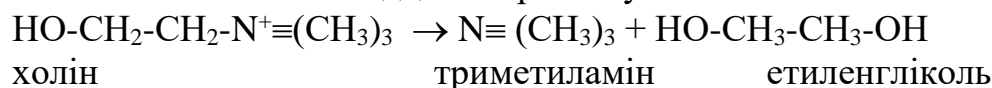
10.3.3 Осадження лецитину

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

10.3.4 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.

10.4 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 № 11 Обмін білків

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

11.2 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 русла.

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 рН = 1,5...2,0. Шлунковий сік містить й інші протеази, зокрема гастринсин, який має оптимум дії при рН = 3,0...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 (аутокатализ). 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'-фосфоаденозин-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 декарбоксилаз. Декарбоксилази 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. Накопиченню 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 (МАО і ДАО). МАО – флавінаденіндинуклеотидвмісний фермент, що переважно локалізується в мітохондріях та відіграє виключно важливу роль в організмі, регулюючи швидкість біосинтезу і розпаду біогенних амінів. ДАО 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.).

11.3 Експериментальна частина

11.3.1 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:

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

11.3.2 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, нахилиють її і спостерігають за появою на її стінках перших пластівців кальцію казеїнату. У момент їх появи секундомір вмикають 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).

11.3.3 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 °C на 30 хв. Після інкубації відкривають продукти гідролізу за допомогою біуретової реакції. Відзначають, в якій з пробірок пройде перетравлення денатурованого білка, і роблять висновки.

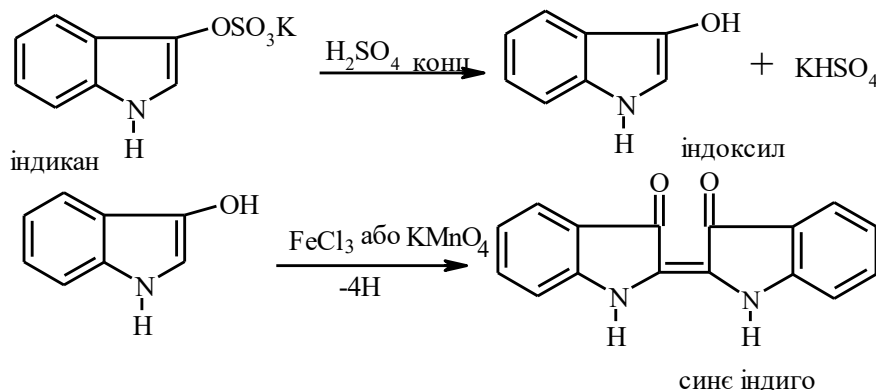
11.3.4 Гідроліз білка під дією трипсину

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°C 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.

11.3.5 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 індіго:



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.

11.4 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 піровиноградною кислотою, декарбоксилювання 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 № 12

Водорозчинні вітаміни

12.1 Мета: оволодіти методиками якісного визначення водорозчинних вітамінів

12.2 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 ліпородозчинні і водородозчинні) 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 ліпородозчинних вітамінів А і В).

За останні роки синтезовані антивітаміни, які мають подібну до вітамінів структуру (аналоги), але ускладнюють прояв їх активності. Антивітаміни,

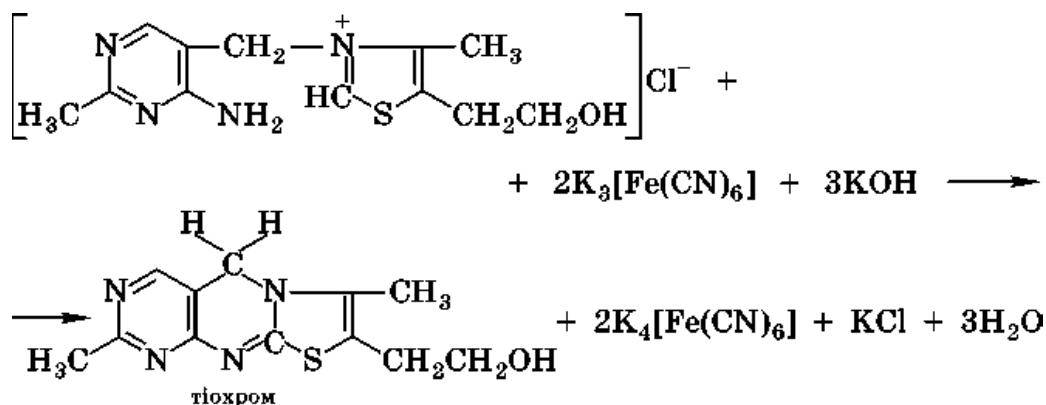
утворюючи головним чином неактивні ферментні комплекси, призводять до зниження або втрати ферментативної активності деяких ферментів, у тому числі і в бактеріях. Більшість антивітамінів застосовуються як лікарські засоби суворо спрямованої дії на деякі біохімічні і фізіологічні процеси.

12.3 Експериментальна частина

12.3.1 Реакція на тіамін (вітамін В₁, антиневритний)

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:

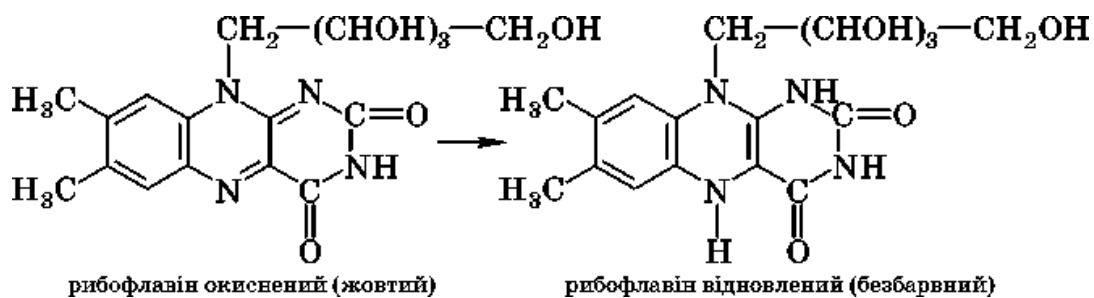


У пробірку вносять 1 мл 5 % розчину вітаміну В₁, додають 2 мл суміші, що складається з 1 мл 1% розчину K₃Fe(CN)₆ та 1мл 30% розчину NaOH, ретельно перемішують і залишають на 3 хвилини. Потім додають 5 мл ізобутилового спирту, інтенсивно струшують протягом 2 хвилин. Ізобутиловий екстракт тіохрому в ультрафіолетових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

12.3.2 Реакція на рибофлавін (вітамін В₂, антисеборейний)

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:



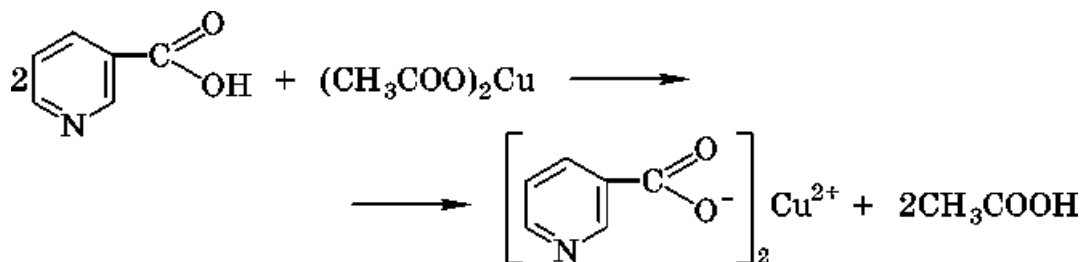
В пробірку наливають 1 мл 0,025% розчину вітаміну В₂ (суспензія рибофлавіну у воді), 0,5 мл концентрованої соляної кислоти та кидають шматочок металічного цинку. Виділяється водень, який вступає в реакцію з

рибофлавіном, рідина поступово забарвлюється у рожевий колір, а потім знебарвлюється. Під час збовтування знебарвлений розчин лейкофлавіну знову окиснюється киснем повітря до рибофлавіну.

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

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.

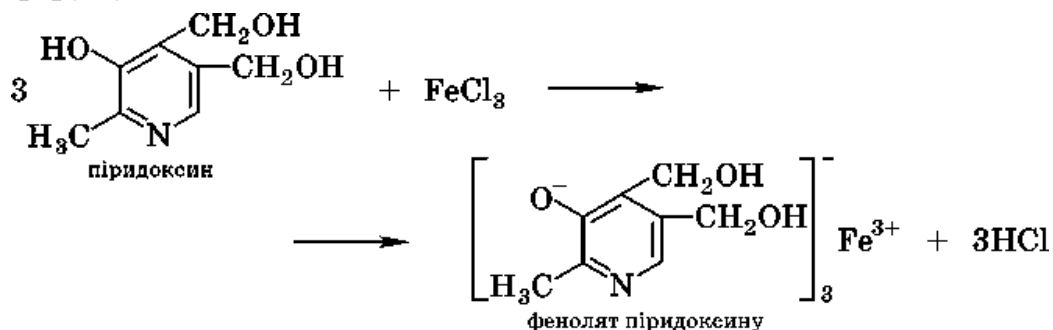
Якісні реакції на таблетки нікотинової кислоти 0,05 г.

0,5 г порошку розтертих таблеток розчиняють при нагріванні в 10 мл води та фільтрують. До 3 мл теплового 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.

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

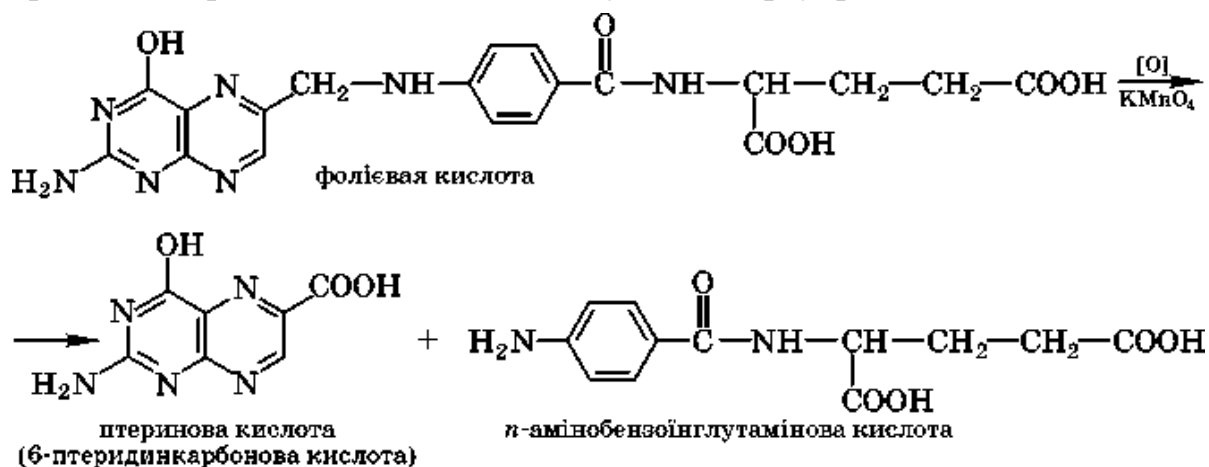
Під час взаємодії піридоксину з розчином ферум (III) хлориду рідина забарвлюється в червоний колір завдяки утворенню комплексної солі на зразок феноляту феруму:



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

12.3.5 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:



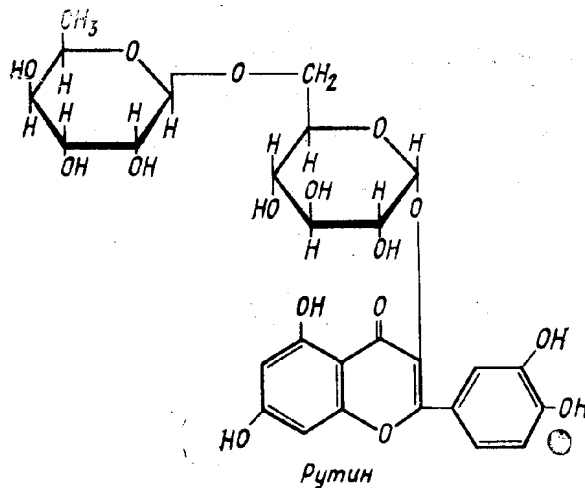
В ступці розтирають 10 г дріжджів з 10 мл 0,1 М NaOH, 2 г кварцевого піску протягом 5 хв, потім центрифугують 15 хв за 800 г.

До 10 краплин надосадової рідини додають 20 краплин концентрованої оцтової кислоти (рН 3,0) і 10 краплин 0,4% розчину KMnO₄ так, щоб рожеве забарвлення не зникало протягом 10 хв (якщо забарвлення зникає, слід додати ще декілька крапель KMnO₄). Через 10 хв надлишок калію перманганату видаляють чотирма-п'ятьма краплинами 3% розчину H₂O₂, 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.

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

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



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.

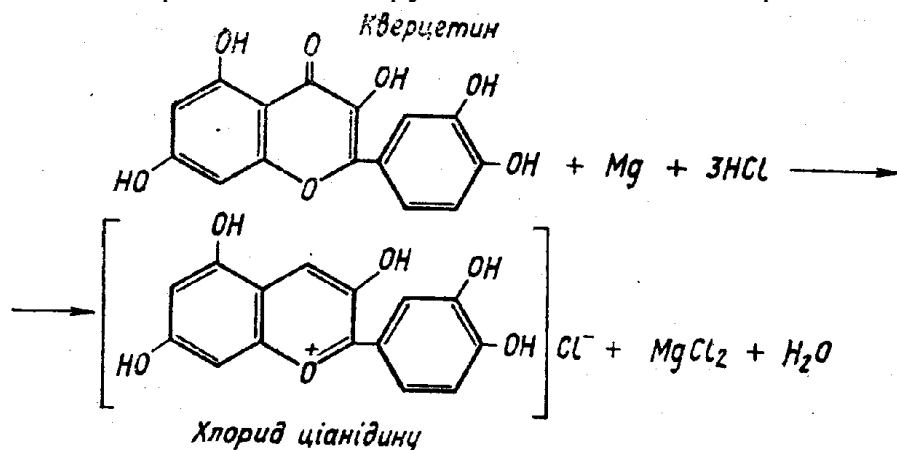
Реакція рутину з концентрованою сульфатною кислотою

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.

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.

12.3.7. 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.

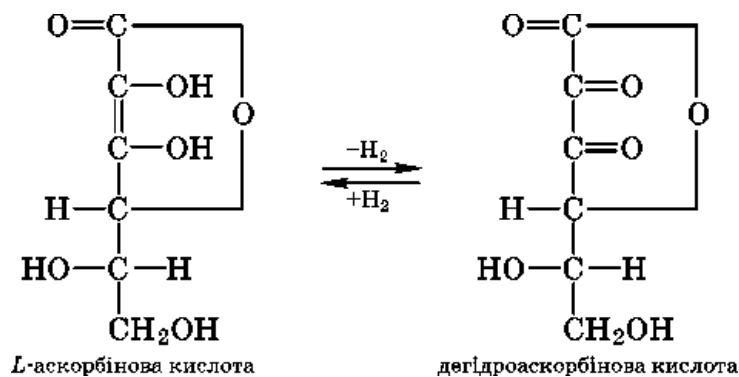
Для підрахунку вмісту вітаміну Р (у мкг) використовують формулу:

$$x = AV_1k/V_2P,$$

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.

12.3.8 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:



12.3.8.1 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.

12.3.8.2 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.

12.3.8.3 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.

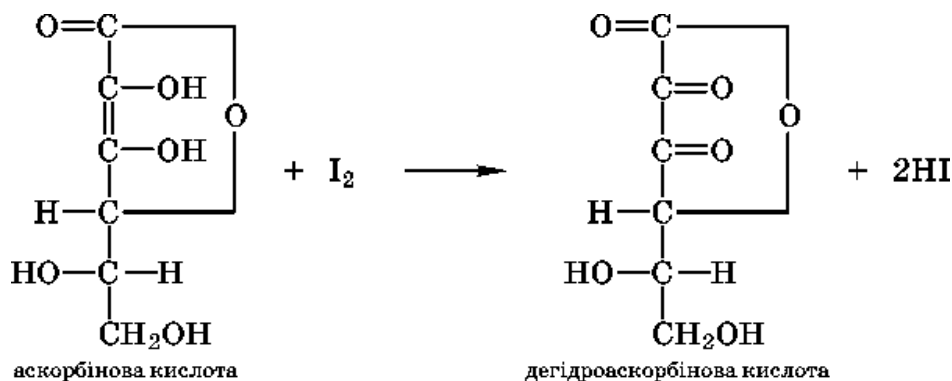
До 1 мл 0,1 % розчину аскорбінової кислоти додають 1 мл 1% розчину $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ і 0,5 мл 1 % розчину FeCl_3 . Спостерігають утворення синьо-зеленого забарвлення. Напишіть рівняння реакцій.

12.3.8.4 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.

12.3.8.5 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:



12.3.8.6 Кількісне визначення вітаміну С за методом Тильманса

Метод ґрунтується на здатності аскорбінової кислоти окиснюватися 2,6-дихлорофеноліндофенолом до дегідроваскорбінової 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; V₀ – загальна кількість екстракту, мл; V₁ – об'єм екстракту, взятого для титрування, мл; α – наважка харчового продукту, г.

12.3.8.7 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 $K_3Fe[Fe(CN)_6]$ (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.

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

У розрахунку вмісту вітаміна С 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 С в 100 г продукту (X) використати формулу:

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

12.4 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 № 13

Жиророзчинні вітаміни

13.1 Мета: оволодіти методиками якісного визначення жиророзчинних вітамінів

13.3 Експериментальна частина

13.3.1 Якісні реакції на вітамін А (ретинол, антиксерофтальмічний)

13.3.1.1 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.

13.3.1.1 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.

13.3.1.1 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.

13.3.2 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 розчинюють 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 риб'ячого жиру розчинюють 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 риб'ячого жиру розраховують за формулою: $C = \alpha V/Q$,

де С – вміст вітаміну А в 1 мл риб'ячого 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 риб'ячого жиру, мл;

Q – взята в пробі кількість риб'ячого жиру, мл.

13.3.3 Якісні реакції на вітамін D (кальциферол, антирахітичний)

13.3.3.1 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.

13.3.3.2 Реакція з аніліном

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

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

13.3.3.3 Реакція з бромом

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

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

13.3.4 Реакції на вітамін K (нафтохінон, антигеморагічний)

13.3.4.1 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.

13.3.4.2 Реакція з аніліном

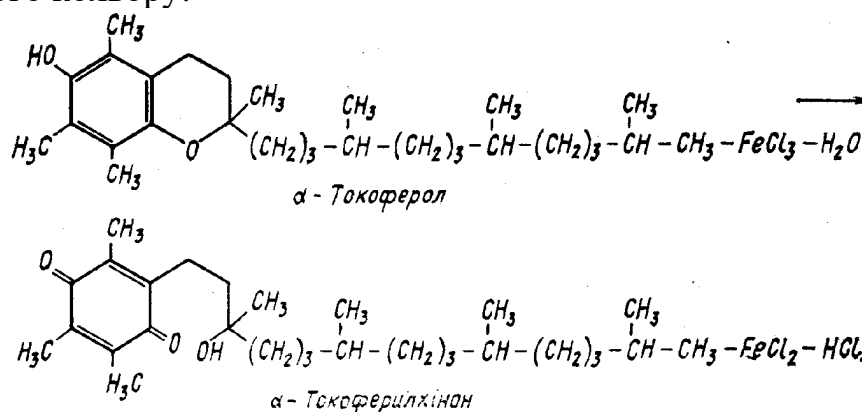
За наявності аніліну спиртовий розчин вітаміну К забарвлюється в червоний колір, що зумовлено утворенням 1-метил-2-фениламінонафтохінолу.

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

13.3.5 Якісні реакції на вітамін Є (токоферол)

13.3.5.1 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.

13.3.5.1 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.

13.3.6 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.

13.4 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 № 14 Гормони

14.1 Мета: оволодіти методиками якісного визначення гормонів

14.2 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.

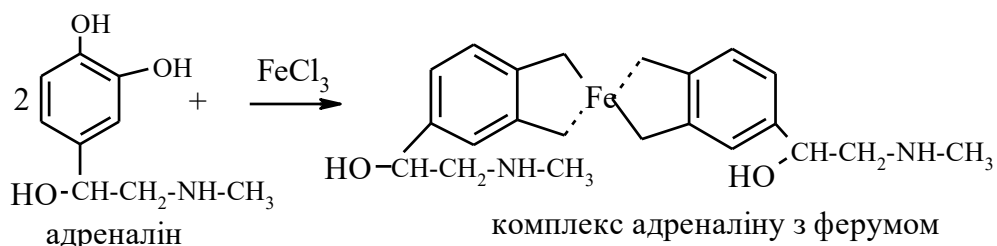
14.3 Експериментальна частина

14.3.1 Якісні реакції на адреналін та норадреналін

14.3.1.1 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:

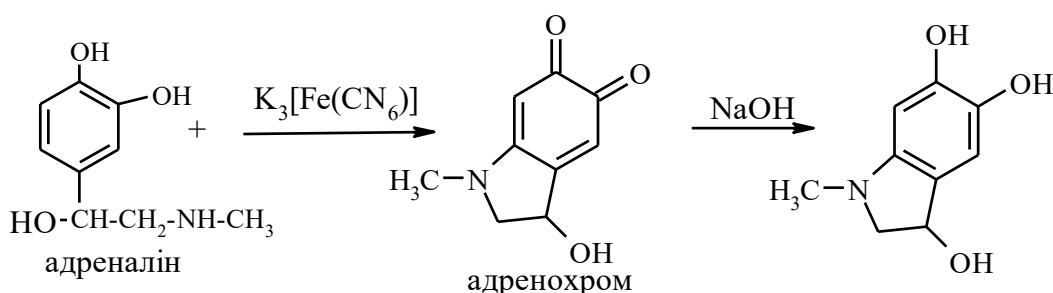


У пробірку приливають 10 крапель 0,1 %-вого розчину адреналіну з ампули та додають 1 краплю розчину 0,15 моль/л феруму (III) хлориду. Спостерігають появу характерного забарвлення.

14.3.1.3 Визначення адреналіну за утворенням флуоресціюючого продукту його окиснення – адренолютину

Метод базується на здатності адреналіну окиснюватися під дією калію гексаціаноферату (III) в адrenoхром, з якого в лужному середовищі утворюється адренолютин, 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.



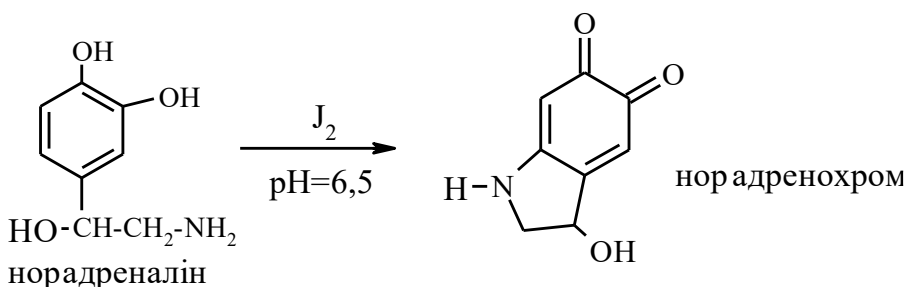
У дві інші пробірки відмірюють по 4 мл розведених розчинів адреналіну, приливають по 0,3 мл 0,2 %-вого розчину калію гексаціаноферату (III) та залишають на 5 хв (при цьому адреналін окиснюється в адrenoхром).

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 адrenoхрому, а натрію гідроксид сприяє перетворенню його на адренолютин). Пробірки розташовують у штативі флуороскопа та порівнюють інтенсивність характерної флуоресценції в пробах.

14.3.1.4 Ідентифікація адреналіну та норадреналіну

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

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



До 1 мл 0,2 % розчину адреналіну гідрохлориду або гідротартрату додають 5 мл гідротартратного буферу рН=3,56 та 2 мл розчину 0,05 моль/л

йоду, залишають на 5 хв, після чого змішують з 3 мл розчину 0,05 моль/л натрію тіосульфату. Розчин зберігає темно-червоне забарвлення (відмінність від адреналіну, якщо виникає інтенсивно червоне забарвлення).

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

14.3.2 Якісні реакції на гормони коркової частини надниркових залоз

14.3.2.1 Реакція з концентрованою сульфатною кислотою

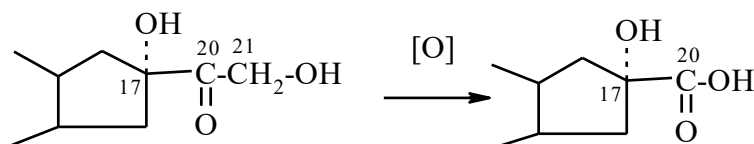
Концентрована сульфатна кислота є загальним внутрішньогруповим специфічним реактивом, який підтверджує наявність стероїдного циклу. У результаті зазначеної реакції кортизон дає жовте забарвлення із зеленою флуоресценцією, дезоксикортикостерон – вишневе забарвлення із зеленувато-коричневою флуоресценцією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

14.3.2.2 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).

14.3.3 Якісні реакції на статеві гормони та їх метаболіти.

14.3.3.1 Реакція на прогестерон з концентрованою сульфатною кислотою.

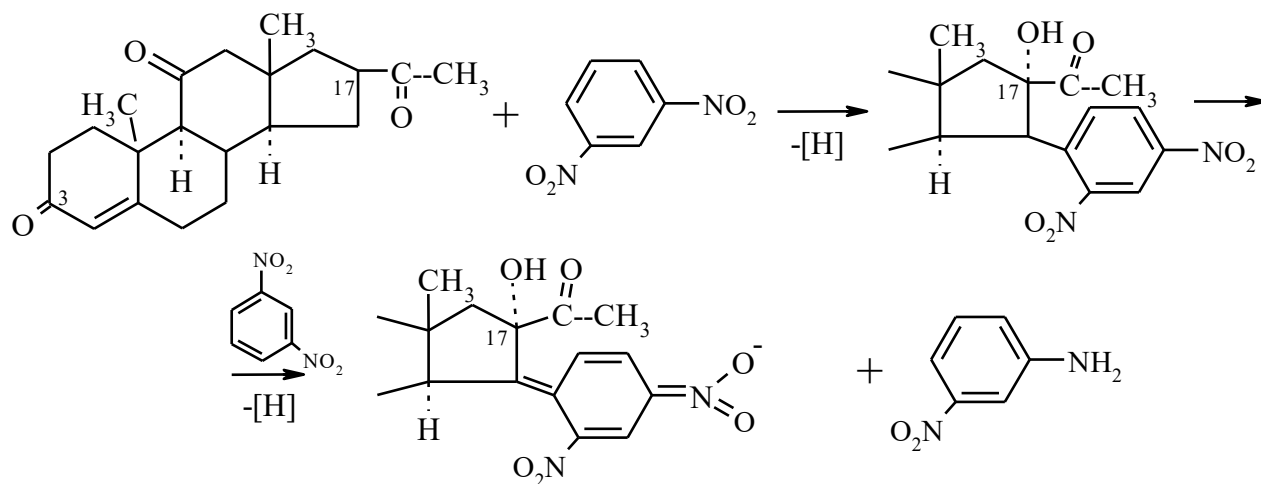
При взаємодії прогестерону із сульфатною кислотою утворюється сполука, що має жовте забарвлення із зеленою флуоресценцією.

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.

14.3.3.2 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.

14.3.3.3 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.

14.4 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.

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 1об'єму 0,3% розчину йоду додають 9 об'ємів води.

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

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

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

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

24,2 г трис-(гідроксиметил)-амінометану розчиняють у мірній колбі місткістю 1 л (у 500 мл H₂O). Для одержання необхідного значення рН додають указаний у таблиці 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 нахилиючись 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. Біохімія: Підручник / М.Є.Кучеренко та ін. - Київ: Либідь, 1995.- 464 с.
2. Боечко Ф.Ф. Біологічна хімія. - Київ: Вища школа, 1995. - 536 с.
3. Лисиця А.В. Біологічна хімія. Практикум. – Суми.: Університетська книга, 2009. – 240 с..
4. Павлоцька Л.Ф. Біологічна хімія. Практикум. – Суми.: Університетська книга, 2011. – 63 с..

\

Зміст

Лабораторна робота № 1 Якісні реакції на функціональні групи білків та амінокислот	3
Лабораторна робота № 2 Методи виділення і кількісного визначення вільних амінокислот та білків.....	8
Лабораторна робота № 3 Складні білки: глікопротеїни	12
Лабораторна робота № 4 Кількісне визначення активності ферментів.....	15
Лабораторна робота № 5 Біологічне окиснення. Окисно-відновні ферменти.....	17
Лабораторна робота № 6 Вуглеводи.....	23
Лабораторна робота № 7 Визначення глюкози в сечі. Функціональні проби на патологію вуглеводного обміну.....	29
Лабораторна робота № 8 Визначення хімічних показників жирів.....	31
Лабораторна робота № 9 Обмін ліпідів. Вплив жовчі на активність ліпази.....	34
Лабораторна робота № 10 Дослідження фосфоліпідів.....	36
Лабораторна робота № 11 Обмін білків.....	38
Лабораторна робота № 12 Водорозчинні вітаміни.....	46
Лабораторна робота № 13 Жиророзчинні вітаміни	55
Лабораторна робота № 14 Гормони	58
Додатки.....	62
Рекомендована література.....	67