

**Національний університет
біоресурсів і природокористування України**

БІОХІМІЯ

(практикум)

**За загальною редакцією академіка НАН України
і НААН України Д.О. Мельничука**

Рекомендовано Міністерством освіти і науки, молоді та спорту України як навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів
навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів
від 30.10.12 № 1/11-16887

КИЇВ – 2012

УДК 577.1(075.8)

ББК 28.072 я7

Б 63

Біохімія: практикум / Д.О. Мельничук, С.Д. Мельничук, Л.Г.Калачнюк, М.В. Шевряков, Г.І. Калачнюк. За загальною редакцією академіка НАН України і НААН України Д.О. Мельничука. – К: НУБіП України, 2012. – 528 с.

Біохімія (практикум) рекомендовано Міністерством освіти і науки, молоді та спорту України як навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів від 30.10.12 № 1/11-16887

Рецензенти:

Костерін С.О., доктор біологічних наук, професор, член кореспондент НАН України, заступник директора з наукової роботи та завідувач відділу біохімії м'язів Інституту біохімії імені О.В. Паладіна НАН України

Цвіліховський М.І., доктор біологічних наук, професор, академік НААН України, директор Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва Національного університету біоресурсів і природокористування України

Цудзевич Б.О., доктор біологічних наук, професор Навчально-наукового центру «Інституту біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

У практикумі з біохімії викладені найбільш поширені класичні й сучасні модифіковані й уніфіковані методи якісного та кількісного аналізу вуглеводів, ліпідів, амінокислот, білків, нуклеїнових кислот, ферментів, вітамінів, гормонів, води, мінеральних й інших речовин у живих організмах та їх субструктурах, а також методологічні аспекти проведення полімеразної ланцюгової реакції й використання стандартів у біохімічних дослідженнях.

ББК 28.072 я7

© Мельничук Д.О., 2012

© Мельничук С.Д., 2012

© Калачнюк Л.Г., 2012

© Шевряков М.В., 2012

© Калачнюк Г.І., 2012

ПЕРЕДМОВА

Біохімічні процеси у різних організмів мають багато спільного. Проте, зважаючи на особливість середовища і умов перебування, їхній метаболізм має також специфічні особливості. Вивчення особливостей і загальних закономірностей будови й обміну речовин у різних організмів має не лише загальнобіологічне, а й практичне значення. Пропонований практикум „Біохімія” має на меті дати студентам Національного університету біоресурсів і природокористування України та інших ВНЗ суміжного профілю основні знання про будову біомолекул та практичне визначення метаболітів у живих організмах. У якості об’єктів дослідження рекомендуються органи, тканини, клітини й субклітинні структури різних тварин та інших організмів.

Практикум включає якісні дослідження важливих речовин, а також роботи, пов’язані з кількісним визначенням сполук і особливостями біохімічних реакцій. При проведенні кількісних досліджень студенти мають можливість порівнювати значення біохімічних показників у різних біооб’єктах, зіставляти ці величини між собою й стандартами, робити висновки про особливості метаболізму в живих організмах та у їх субструктурах.

У кожній лабораторній роботі наведені мета і завдання дослідження. Дослідам обов’язково передують теоретичний матеріал, який значно розширює й поглиблює знання студента з проблеми, що вивчається. В експериментальній частині наведено принцип методу, за яким виконуються дослідження, хід роботи, наводяться формули для кількісних розрахунків. Лабораторні роботи включають вивчення складу, властивостей та обміну вуглеводів, ліпідів, білків, нуклеїнових кислот та нуклеопротеїнів, ензимів, вітамінів, гормонів, води і мінеральних речовин тощо. Уніфіковані та модифіковані методики досліджень ґрунтуються на відомих хімічних реакціях та встановлених зако-

номірностях фізико-хімічних і біологічних процесів. Наприкінці кожного розділу пропонуються контрольні завдання з даної теми, які містять розрахункові задачі, різноманітні вправи і тестові завдання.

У практикумі наводяться способи приготування окремих реактивів, довідковий матеріал з виготовлення буферних систем, використана сучасна міжнародна система фізичних величин та їх одиниць, номенклатура хімічних речовин.

Цінним для студентів і зацікавлених молодих дослідників є методологічна інформація про умови проведення полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), де на перше місце виносяться суворі вимоги до обов'язкового підтримання ідеальної чистоти відповідних приміщень, обладнання, реактивів, засобів й самих виконавців та їхні високі фахові знання.

Важливим є те, що у практикумі «Біохімія» вперше наведені актуальні на даний час та особливо на перспективу питання державного й світового значення про стандарти й стандартизацію у народному господарстві і, передусім, у біохімічних дослідженнях, де вітчизняним лідером визнано Українську лабораторію якості і безпеки продукції АПК НУБіП України, що висвітлено у розділах «СТАНДАРТИ І СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ», «ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ У БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРНІЙ ПРАКТИЦІ».

Від авторів

редактор, доктор біологічних наук, професор,
академік НАН і НААН України Д.О. Мельничук

1. ОСНОВНІ ВИМОГИ І ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ У БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Перед проведенням лабораторної роботи студенти зобов'язані теоретично підготуватися до відповідної теми, використовуючи рекомендовану літературу.

Працювати у лабораторії студент може тільки у присутності викладача або лаборанта.

У лабораторії слід дотримуватися тиші, чистоти, порядку розміщення обладнання, апаратури та реактивів. Забороняється виносити реактиви з приміщення, переносити їх з-під витяжної шафи, або титрувального столика.

Усі досліди з отруйними речовинами, або сполуками, що мають неприємний запах, слід проводити у витяжній шафі.

Під час нагрівання пробірок із розчинами відкриту частину пробірки слід спрямовувати від себе та від людей, що знаходяться поруч. Пробірку треба тримати спеціальним тримачем.

Під час перемішування рідини пробірку не слід закривати пальцем.

Під час роботи з концентрованими кислотами їх слід вливати у воду малими порціями. Під час роботи з концентрованими розчинами кислот і лугів необхідно користуватися захисними окулярами та гумовими рукавичками.

Не пробуйте реактиви на смак, не втягуйте піпеткою до рота невідому сполуку, оскільки вона може бути отруйною. Гази, що виділяються, потрібно вивчати здалеку, злегка спрямовуючи потік повітря від пробірки до себе. Не вдихайте глибоко виділені газу або пару.

Реактиви необхідно зберігати у закритому посуді з етикеткою, де зазначена назва, формула і концентрація речовини.

Забороняється виливати у раковини вмивальників залишки розчинів, що містять концентровані кислоти. Їх слід зливати у спеціальні ємності, які знаходяться у витяжній шафі або поряд із раковиною вмивальника.

Працювати з речовинами, що подразнюють органи дихання або мають сильний запах, слід під витяжною шафою.

Сипкі реактиви треба набирати спеціальними ложечками або шпателем.

Під час роботи у лабораторії категорично забороняється залишати без нагляду установки, що працюють, а також електричні нагрівальні прилади.

Не викидайте у раковини вмивальників використані фільтри, папір, вату, розбиті пробірки та уламки скла.

У разі виникнення пожежі необхідно: негайно відключити газову магістраль, вимкнути рубильники електромережі, прибрати у безпечне місце горючі речовини, вогнегасником загасити полум'я або засипати піском чи накрити азбестовим покривалом.

Виходячи з лабораторії, обов'язково слід вимкнути газ, електронагрівальні прилади, закрити водопровідний кран і витяжну шафу.

2. ОСОБЛИВОСТІ ВІДБОРУ ПРОБ РІЗНИХ БІОБ'ЄКТІВ ДЛЯ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Природне середовище перебування організмів накладає відбиток на їх анатомію, фізіологію і біохімію. Хімічні процеси, що відбуваються у різних організмів, пристосовані саме до перебування їх у відповідному наавколишньому середовищі. Наприклад, на відміну від ссавців, риби - холонокровні організми і метаболізм у їх організмах залежить від температури навколишнього середовища. У риб дуже чітко проявляється анатомічна гетерогенність хімічного складу.

Основними об'єктами біохімічних досліджень є різні тканини, біологічні рідини (кров, плазма, сироватка, лімфа, рідше – інші рідини внутрішніх середовищ організму (спинномозкова рідина, внутрішньосуглобова рідина і т.п.) і екскрети (сеча, жовч, слина, шлунковий та кишковий сік, кал, піт, молоко, сім'яна рідина).

Кров рекомендовано брати вранці до годівлі та до фізичного навантаження. Для виконання тестів взяття крові проводять після 8 – 12 год голодування, а для визначення триацилгліцеролів необхідно витримувати 10 – 12-годинний інтервал після вживання корму.

Стан тіла впливає на концентрацію загального білка, альбуміну, креатину, холестеролу, триацилгліцеролів, на активність лужної фосфатази, аспартатамінотрансферази та інших компонентів плазми. Вміст цих речовин та активність ферментів істотно підвищуються при зміні положення тіла з горизонтального на вертикальне і, навпаки, зменшуються – у горизонтальному. Максимальна зміна характерна для рівня загального білка, активності ферментів (11 %) та вмісту кальцію (3 – 4 %).

При взятті крові шляхом венопункції час здавлювання судин джгутом по можливості має бути мінімальним, оскільки стискування судини спричиняє стаз і гіпоксію, а також зсув у розподілі деяких ре-

човин (холестеролу, калію, натрію, кальцію та ін.) між форменними елементами крові та її рідкою частиною.

Для запобігання гемолізу кров необхідно брати сухим шприцем, сухою голкою (однаразового використання), у суху пробірку й у стерильних умовах. Якщо набрана шприцем кров переноситься у пробірку, то цю процедуру здійснюють повільно, щоб запобігти спінюванню крові.

Гемолізовані сироватку і плазму не рекомендується використовувати для аналізу, окрім деяких випадків (наприклад, гемолізати можна використати для визначення активності фруктозомонофосфатальдолази, вмісту глюкози та деяких інших тестів).

Проби тканин потрібно відбирати тільки з одного, заздалегідь вибраного місця на тілі тварин для того, щоб потім їх можна було порівняти. Потрібно відділяти сполучну тканину від м'язової. Тоненька плівка сполучної тканини пов'язує в одне ціле клітини, які знаходяться поряд, а проміжки між ними заповнені міжклітинною рідиною. Таким чином, будь яка проба м'язів буде мати деяку кількість сполучної тканини, не враховуючи того колагену, який є в оболонках м'язових клітин. У зв'язку з цим у відпрепарованих м'язах міститься 0,2-0,4% гідроксипроліну – амінокислоти, яка присутня тільки у колагенових оболонках. Наприклад, у різних частинах тіла риби міститься і різна кількість мінеральних речовин. Так, було виявлено, що у хвостовій частині вміст Na^+ більший, а K^+ – менший, ніж у інших частинах філе. Але в деяких риб спостерігається вищий вміст і Na^+ і K^+ у хвостовій частині. Вміст глікогену, наприклад, збільшується від головної до серединної частини тіла, а потім знижується у хвостовій частині в м'язах *Gadus morhua* і *Auxis tapeinosoma*. Ці дані говорять про те, що обов'язково треба вказувати місце взяття проби для аналізу і вид досліджуваних організмів.

Неоднорідною є й умовно чиста м'язова тканина. Хоча клітинна стінка відносно тонка, вона також складається із зовсім іншої речовини, ніж вміст клітини – в основному з волокон колагену. Таку гетерогенність також можна усунути препаруванням, хоча при цьому може бути дуже маленька проба. При взятті проб також важливо враховувати таку особливість, як різний діаметр окремих м'язових клітин.

Суттєві відмінності спостерігаються також у біохімічних показниках білих і червоних м'язів організмів. Тому змішувати в одну пробу м'язової тканини білі і червоні м'язи недопустимо. За хімічним складом відрізняються навіть одні й ті ж самі м'язи, але розташовані на поверхні й у глибині тіла тварини.

За винятком крові, майже всі тканини тварин беруть для аналізу після її загибелі. Щоб отримати наближені до фізіологічних параметрів значення певного показника, намагаються взяти пробу відразу з ж після забою тварин, птахів чи вилову риби, але навіть це не може забезпечити надійність результату. Вміст білка, води, ліпідів, вітамінів не змінюється при стресах, тому його можна визначити у відібраному біологічному матеріалі. Якщо свіжий матеріал недоступний, для визначення основних компонентів можна використати заморожений матеріал. Вміст білка і ліпідів також легко визначається у зразках тканин, які зберігались у замороженому стані.

Слід враховувати, що вміст багатьох хімічних речовин у тілі у період спокою не є постійним, а змінюється під впливом ендогенних факторів, чинників природного оточення, в залежності від віку тварини або характеру її живлення та утримання.

3. ВУГЛЕВОДИ ОРГАНІЗМІВ

Вуглеводи широко поширені в природі, особливо у рослинному світі. У тваринному організмі зустрічаються тільки глюкоза, галактоза, фруктоза, деякі з пентоз - рибоза й дезоксирибоза і полісахарид – глікоген. До вуглеводів відносяться альдегідоспирти чи кетоноспирти, які здатні до оксоциклотаутомерії, а також їх олігомери та полімери.

Маючи карбонільні $\left(\text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} \begin{array}{l} \diagdown \\ \text{R}_1(\text{H}) \end{array} \right)$ та спиртові ($-\text{OH}$) групи,

одночасно виявляють властивості альдегідів або кетонів і спиртів.

Вуглеводи поділяються на дві групи: прості і складні.

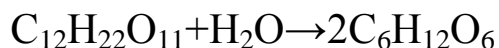
Прості вуглеводи – моносахариди загальної формули $\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O}_n$. при нагріванні з розведеними кислотами не розпадаються на більш прості.

Серед моносахаридів найбільше значення мають гексози, пентози.

Складні вуглеводи у свою чергу поділяються на олігосахариди і полісахариди.

Олігосахариди являють собою димери, тримери, тетрамери побудовані із залишків моносахаридів.

При кислотному або ферментативному гідролізі вони розпадаються на моносахариди. Наприклад:



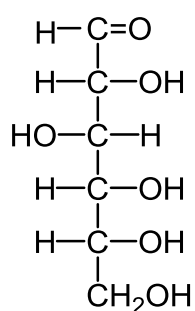
Моносахариди і олігосахариди – тіла кристалічні, мають солодкий смак (глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза), без кольору і запаху. Вони легко розчиняються у воді, погано у спирті і не розчиняються в діетиловому етері. Всі природні моносахариди через наявність у їх

молекулі асиметричних атомів Карбону оптично активні і тому у водних розчинах обертають площину поляризації поляризованого променя. За наявності вільних альдегідних і кетонних груп мають сильні відновлюючі властивості й утворюють погано розчинні сполуки з фенілгідразином, за допомогою яких можна відрізнити одні цукри від інших. Вуглеводи можуть також піддаватися різним видам бродіння (спиртове, молочнокисле, оцтовокисле, маслянокисле, метанове й ін.), тобто зазнавати різноманітні хімічні перетворення під впливом ферментів мікроорганізмів.

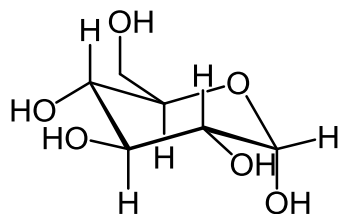
Вуглеводи відкладаються в печінці у вигляді глікогену – полісахариду, що складається з залишків молекул глюкози. Коли виникає необхідність у енергії для м'язових скорочень, глікоген розщеплюється і транспортується в м'язи у вигляді глюкози. При надходженні до м'язів глюкоза може бути використана відразу, або бути ресинтезованою у глікоген. Таким чином, глюкоза і глікоген можуть одночасно знаходитися у м'язах, але в крові знаходиться тільки глюкоза. З усіх енергетичних резервів найбільш швидко використовуються вуглеводи. В першу чергу вони утилізуються при виснаженні. У морських жолудів (*Balanus sp.*), якщо запаси вуглеводів значні, вони використовуються першими, але після того, як їх вміст зменшиться до 10% маси тіла, починають використовуватися білки і ліпіди. В організмі тварини вуглеводи є головним джерелом хімічної енергії. Окремі органи задовольняють свої потреби в основному в результаті розщеплення глюкози: головний мозок – на 80%, серце – на 70-75%.

3.1. Будова та метаболізм моносахаридів

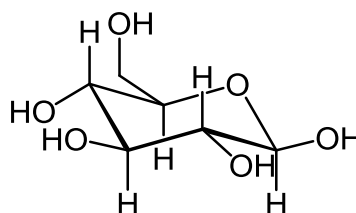
Найбільш важливими з простих цукрів - моносахаридів - у фізіологічному відношенні є гексози. Серед них глюкоза (виноградний цукор, декстроза) і фруктоза (плодовий цукор, левулоза).



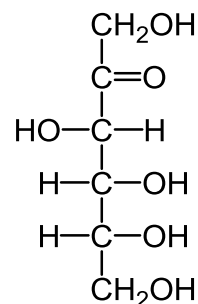
D-глюкоза



α ,D-глюкоза



β ,D-глюкоза



D-фруктоза

Усім моносахаридам притаманна оптична ізомерія, вони існують у двох енантіомерних формах: D і L. Належність моносахаридів до D- або L- ряду визначається за розташуванням OH-групи біля хірального атома Карбону, що має найбільший номер.

У живих організмах моносахариди присутні в основному у D – конфігурації, яку називають природною. Виключення складає L- арабіноза бактерій, L – рамноза і L – сорбоза рослин.

Вміст глюкози у крові деяких видів риб, навпаки, підтримується на постійному рівні під час довгого періоду голодування. У тріски *Gadus morhua* вміст глюкози в крові знижується у перші 37 днів голодування з 108 до 72%, а потім залишається на цьому рівні впродовж наступних семи тижнів голодування.

Кетози - моносахариди із загальною формулою $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Представником кетогексоз є фруктоза (плодовий цукор, левулоза). У вільному стані у тваринному організмі вона зустрічається рідко. Входить до складу дисахариду – тростинного цукру. Дає, як і глюкоза, реакції відновлення йонів металів. Як відомо, окиснення кетонів спряжене з розривом молекули, на що потрібна витрата великої кількості енергії, отже, потрібен більш сильний окиснювач. Під впливом дріжджів фруктоза бродить, але повільніше глюкози. Площину поляризованого світла обертає вліво. З фенілгідразином утворює відповідний озазон, ідентичний із кристалами глюкозозазону.

Пентози – моносахариди (арабіноза, ксилоза, рибоза) із загальною формулою $C_5H_{10}O_5$, рослинного походження. Входять до складу полісахаридів – пентозанів у деревині, висівках і т.п. У тваринному організмі пентози – рибоза і дезоксирибоза є складовою частиною нуклеїнових кислот. Іноді можуть у вільному стані з'являтися у сечі хворих тварин. Пентози – речовини кристалічні, солодкого смаку, дають, як і гексози, реакції відновлення металів, утворюють озазони, але із дріжджами не бродять.

Глюкоза може надходити у тваринний організм у готовому вигляді чи утворюватись при гідролізі олігосахаридів і полісахаридів за участі амілолітичних ферментів: амілази, мальтази, сахарази, лактази, інвертази. Гексози всмоктуються головним чином у тонкому кишечнику у вигляді гексозофосфатів. Процес всмоктування активується йонами Na^+ , які створюють натрієвий насос, що забезпечує активне транспортування моносахаридів крізь мембрани ентероцита.

Моносахариди крові використовуються для різних потреб організму – енергетичних, пластичних, захисних тощо. Глюкоза знаходиться у вільному і зв'язаному станах. У деяких випадках кількість зв'язаної глюкози сягає 40-50% загального її вмісту в крові. Глюкоза є одним із найважливіших компонентів крові. Її кількість у крові свідчить про стан вуглеводного обміну в організмі. Глюкоза майже порівну розподіляється між плазмою і форменими елементами крові з деяким перевищенням її концентрації в плазмі. Вміст глюкози в артеріальній крові вищий, ніж у венозній. Це пояснюється безперервним використанням глюкози клітинами тканин і органів.

Запас глікогену, що міститься у м'язах, повинен поповнюватися за рахунок глюкози крові. Якщо кількість глюкози, яка надходить з їжею або вилучається з глікогену печінки, виявляється недостатньою, то вона повинна синтезуватися з амінокислот.

Особливість метаболізму глюкози полягає також у тому, що певні тканини, в тому числі мозок, клітини крові, мозкова речовина нирок отримують практично всю необхідну для них енергію за рахунок окиснення глюкози. Тому вміст глюкози в крові не повинен бути нижче певного мінімального рівня.

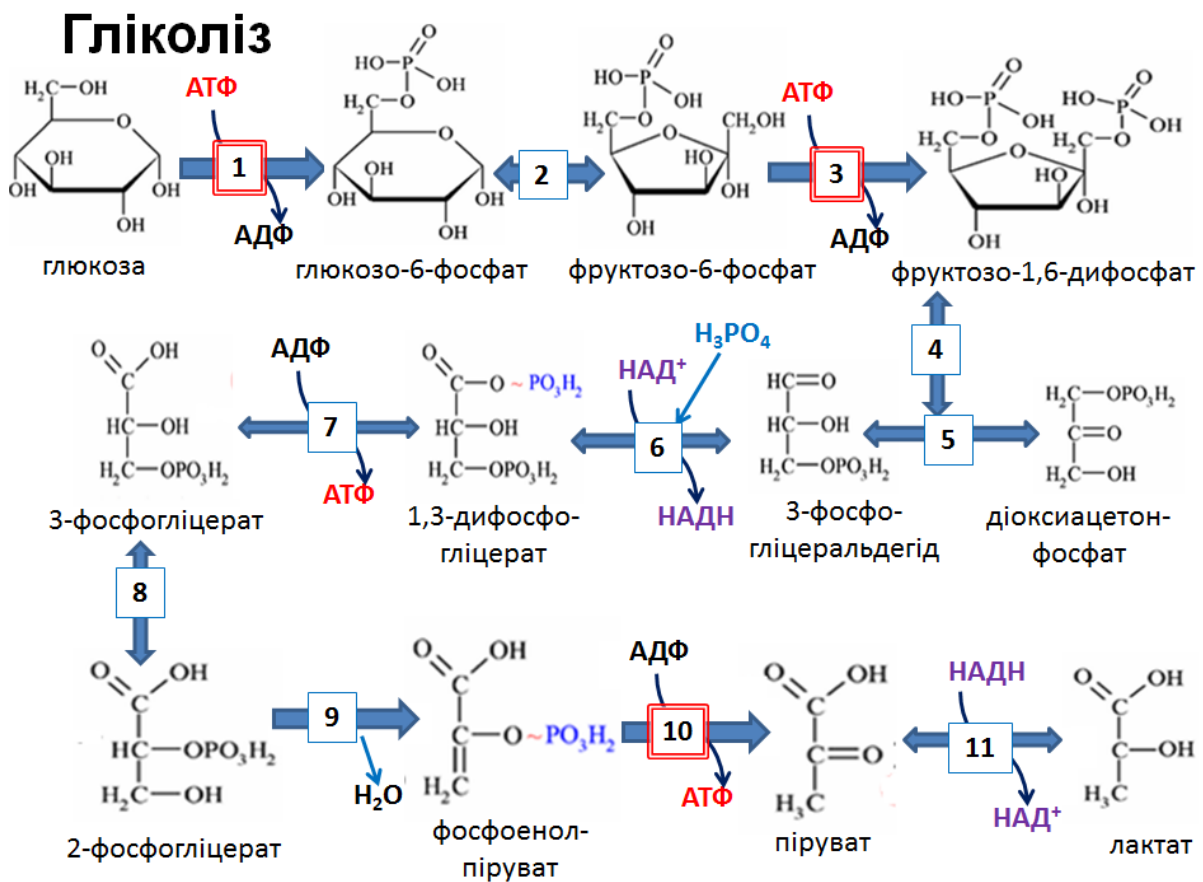
Рівень глюкози в крові регулюється центральною нервовою системою. Також на вміст глюкози впливають гормональні фактори і стан функції печінки. За цілого ряду станів може відбутися підвищення вмісту глюкози в крові – гіперглікемія, а також пониження її концентрації – гіпоглікемія. Гіперглікемія пов'язана перш за все з ураженням ендокринної системи. Різне підвищення вмісту глюкози в крові виникає в результаті недостатньої продукції інсуліну, який забезпечує нормальну проникність клітинних мембран для глюкози і регулює активність і синтез деяких ферментів вуглеводного обміну. Інсулін індукує синтез ферментів гліколізу – гексокінази, фосфофруктокінази, піруваткінази, а також є індуктором глікогенсинтетази. Недостатність інсуліну обумовлює зниження синтезу ключових ферментів гліколізу, а з іншого боку – прискорення синтезу ключових ферментів глюконеогенезу. Гіперглікемія може виникати не тільки як результат дефіциту інсуліну, але також і в результаті порушення функції інших ендокринних залоз, які беруть участь у регуляції вуглеводного обміну. Гіперглікемія може бути при гіпофізарних захворюваннях, при пухлинах кори надниркових залоз, гіперфункції щитовидної залози.

Окиснення глюкози і звільнення при цьому енергії може відбуватися як за участі кисню, так і без нього. Якщо процес відбувається за дихотомічним механізмом і призводить до перетворення глюкози в піруват з одночасним утворення АТФ, то він називається гліколізом. В аеробних умовах піруват проникає в мітохондрії, де через цикл Кребса і дихальний ланцюг ферментів повністю окиснюється до CO_2 і H_2O .

При недостатності кисню, як це може бути в м'язі, який активно скорочується, піруват перетворюється в молочну кислоту.

Отже, гліколіз – це не тільки основний шлях утилізації глюкози в клітинах, але й унікальний шлях, оскільки він може використовувати кисень, якщо останній доступний (аеробний гліколіз), але може відбуватися і при відсутності кисню (анаеробний гліколіз).

Анаеробний гліколіз – багатоступінчастий ферментативний процес розпаду глюкози, який протікає в тканинах тварин без використання кисню. Кінцевим продуктом цього гліколізу є лактат. У процесі гліколізу синтезується АТФ. Енергія, яка виділяється при окисненні одного моля глюкози в процесі анаеробного гліколізу, акумулюється у двох молях АТФ. Як анаеробний, так і аеробний гліколіз відбувається в гіалоплазмі клітини. Послідовність реакцій гліколізу (шлях Ембдена - Мейєргофа - Парнаса) має такий вигляд:



Частина лактату, що утворюється в м'язах і інших тканинах, надходить у кров і переноситься до печінки, де він знову окиснюється в піруват. Менша частина пірувату потім окиснюється в циклі трикарбонових і дикарбонових кислот (цикл Кребса), але більша частина знову перетворюється в глюкозу, яка може надходити в кров і повертатися у м'язи. Увесь цей процес називається циклом Корі.

Процес анаеробного розпаду глікогену називається глікогенолізом. Глікоген зосереджується в основному в печінці і в скелетних м'язах. Глікоген міститься в цитозолі у формі гранул. Ці гранули, крім глікогену, містять і ферменти, які каталізують синтез і розпад глікогену в клітині, який здійснюється різними метаболічними шляхами.

У процесі глікогенолізу під дією ферменту фосфорилази а за участі фосфатної кислоти відбувається фосфороліз крайнього глікозидного зв'язку між залишками глюкози з невідновлюючого кінця глікогену. При цьому від глікогену відщеплюється один залишок глюкози у вигляді глюкозо-1-фосфату. Далі під дією ферменту фосфоглюкомутази глюкозо-1-фосфат ізомеризується в глюкозо-6-фосфат. Глюкозо-6-фосфат вступає в ряд послідовних перетворень як і при гліколізі.

У процесі глікогенолізу енергетичний ефект складає 3 молекули АТФ, бо, на відміну від гліколізу, не витрачається АТФ на утворення глюкозо-6-фосфату.

Завдяки здатності накопичувати глікоген головним чином у печінці і м'язах, і в меншій мірі в інших органах і тканинах, створюються умови для деякого резерву вуглеводів. При підвищенні енергозатрат в організмі відбувається розпад глікогену й утворення глюкози.

Метаболізм вуглеводів в організмі риб має багато спільного з наземними тваринами, хоча і є певні відмінності. Риби в більшості випадків уникають корму, що містить багато вуглеводів, за винятком рослиноїдних видів. Склад корму прісноводних риб мало впливає на

вміст цукру в крові. Збільшення вмісту вуглеводів у кормі призводить до відповідного збільшення їх вмісту в тканинах риб.

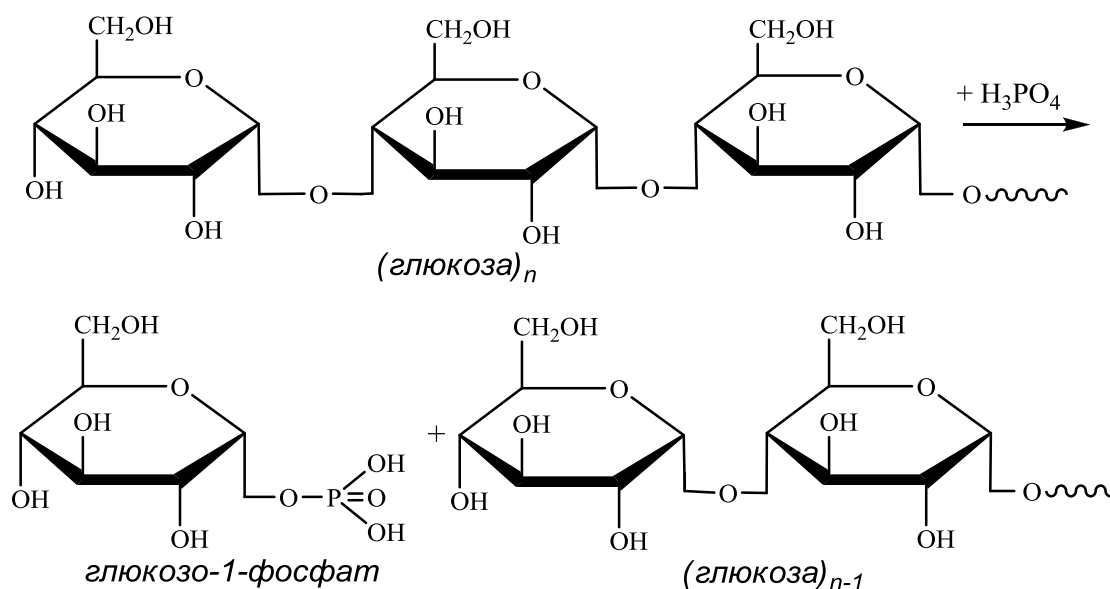
При високому вмісті вуглеводів у кормі збільшується вміст глюкози в крові тварин, але відсутність вуглеводів у кормі не викликає його зниження, тому що глюкоза надходить з резервів печінки. При значному вмісті вуглеводів у кормі збільшується вміст глікогену в м'язах. Вуглеводи можуть бути використані рибою як джерело енергії. Але ефективність їх засвоєння низька.

Тривале м'язове навантаження різко зменшує рівень глікогену в білих м'язах і збільшує в червоних. Разом з тим, різке збільшення молочної кислоти в червоних м'язах свідчить про інтенсивний вуглеводний обмін у них. Можливо, червоні м'язи мають здатність до прискореного ресинтезу глікогену. У червоних м'язах більш висока активність ліпази, ніж у білих. З цього можна зробити висновок, що червоні м'язи характеризуються аеробним метаболізмом з використанням ліпідів як джерела енергії, тоді як білі м'язи мають анаеробний тип обміну і використовують як джерело енергії глікоген.

Метаболізм глікогену в скелетних м'язах значно відрізняється від його метаболізму в печінці. М'язи у стані спокою незалежно від надходження глюкози здатні накопичувати глікоген у кількостях, що відповідають не більш як 1%-ному розчину, і повинні розщеплювати глікоген дуже швидко, коли внутрішньоклітинна концентрація АТФ знижується у зв'язку з використанням АТФ у процесі м'язового скорочення. У печінці глікоген може накопичуватися у значно більших кількостях, що відповідає 5%-ному розчину, якщо вміст глюкози в крові є в межах норми або підвищений. У печінці глікоген може розщеплюватись до глюкози з виходом її в кров'яне русло, коли вміст глюкози в крові нижче норми. Цей процес у печінці може відбуватися досить швидко, але не може зрівнятися з майже вибухоподібною

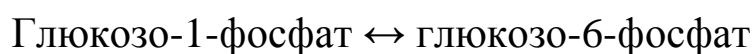
швидкістю звільнення глюкозо-1-фосфату з глікогену у м'язах, що скорочуються.

Реакція, завдяки якій стає доступною глюкоза глікогену, каталізується ферментом глікогенфосфорилазою і являє собою фосфороліз з утворенням глюкозо-1-фосфату:



Фосфорилаза відщеплює глюкозні мономери у вигляді глюкозо-1-фосфату до тих пір, доки на кожному розгалуженні ланцюга перед точкою розгалуження залишається чотири залишки глюкози. Тоді дія фосфорилази припиняється. Гідролітичне відщеплення глюкози з 1→6-зв'язку в точці розгалуження під дією α-1,6-глюкозидази дає можливість продовження фосфоролізу до наступної точки розгалуження. Фосфорилаза може розщеплювати тільки α-(1→4)- глікозидні зв'язки.

Глюкозо-1-фосфат, що утворюється під дією фосфорилази, далі йде за гліколітичним шляхом перетворень після дії фосфоглюкомутази, яка каталізує реакцію:



Глікоген легко гідролізується α-і β-амілазами, які відщеплюють від нього відповідні молекули глюкози і мальтози. Обидві амілази

розщеплюють гідролітичним шляхом тільки α -(1→4)- глікозидні зв'язки в молекулі глікогену і не діють на α -(1→6)-зв'язки. Тому кінцевим продуктом дії амілаз на глікоген є сильно розгалужена так звана серцевина полісахариду, яка називається залишковим декстрином. Коли α -(1→6) зв'язок у залишковому декстрині буде розщеплений α -(1→6)-глюкозидазами, тоді подальший розпад глікогену може відбуватися як під дією фосфорилаз, так і за участі амілаз.

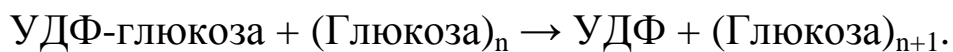
Біосинтез глікогену включає наступні стадії. За участі ферменту глюкокінази відбувається активація глюкози за рахунок енергії АТФ:



Далі глюкозо-6-фосфат під дією фосфоглюкомутази ізомеризується у глюкозо-1-фосфат. Глюкозо-1-фосфат взаємодіє з уридинтрифосфатом. Реакція каталізується ферментом глюкозо-1-фосфатуридилтрансферазою:



Глюкозильна група уридиндифосфоглюкози переноситься на кінцевий залишок глюкози олігосахаридного ланцюга („затравочного глікогену”) з нередукуючого кінця; при цьому утворюється α -(1→4)-глікозидний зв'язок між першим атомом Карбону глюкозильного залишку, що додається, і 4-гідроксильною групою кінцевого залишку глюкози олігосахаридного ланцюга. Ця реакція каталізується ферментом глікогенсинтетазою:



Відбувається подовження олігосахаридного ланцюга ще на один залишок глюкози.

Глікогенсинтетаза не каталізує утворення α -(1→6)-зв'язків, які характерні для точок розгалуження ланцюгів глікогену. Є спеціальний фермент розгалуження ланцюга глікогену – аміло-(1,4→1,6)-трансглікозилаза, яка присутня в багатьох тканинах тварин. Цей фермент каталізує перенесення кінцевого олігосахаридного фрагмента, що

складається з 6-7 глікозильних залишків, з кінця головного ланцюга глікогену на 6-гідроксильну групу глюкози того ж чи іншого ланцюга глікогену. Таким чином утворюється α -(1 \rightarrow 6)- зв'язок і з'являється точка розгалуження ланцюга глікогену.

Синтез глікогену регулюється, передусім, гормонами адреналіном і глюкагоном. Адреналін прискорює розпад глікогену в печінці; при цьому збільшується рівень глюкози в крові. Дія адреналіну обумовлена стимуляцією глікогенфосфорилазної активності і пригніченні глікогенсинтетазної активності. Адреналін активує фермент аденілатциклазу, внаслідок чого відбувається синтез із АТФ циклічної АМФ (3',5'-АМФ). Циклічна АМФ активує кіназу фосфорилази, яка в свою чергу фосфорилує неактивну глікогенфосфорилазу b. Утворена при цьому активна фосфорилаза а каталізує розпад глікогену з утворенням глюкозо-1-фосфату.

З іншого боку, циклічна аденозінова кислота активує кіназу глікогенсинтетази, що каталізує утворення неактивної фосфорильованої форми глікогенсинтетази.

Аналогічні зміни викликає адреналін у м'язах, але, оскільки м'язи не можуть виділяти глюкозу в кров, то кінцевий ефект дії адреналіну полягає в стимуляції гліколізу і дихання в м'язовій тканині.

Гормон глюкагон, який секретується α -клітинами підшлункової залози, також підвищує рівень глюкози в крові і знижує рівень глікогену в печінці, але не впливає на вуглеводний обмін у м'язах. Глюкагон стимулює аденілатциклазу печінки, прискорюючи тим самим розпад глікогену до глюкози і пригнічуючи синтез глікогену з УДФ-глюкози.

Швидкість синтезу й розпаду глікогену в м'язах змінюється не тільки під впливом гормонів, але також залежить від концентрації Ca^{2+} і інших факторів. У м'язах, що знаходяться у стані спокою, переважає активна (нефосфорильована) форма глікогенсинтетази і відносно не-

активна *b*-форма глікогенфосфорилази, тоді як у м'язах, що активно скорочуються, переважають відносно неактивна (фосфорильована) форма глікогенсинтетази і активна *a*-форма глікогенфосфорилази.

3.2. Будова та властивості дисахаридів

Дисахариди мають загальну формулу $C_{12}H_{22}O_{11}$. Вони утворюються з двох молекул моносахаридів при взаємодії або двох глікозидних гідроксилів (сахароза), або глікозидного гідроксилу однієї гексози і спиртового гідроксилу іншої (мальтоза, лактоза, целобіоза) з виділенням молекули води. Сполуки першого типу не мають вільних карбонільних груп і внаслідок цього не дають реакцій, властивих моносахаридам (реакції відновлення металів, утворення озонів й ін.). Сполуки другого типу мають одну карбонільну групу вільну і тому дають всі реакції, характерні для моносахаридів.

З'єднання молекул гексоз у дисахаридах відбувається за рахунок глікозидних зв'язків. При гідролітичному розщепленні (як кислотному, так і ферментативному) дисахариди розпадаються на дві гексози:

1. Сахароза (тростинний цукор) → глюкозу і фруктозу
2. Мальтоза (солодовий цукор) → глюкозу і глюкозу
3. Лактоза (молочний цукор) → глюкозу і галактозу
4. Целобіоза → α -глюкозу та β -глюкозу

3.3. Будова та метаболізм полісахаридів

Основна маса всіх вуглеводів, що зустрічаються у природі, існує у вигляді полісахаридів. З точки зору функціонального значення полісахариди можна розділити на дві основні групи. Перша група, у яку входить, наприклад, целюлоза, виконує головним чином структурну функцію. Друга група (представник – глікоген), виконує функції, пов'язані з живленням. З точки зору загальних принципів будови полісахариди підрозділяються на дві групи: гомополісахариди і

гетерополісахариди. Перша група характеризується наявністю у складі молекули тільки одного виду моносахариду (крохмаль, що складається тільки з залишків D-глюкози). Для другої групи характерна наявність двох або більше типів мономерних ланок (гіалуронова кислота, яка складається з залишків аміносахарів та гексуронових кислот), і є наявною в усіх видах сполучної тканини.

Головними резервними полісахаридами рослин і тварин є відповідно крохмаль і глікоген, які відкладаються в цитоплазмі клітин.

Крохмаль існує у двох формах, а саме у формі α -амілози і формі β -амілози (амілопектину). α -Амілоза складається з довгих нерозгалужених ланцюгів, у яких всі D-глюкозні одиниці сполучені α (1 \rightarrow 4) – зв'язками. Ланцюги ці полідисперсні; їх відносна молекулярна маса складає від декількох тисяч до 500000. Ланцюги амілопектину дуже розгалужені, молекули також мають глікозидні зв'язки α (1 \rightarrow 4) – типу, але у точках розгалуження зв'язки належать до α (1 \rightarrow 6) – типу. Відносна молекулярна маса амілопектину може досягати 1млн.

Основні компоненти крохмалю гідролізуються ферментативним шляхом двома різними способами. Амілоза гідролізується за участі ферменту α -амілази (α -(1 \rightarrow 4)-глюкан-4-глюкангідролази, EC3.2.1.1). Цей фермент знаходиться у підшлунковій залозі, входить до складу слини, бере участь у перетравлюванні крохмалю у шлунково – кишковому тракту. Він гідролізує α -(1 \rightarrow 4)-зв'язки амілозних ланцюгів шляхом атак у випадкових точках, розташованих далеко від кінців полісахаридного ланцюга, з утворенням коротких полісахаридних ланцюгів (декстринів) і простих цукрів (глюкози і мальтози). α -Амілази виявлені як у рослинах, так і у тваринах. Можливо, всім α -амілазам необхідні хлорид-іони, які діють як активатори. Проте їх роль у механізмі дії ферменту не вивчена. Крім того, амілоза може бути гідролізована за участі ферменту β -амілази (α -(1 \rightarrow 4)-глюкан-мальтогідролази, (EC 3.2.1.2.). β -Амілази є типовими ферментами рослин і діють за екзоти-

пом, послідовно відщеплюючи залишки мальтози з нередукуючого кінця полісахаридного ланцюга.

Амілопектин також гідролізується α - і β -амілазами, проте, внаслідок того, що ні α -амілаза, ні β -амілаза не здатні розщеплювати α -(1 \rightarrow 6)-зв'язки у точках розгалуження амілопектину, кінцевим продуктом при дії амілаз на амілопектин є сильно розгалужена частина полісахариду, яка називається залишковим декстрином. А α -(1 \rightarrow 6)-зв'язки, що знаходяться у точках розгалуження, гідролізуються ферментами α -(1 \rightarrow 6)-глюкозидазами.

Таким чином, при сумісній дії α -амілази і α -(1 \rightarrow 6)-глюкозидази амілопектин може бути повністю розщеплений на глюкозу і мальтозу.

Глікоген, або тваринний крохмаль, відноситься до полісахаридів. Знаходиться головним чином у печінці хребетних тварин, а також в інших органах і витрачається за потребою, будучи одним з найважливіших джерел енергії. Вміст глікогену становить 1-4% маси печінки, але може досягти 20%. У формі глікогену в організмі відкладаються значні запаси потенційної енергії.

Як і амілопектин, глікоген являє собою полісахарид, у якому D-глюкозні одиниці сполучені α -(1 \rightarrow 4)- зв'язками, а у місцях розгалуження – α -(1 \rightarrow 6)- зв'язками. Але від амілопектину глікоген відрізняється більш високою розгалуженістю. Точки розгалуження розташовані у нього через кожні 8-10 залишків D-глюкози. Зв'язки в точках розгалуження належать до α -(1 \rightarrow 6) – типу. Велика розгалуженість молекул глікогену забезпечує швидке звільнення значної кількості глюкозних одиниць із нередукуючих кінців у той момент, коли при м'язовому скороченні різко зростає потреба в АТФ, який генерується при окисненні глюкози. Відносна молекулярна маса глікогену – від 270 до 100 000 кДа.

Глікоген легко гідролізується α - і β - амілазами, які відщеплюють від нього відповідно глюкозу і мальтозу; у даному випадку також утворюється залишковий декстрин.

Глікоген має багато загальних властивостей із крохмалем. Подібно до білків, осаджується подвійним об'ємом спирту й етером у вигляді білого пластівчастого осаду; через що осад, отриманий при висолуванні рідин організму, повинен бути досліджений на полісахариди. Його промивають насиченим розчином відповідної солі, розчиняють у воді й випробовують реакцією з йодом.

На відміну від крохмалю, глікоген розчиняється у гарячій воді, не утворюючи клейстеру, а утворюючи сильно опалесцентні розчини. З йодом глікоген дає не синє, а червоно-буре забарвлення, що зникає при нагріванні і знову з'являється при охолодженні.

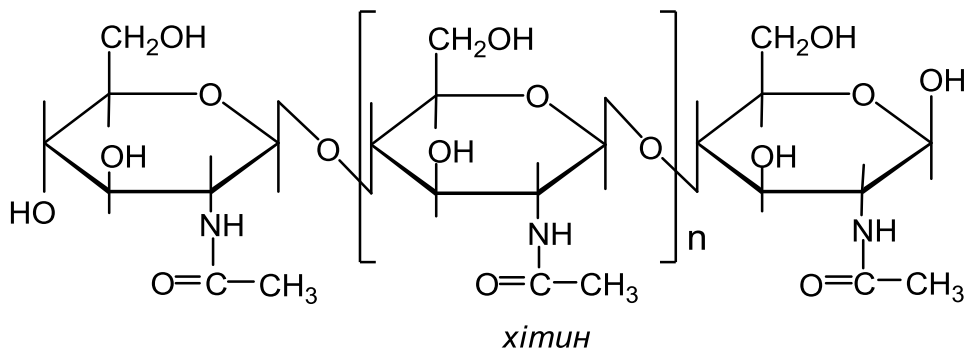
Розчин глікогену, якщо він не містить домішки цукрів, що редукують, і декстринів, не дає реакції відновлення металів.

Тварини, які отримують харчування порціями, накопичують глікоген головним чином у печінці і м'язах, хоча він зустрічається і в багатьох інших органах. Коли зменшується кількість глікогену, відбуваються процеси печінкового і ниркового глюконеогенезу, які важливі не тільки для покриття енергетичних потреб цих органів, скільки для того, щоб забезпечити безперервний притік глюкози до нервової тканини, яка без цього не може функціонувати, і до скелетних м'язів для того, щоб, доки вони знаходяться у стані спокою, максимально забезпечити їх глікогеном, який міг би бути використаний як вихідний матеріал в анаеробному гліколізі при їх скороченні.

Важливою особливістю глікогену є те, що він при сприятливих умовах може накопичуватись, а в разі потреби у глюкозі розщеплюватись. У синтезі і розщепленні глікогену беруть участь різні, незалежні одна від одної ферментні системи. Обидва ці процеси регулюються таким чином, що можуть відбуватися у відповідності з потребами

клітин в даний конкретний момент 3 усіх енергетичних резервів найбільш швидко використовуються вуглеводи. У першу чергу вони утилізуються при голодуванні. При голодуванні тварин у першу чергу знижується вміст глікогену, а вже потім – ліпідів і білка. Так, наприклад, печінка лосося *Salmo salar* на початку нерестової міграції містила близько 2% глікогену, а печінка виснажених самок, які поверталися у море – тільки десяту частину цієї кількості. Глікоген є головним резервом тварин. Він відкладається в цитоплазмі клітин у вигляді досить крупних гранул, що являють собою зв'язані між собою полісахаридні молекули. Особливо багато глікогену в печінці і м'язах тварин.

Подібно до целюлози побудовані молекули хітину, що мають ацетамідні групи біля другого атома Карбону кожної ангідроглюкозної ланки. Щільне упакування молекули хітину і його дещо підвищена гідрофобність у порівнянні з целюлозою є причинами його невисокої реакційної здатності. Целюлоза і хітин характеризуються нерозгалуженими ланцюгами. Хітин є основою зовнішнього скелету ракоподібних, а також присутній в рогових оболонках комах та в деяких грибах. Плівки з хітину за міцністю не поступаються целюлозним.



3.4. Біоресурси полісахаридів у природі

Невичерпність біоресурсів полісахаридів у природі суттєво доповнюється джерелами їх біосинтезу у водних просторах планети. До водоростей відносяться тільки нижчі рослини, тобто морфологічно просто побудовані організми, які не розчленовані на стебло, корінь і

листя. Значна кількість видів водоростей є мікроскопічними одноклітинними формами; часто відбувається об'єднання клітин у ниткоподібні або сфероподібні колонії; широко розповсюджені і справжні багатоклітинні водорості. Серед морських багатоклітинних водоростей зустрічаються рослини – гіганти, що досягають у довжину десятків метрів.

Водорості утворюють приблизно стільки ж органічної речовини, що і наземні рослини. Потребуючи сонячного світла, водорості не можуть жити на надто великих глибинах. Одноклітинні водорості можуть вільно плавати у поверхневому шарі води, утворюючи фітопланктон. Він є основою харчової піраміди, вершину якої займають хижі морські безхребетні, риби і ссавці.

Великі багатоклітинні водорості (макрофіти), як правило, ростуть, прикріпившись до міцного субстрату. Вони представляють собою фітобентос і зустрічаються вздовж узбережжя інколи у великих кількостях. Такі зарості водоростей забезпечують тварин не тільки їжею, але й укриттям, а також місцем для розмноження.

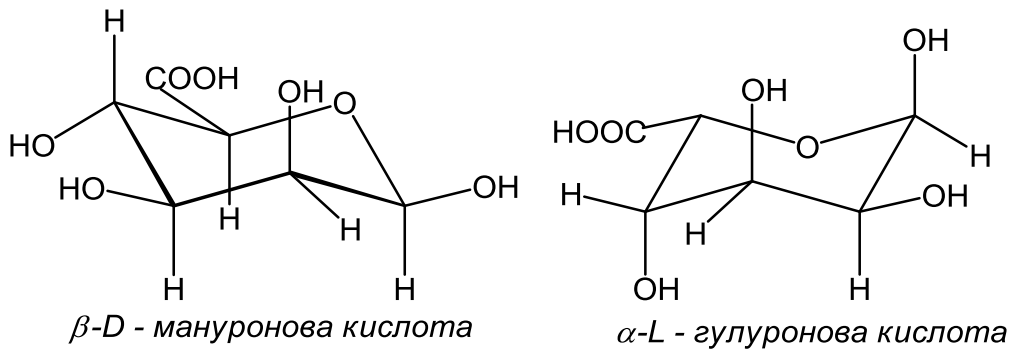
Як і в наземних рослин, основним компонентом біомаси водоростей є вуглеводи. Вони є енергетичним резервом і виконують роль опорних структур, беруть участь у побудові клітинних стінок і утворюють міжклітинну речовину. Синьо-зелені водорості нагадують у цьому відношенні грамнегативні бактерії, а червоні водорості стоять осторонь, оскільки містять сульфатовані галактани, які ніде більш у природі не зустрічаються. Унікальні сульфатовані полісахариди є також у бурих, золотистих, діатомових і морських зелених водоростях. Взагалі наявність сульфатних груп у полісахаридах – це властивість морських рослин і для наземних рослин не характерна. Бурі водорості містять альгінові кислоти – поліуроніди. Целюлоза, яка відіграє найважливішу роль у побудові клітинних стінок наземних рослин, у багатьох водоростей зустрічається рідко, а може і повністю бути відсут-

ня. І тільки у зелених водоростях, які найбільш наближені за метаболізмом до наземних рослин, наявні геміцелюлози і пектинові речовини – полісахариди, характерні для клітинних стінок вищих рослин.

Бурі, червоні, зелені і харові водорості відносяться до макрофітів. Із бурих водоростей виділяють альгінові кислоти і їх солі – альгінати, а з червоних - агар або карагінан. Незважаючи на різну хімічну природу, ці полісахариди виконують у водоростях подібні біологічні функції: вони асоційовані з клітинною стінкою, входять до складу міжклітинної речовини, призначення якої – цементувати клітини і забезпечувати цілісність і механічну міцність всієї рослини, адже водорості у припливній зоні моря постійно сприймають велике механічне навантаження. Інша важлива функція їх пов'язана з йонообмінними властивостями цих полімерів, яка допомагає клітинам захищатись від небажаних катіонів або, навпаки, концентрувати необхідні. Неабияке значення для водоростей, що оголюються при відпливах, має здатність полісахаридів утримувати великі кількості води і тим самим захищати клітини від висихання.

Бурі водорості містять полісахариди трьох типів. Резервною речовиною є ламінаран, порівняно низькомолекулярний глюкан (ступінь полімеризації 20-50), в якому залишки D-глюкози сполучені між собою β -(1→3), рідше β -(1→6) – зв'язками, а на „відновлюючому кінці” деяких молекул може бути залишок маніту. До складу клітинних стінок входять сульфатовані фукоглікани, досить складні полісахариди з високим вмістом сульфатних груп, вуглеводна частина яких побудована переважно із залишків L- фруктози, але може також містити галактозу, ксилозу, уронові кислоти. Проте головним полісахаридом бурих водоростей є альгінові кислоти.

Молекули альгінових кислот лінійні і побудовані із залишків двох гексуронових кислот: β -D- мануронової і α -L-гулууронової, сполучених 1→4-зв'язками.



Співвідношення між двома мономерами у різних зразках альгінових кислот змінюються у досить значних межах (M/G від 0,4 до 20), а інколи вдається виділити майже чисту полімануронову кислоту. Це співвідношення визначається не стільки таксономічним положенням водорості – джерела кислоти, скільки умовами зростання, віком рослини, локалізацією полімеру в різних частинах рослини, які виконують різні функції.

Альгінові кислоти проявляють специфічну спорідненість до дво зарядних катіонів, особливо до йона Ca^{2+} , в присутності якого вони утворюють стійкі гелі.

Залишки мануронової і гулурунової кислот у складі альгінової кислоти відрізняються одна від одної тільки конфігурацією асиметричного центра C-5 і можуть взаємно перетворюватися шляхом епімеризації біля цього центра. Біосинтез альгінової кислоти починається побудовою полімерного ланцюга із залишків мануронової кислоти, після чого спеціальний фермент полімануронан-С-5-епімераза каталізує перетворення залишків мануронової кислоти у складі полімеру в залишки гулурунової кислоти.

Для видалення альгінових кислот водорості попередньо обробляють розведеними мінеральними кислотами; при цьому до розчину переходять ламінаран, фукоїдан і видаляються дво зарядні катіони, які перешкоджають розчиненню альгінових кислот. Самі ж

альгінові кислоти, які погано розчинні у кислому середовищі, переходять у розчин при наступній обробці залишку водоростей розведеним розчином лугу. При підкисненні лужного екстракту альгінові кислоти випадають в осад і можуть бути відділені і висушені або ж переведені в розчин додаванням еквівалентної кількості лугу. Висушування цього розчину дає розчинний у воді натрій альгінат.

Біоресурси альгінових кислот є значними. Вони містяться у всіх бурих водоростях і складають 30-40% сухої біомаси. Найбільш поширеним джерелом альгінової кислоти є гігантська водорість *Macrocystis pyrifera*. Крім того, альгінову кислоту отримують із двох видів ламінарії (*Laminaria digitata*, *Laminaria saccharina*) і *Ascophyllum nodosum*.

Щорічно у світі споживається біля двадцяти тисяч тонн альгінатів. Основними споживачами їх є харчова промисловість. Їх використовують також для виробництва бавовняних тканин, у виробництві якісних сортів паперу, в медицині для виготовлення пов'язок із альгінатів, для видалення з організму людини токсичних важких металів, у біотехнології.

Червоні водорості також містять полісахариди декількох типів. Резервною речовиною у них є флоридний крохмаль – розгалужений α -глюкан, аналогічний за будовою амілопектину крохмалю вищих рослин. Клітинні стінки червоних водоростей можуть містити невеликі кількості целюлози, ксилани, манани. Але найбільш відомі і корисні сульфатовані галактани – полісахариди, характерні тільки для червоних водоростей.

Молекули більшості галактанів лінійні і побудовані з похідних галактози з обов'язковим чергуванням зв'язків α -(1→3) і β -(1→4). Отже, ці полісахариди містять дисахаридні ланки, які повторюються. Галактани поділяють на дві великі групи у залежності від абсолютної конфігурації 4-0-заміщеного моносахаридного залишку у кожній

ланці: якщо він належить до L- ряду, то полісахарид відносять до групи агару, а якщо до D- ряду – то до групи карагінана. Сусідній 3-0-заміщений залишок галактози завжди має D-конфігурацію.

Регулярні полісахариди, молекули яких побудовані з дисахаридних ланок одного типу, що повторюються, мають власні назви. У групі агару – це агароза і порфіран; окремі представники групи карагінану позначаються літерами грецького алфавіту. Проте у реальних природних полісахаридах виявляються два і більше типів ланок, які повторюються. Природа цих ланок і їх розподілення вздовж ланцюга полімеру дуже впливають на фізико-хімічні властивості розчинів полісахаридів.

Біосинтез галактанів червоних водоростей, як і біосинтез альгінових кислот, включає стадії модифікації полімерних молекул, від яких залежать фізико-хімічні властивості кінцевого продукту. Спочатку утворюється полімерний ланцюг із залишків галактози із зв'язками α -(1→3) і β -(1→4) між ними, які чергуються, потім відбувається його ферментативне сульфатування і, нарешті, відщеплення сульфатних груп із положення 6 з одночасним замиканням 3,6 – ангідроциклів у 4-0- заміщених залишках галактози. У результаті цієї останньої реакції ланки порфірана перетворюється в ланки агарози, а ланки μ - і ν - карагінана – в ланки ξ - і ι -карагінана відповідно. Оскільки реакції модифікації полімерних молекул можуть відбуватися не повністю, кінцевим продуктом біосинтезу може бути „молекулярний гібрид”, який містить одночасно ланки агарози і порфірана або ж ланки декількох карагінанів.

Водні екстракти, що містять агар, при охолодженні перетворюються у гель. Вміст сульфату у більшості препаратів агару не перевищує 5%. Цей полісахарид дає гелі при концентрації біля 1%. Агар широко застосовується у мікробіології для виготовлення густих середовищ, на яких вирощують мікроорганізми. Цей полімер досить стійкий,

тому його розчини витримують стерилізацію нагріванням до високих температур. Лише небагато мікроорганізмів мають ферментні системи, здатні розщеплювати агар. Розчини агару зручно розливати до чашок Петрі, які після утворення гелю і внесення мікроорганізмів можна витримувати при різних температурах майже до 80°C не порушуючи гелевої консистенції середовища. Агар набув загального визнання мікробіологів після того, як знаменитий німецький дослідник Роберт Кох використав його у своїх роботах із збудником туберкульозу.

Фракціонуючи агар методами, що використовують відмінності у властивостях нейтральних і кислих молекул, можна виділити агарозу – компонент, який практично не містить сульфатних груп. Гель агарози утворюється вже при вмісті полімеру порядку 0,1%. Агарозу використовують у біохімічній лабораторній техніці для виготовлення великопористих гелів, придатних для гель-хроматографії білків, нуклеїнових кислот, полісахаридів і навіть вірусів і клітинних органел. Без електрофорезу в агарозних гелях не можна уявити вивчення будови нуклеїнових кислот, створення генетичних карт, техніку генної інженерії, виділення індивідуальних білків. Гелі агарози широко використовуються у багаточленних варіантах імуноелектрофорезу. У біотехнології застосовують колонки з іммобілізованими на агарозі ферментами або з живими клітинами бактерій і дріжджів, які включені до агарозного гелю. За допомогою таких колонок зручно проводити хімічні перетворення одних речовин у інші.

Світове виробництво агару складає біля семи тисяч тонн на рік. Крім мікробіології, його використовує харчова промисловість. Джерелами для отримання агару є ті види червоних водоростей, що відносяться до родів *Gracilaria*, *Gelidium*, *Pterocladia*. Крім того, агар добувають з *Ahnfeltia plicata* і *Ahnfeltia tobuchiensis*.

Світове виробництво карагінанів складає біля тринадцяти тисяч тонн на рік. Майже вся ця кількість використовується у харчовій промисловості, головним чином у молочній і кондитерській. Джерелами карагінанів є представники родів *Chondrus*, *Gigartina*, *Eucheuma*, *Phyllophora*, *Furcellaria*.

З погляду природокористування зелені водорості бувають одноклітинні, колоніальні, багатоклітинні. Біля 90% зелених водоростей є прісноводними, інші – морські, що зростають у прісних місцях морів. Багатоклітинні харові водорості зовнішньо схожі на хвощі, досягають висоти до одного метра. Харчовим резервом зелених водоростей є крохмаль, інουλін. Крім того, ці водорості містять полісахариди целюлозу, глюкоманани, манани, ксилани, пектову кислоту, сульфатовані гетероглікани.

Пентози у водоростях входять до складу полісахаридів геміцелюлоз і пектинових речовин. Геміцелюлози широко розповсюджені у водоростях, вони містяться у стінках клітин і є проміжною ланкою між целюлозою і крохмалем. У водоростях вони виконують механічну роль, а також є енергетичним резервом. Геміцелюлози гідролізуються набагато легше целюлози, але важче, ніж крохмаль. При гідролізі геміцелюлоз крім α -глюкози утворюються і інші цукри: D-маноза, D-галактоза, L-арабіноза, L-ксилоза.

За продуктами гідролізу геміцелюлози поділяються на гексозани і пентозани. До гексозанів належать декстрини, манани, галактани, галактоманани й інші. До пентозанів відносяться арабани і ксилани. Зустрічаються також поліози змішаного типу, які складаються з гексоз і пентоз, наприклад, галактоарабани. У водоростях гексозани і пентозани присутні здебільшого одночасно. У геміцелюлозах, що виконують роль резервної речовини, переважають гексозани, а у геміцелюлозах із механічною функцією – пентозани. Більшість геміцелюлоз нерозчинні у воді, а ті, що розчинні, утворюють колоїдні системи.

Пектинові речовини знаходяться у клітинному соку у вигляді розчиненого у воді пектину, а також у клітинних оболонках у вигляді нерозчинного у воді протопектину. Із пектинових речовин були виділені галактуронова кислота, арабіноза, галактоза та ін. Пектин являє собою полісахарид, який складається із залишків галактуронової кислоти, більша частина карбоксильних груп якої етерифікована метиловим спиртом, а менша частина утворює солі з металами. При гідролізі пентозанів утворюються пентози – арабіноза, ксилоза, рибоза, рамноза, які визначають колориметричним методом з орциновим реактивом.

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Вуглеводи організмів

Лабораторна робота 1

Загальні властивості моносахаридів

Дослід 1. Доказ наявності гідроксильних (спиртових) груп

Принцип методу. Загальні властивості моносахаридів пов'язані з наявністю в їхній молекулі спиртових груп. Як спирти вони утворюють алкоголяти.

Мета роботи. Навести докази наявності спиртових груп у моносахаридах.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Розчин глюкози ($\omega=5\%$). Розчини натрій гідроксиду ($\omega=30\%$), купрум(II) сульфату ($\omega=1\%$).

Хід роботи. До розчину глюкози додають на $1/3$ об'єму розчину NaOH і краплями CuSO_4 . Купрум(II) гідроксид, що утворився, взаємодіє з глюкозою; при цьому розчин забарвлюється в синій колір, який обумовлений забарвленням купрумалькоголятом глюкози.

Дослід 2. Доказ наявності карбонільних груп. Альдегідна проба Мура

Принцип методу. Як альдегіди, вуглеводи здатні до реакції полімеризації і до реакцій відновлення металів і окиснення вуглеводу.

Мета роботи. Навести докази наявності у досліджуваному розчині моносахаридів, молекули яких мають карбонільні групи.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Розчин глюкози ($\omega=5\%$). Розчин натрій гідроксиду ($\omega=30\%$). Сульфатна кислота ($\omega=10\%$).

Хід роботи. У пробірку наливають $2-3\text{см}^3$ розчину глюкози і стільки ж розчину NaOH. Рідину нагрівають до кипіння. З'являється спочатку жовте, а потім темно-буре забарвлення та запах карамелі, що

робиться більш помітним при підкисненні рідини розведеною сульфатною кислотою.

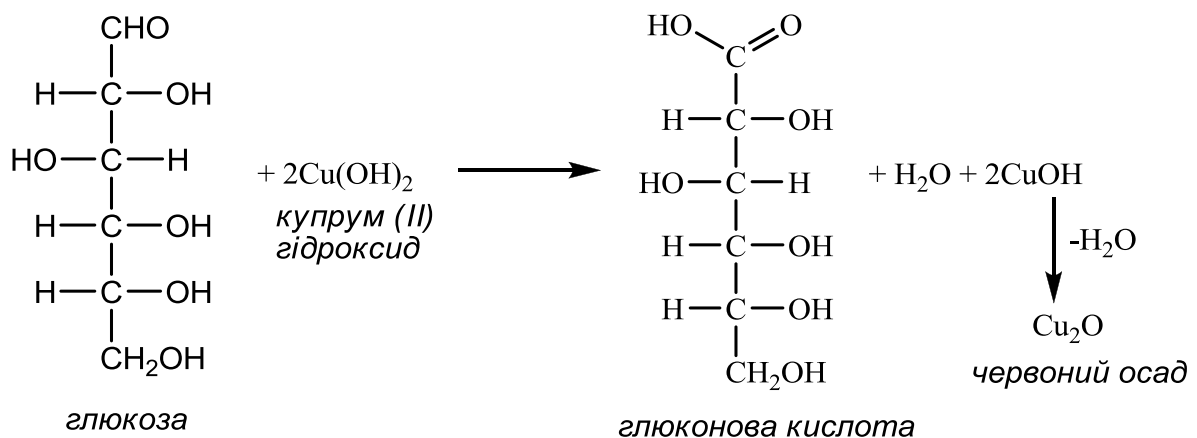
Побуріння розчину і поява запаху карамелі залежить від утворення продуктів полімеризації альдегідів.

Дослід 3. Реакції відновлення йонів металів і окиснення вуглеводів у лужному середовищі. Проба Троммера

Принцип методу. Реакції відновлення йонів металів засновані на властивості моносахаридів завдяки наявності у молекулі вуглеводу вільних альдегідних або кетонних груп, які легко окиснюються йонами важких металів. Наприклад, у реакції Троммера глюкоза при взаємодії з купрум(II) гідроксидом ($\text{Cu}(\text{OH})_2$) блакитного кольору при підігріванні окиснюється, а Купрум із ступенем окиснення 2+ відновлюється, утворюючи при цьому купрум(I) гідроксид (CuOH) – осад жовтого кольору або ж безводний купрум(I) оксид (Cu_2O) – осад червоного кольору.

У лужному розчині моносахариди, окиснюючись, відновлюють Cu^+ , Cu^{2+} , Bi^{3+} , Ag^+ у складі відповідних оксидів чи гідроксидів у вільні метали.

На цьому заснований ряд способів якісного й кількісного визначення вуглеводів.



Мета роботи. Навести докази наявності у розчині, що досліджується, моносахаридів, молекули яких мають вільні альдегідні або кетонні групи.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Розчин глюкози ($\omega=1\%$). Розчин натрій гідроксиду ($\omega=10\%$). Розчин купрум(II) сульфату ($\omega=1\%$).

Хід роботи. До 2-3см³ розчину виноградного цукру додають 1/3 частину об'єму розчину натрій гідроксиду і краплями розчин купрум сульфату. У присутності виноградного цукру осад купрум(II) гідроксиду, що утворюється, розчиняється, забарвлюючи рідину у блакитний колір. Верхній шар рідини нагрівають до кипіння. Поява жовтого, потім червоного осаду вказує на окиснення глюкози і на відновлення Купруму.

В іншій пробірці змішують 2-3см³ розчину натрій гідроксиду з декількома краплями розчину купрум(II) сульфату. Розчин глюкози не додають. Утворюється осад блакитного кольору. При нагріванні цього розчину може випадати чорний осад (CuO). Тому при реакції Троммера необхідно уникати надлишку купрум(II) сульфату, тому що реакція між цукром і купрум(II) гідроксидом йде кількісно і надлишок останнього при нагріванні, втрачаючи воду, переходить у чорний купрум-оксид, що затемнює основну реакцію:

При реакції Троммера можуть утворюватися наступні сполуки Купруму:

Купрум(II) гідроксид (Cu(OH)₂) – блакитного кольору

Купрум(I) гідроксид (CuOH) – жовтого кольору

Купрум(I) оксид (Cu₂O) – червоного кольору

Купрум(II) оксид (CuO) – чорного кольору

Дослід 4. Проба з рідиною Фелінга

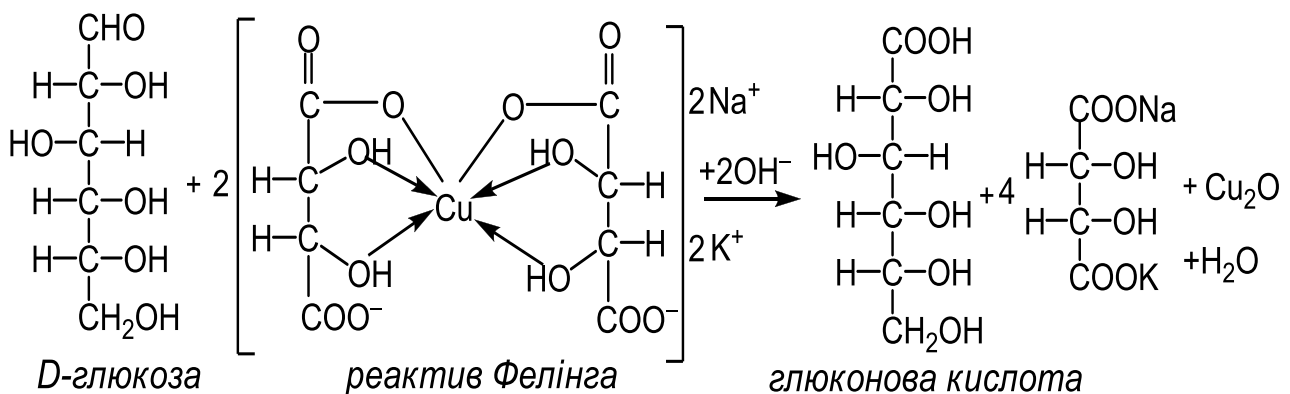
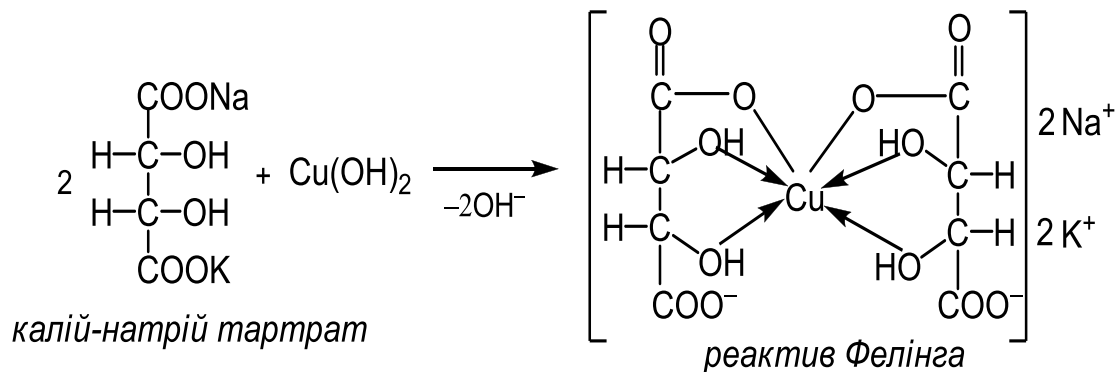
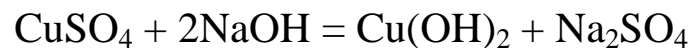
Принцип методу. Проба з рідиною Фелінга заснована на тому ж принципі, що й реакція Троммера. Відмінність полягає в тому, що у

реактиві Фелінга окисник – йон Cu^{2+} знаходиться у складі комплексу з сіллю винної кислоти. Цей комплекс добре розчинний у воді, на відміну від $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Саме розчинна форма Cu^{2+} у лужному середовищі забезпечує більш ефективно окиснення відновлюючих цукрів.

Мета роботи. Вивчити механізм окиснення вуглеводів реактивом Фелінга.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Розчин глюкози ($\omega=1\%$). Реактив Фелінга.

Хід роботи. До 2-3см³ розчину глюкози додають 1см³ рідини Фелінга. Верхній шар рідини нагрівають до кипіння. З'являється, як й у пробі Троммера, жовтий осад купрум(І) гідроксиду (CuOH) або ж червоний осад купрум(І) оксиду (Cu_2O).



Дослід 5. Проба Ніландера

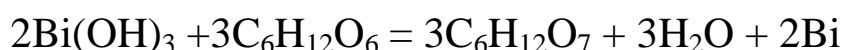
Принцип методу. Реактив Ніландера - безбарвний розчин, що представляє собою комплекс V^{3+} з винною кислотою у лужному сере-

довищі. При взаємодії з глюкозою рідина забарвлюється у чорний колір у зв'язку з утворенням відновленого металічного бісмуту.

Мета роботи. Ознайомитися з однією з якісних реакцій на вуглеводи – реакцією Ніландера. Поглибити знання про окиснювально – відновні властивості моносахаридів.

Обладнання та реактиви Штатив із пробірками. Нагрівальні прилади. Розчин глюкози ($\omega=1\%$). Реактив Ніландера.

Хід роботи. До 2-3см³ глюкози додають 1см³ реактиву Ніландера і кип'ятять 2-3хв. Рідина поступово буріє, потім утворюється чорний осад, що складається з металічного бісмуту. Реакція, що при цьому відбувається, наступна:



Дослід 6. Проба з індиго

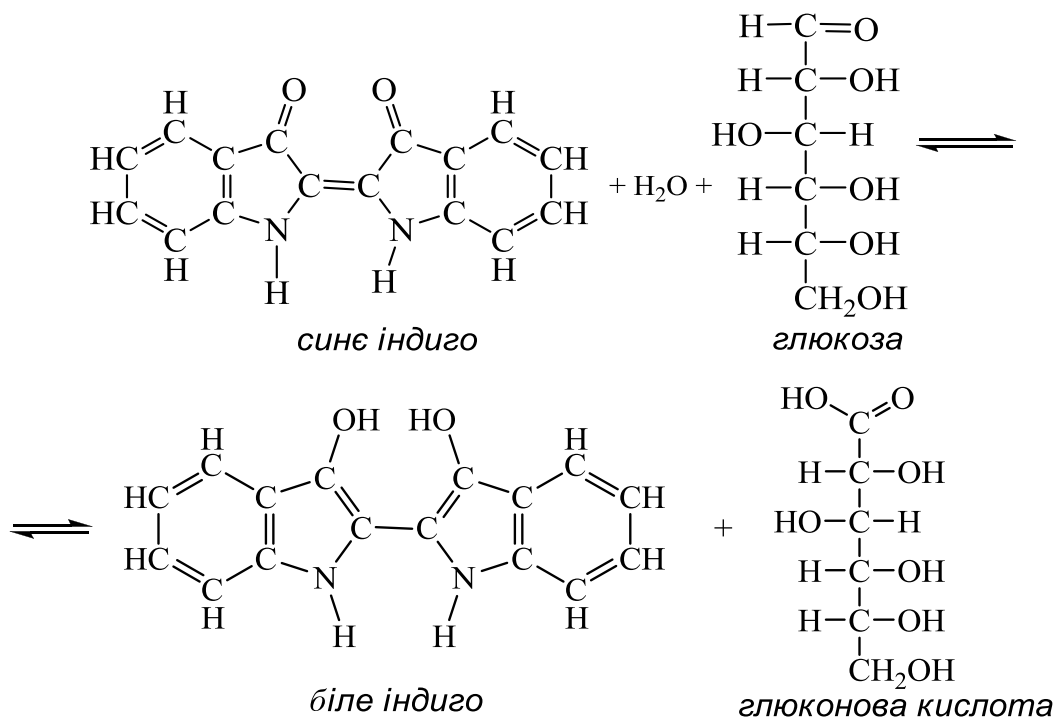
Принцип методу. Ця проба основана на тому ж принципі, що і попередні досліді. Для окиснення глюкози беруть синє індиго. При нагріванні розчину глюкози з розчином індиго відбувається окиснення глюкози і відновлення індиго. Відновлена форма індиго безбарвна.

Мета роботи. Ознайомитися з однією з якісних реакцій на вуглеводи – пробою з індиго.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками. Нагрівальні прилади. Розчин глюкози ($\omega=5\%$). Розчин натрій карбонату ($\omega=10\%$). Синє індиго, розведений водний розчин.

Хід роботи. До 2-3см³ розчину глюкози додають 2-3 краплі розчину Na_2CO_3 , декілька крапель слабого водного розчину синього індиго і нагрівають пробірку до кипіння. Розчин при цьому знебарвлюється. Якщо пробірку після охолодження збовтати, то розчин знову синіє внаслідок окиснення індиго за рахунок кисню повітря. При повторному нагріванні розчин може знову знебарвлюватися, якщо при першому нагріванні не була окиснена вся глюкоза. Всі ці реакції мож-

на зробити також і з іншими моносахарами – гексозами: галактозою та фруктозою і пентозами: арабінозою, ксилозою і рибозою.



Результати дослідів записати до таблиці 1.

Таблиця 1. Результати дослідів

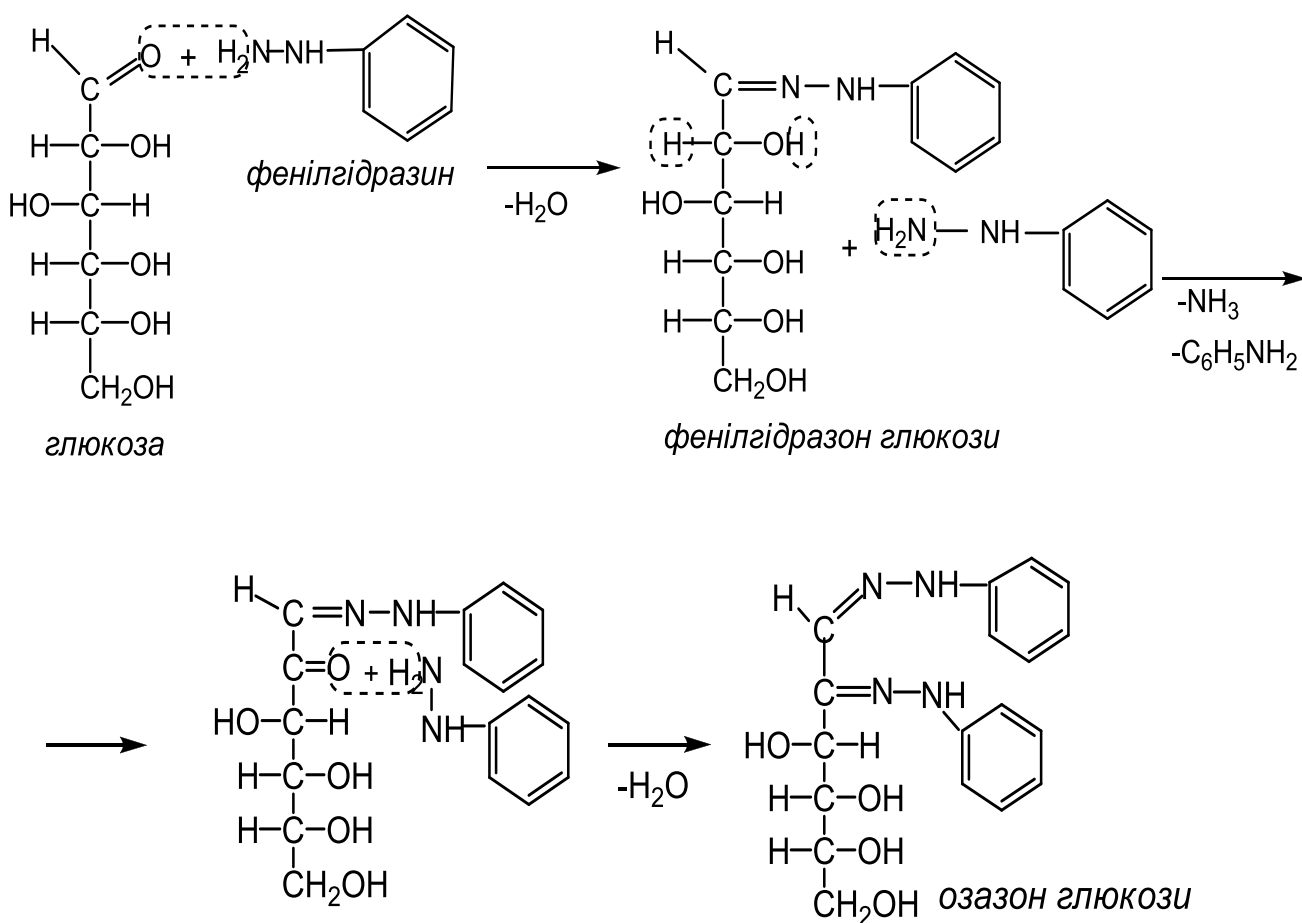
№ п/р	Розчин моносахариду	Реактив	Колір розчину		Що знаходиться в осаді	Що відбулося з вуглеводом
			до нагрівання	після нагрівання		

Дослід 7. Проба з фенілгідразином

Принцип методу. Специфічні реакції на моносахариди засновані на особливостях структури окремих їх представників. Завдяки цим реакціям можна відрізнити один моносахарид від іншого. Важливою особливістю моносахаридів є їх властивість давати з фенілгідразином гідразони і озазони. Ця реакція заснована на властивості вуглеводів давати реакції заміщення карбонільного Оксигену альдегідної або кетонної групи. Реакція утворення озазонів протікає у три фази. При

взаємодії моносахаридів з фенілгідазином утворюються, в першу чергу, розчинні у воді гідрозони. На гідрозон, що утворився, діє друга молекула фенілгідазину, і віднімаючи від нього два атоми Гідрогену, переводить спиртову групу у карбонільну, яка, у свою чергу, реагуючи з третьою молекулою фенілгідазину, утворює погано розчинні у воді сполуки – озони, які дають характерні за формою кристали жовтого кольору. Форма кристалів озонів різна і залежить від структури моносахаридів, з яких вони утворюються.

Озони різних моносахаридів відрізняються за формою кристалів, температурою плавлення, розчинності і оптичної діяльності, а тому ці властивості використовують для виділення моносахаридів з розчину, а також для того, щоб відрізнити одні цукри від інших.



Мета роботи. Навчитися проводити специфічні реакції на окремі моносахариди з утворенням відповідних озазонів.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Водяна баня. Стакан з льодом. Предметне та покривне скло. Піпетка. Мікроскоп. Невеликі лійки. Фільтри. Прилад для визначення температури плавлення. Фенілгідразин гідрохлорид. Натрій ацетат. Розчин глюкози ($\omega=0,5-1,0\%$). Метиловий спирт. Оцтова кислота концентрована. Етанол ($\omega=70\%$).

Хід роботи. До 2-3см³ води додають 5-8 крапель розчину фенілгідразину, 1см³ концентрованої оцтової кислоти, 2-3см³ розчину глюкози або іншого моносахариду і отриману прозору суміш нагрівають на водяній бані. Через 10-15хв. починається рясне виділення озазону у вигляді дрібних голчастих кристалів жовтих кольорів. Пробірку виймають з бані, повільно охолоджують і досліджують під мікроскопом кристали, що виділилися. За їхньою формою роблять висновок про наявність того чи іншого моносахариду в досліджуваному розчині. При утворенні глюкозозазону під мікроскопом спостерігаються характерні тонкі пучки і снопи, що утворюються з тонких кристалів озазону, а також окремі кристали у вигляді тонких голок (рис. 1).

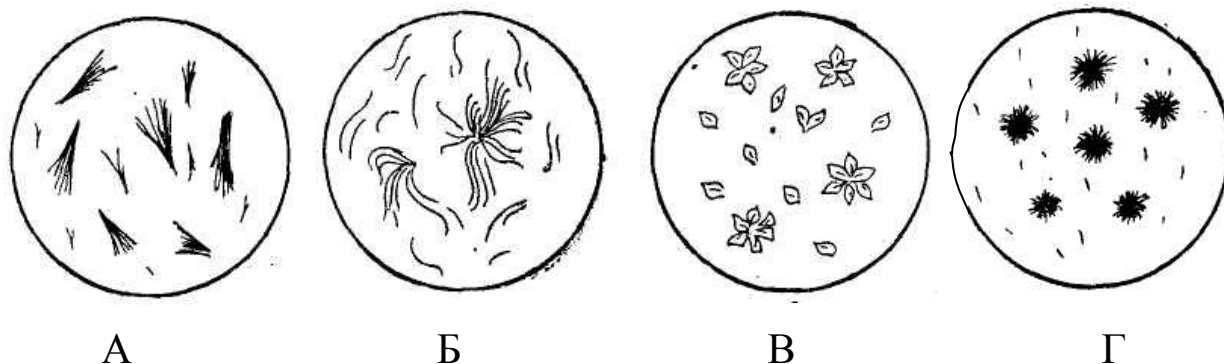


Рис. 1. Кристали озазонів різних вуглеводів: А - озазон глюкози, Б - озазон арабінози, В - озазон мальтози, Г - озазон лактози

Точка плавлення їх 208°C . Якщо рідина дуже концентрована, вона набуває інтенсивно червоного забарвлення і виділяються кристали лише після розведення водою. При нестачі фенілгідразину, особливо при кімнатній температурі, замість озазону утворюється легкорозчинний у воді гідразон. Для отримання озазону можна взяти чистий фенілгідразин або його сіль. Замість вільного фенілгідразину й оцтової кислоти беруть у пробірку 0,5г фенілгідразин гідрохлориду, 1г натрій ацетату, 2-3см³ розчину глюкози і суміш нагрівають на водяній бані.

Після охолодження кристали озазону відфільтровують з відсмоктуванням, промивають водою і метиловим спиртом, висушують і визначають температуру плавлення. Для отримання більш чистого озазону його перекристалізують з 70% етанолу. Так обробляють зазвичай озазони глюкози і галактози. Озазони мальтози і ксилози для очищення зазвичай перекристалізують з гарячої води.

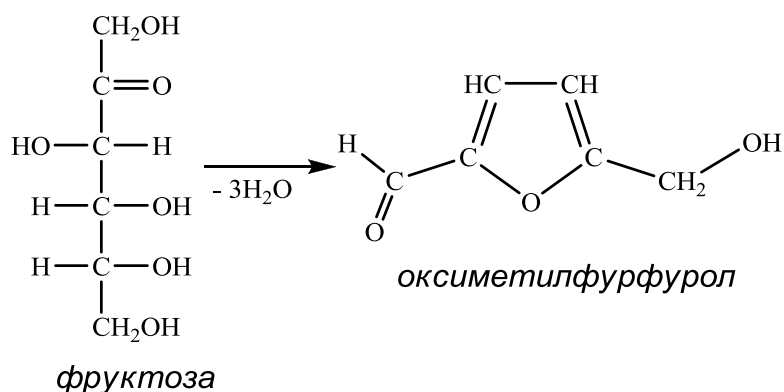
При визначенні температури плавлення озазонів нагрівання слід робити швидко. Це необхідно тому, що при повільному нагріванні озазон розкладається, що обумовлює також зміну точки плавлення.

Форма кристалів озазону глюкози і фруктози однакова і тому реакції отримання озазонів для окремого виділення цих двох моносахаридів застосовувати не можна. Для визначення фруктози можна користуватися реакцією Селіванова.

Лабораторна робота 2

Реакція Селіванова на кетогексози

Принцип методу. Ця реакція застосовується спеціально для розпізнавання кетоз. Особливо добре виходить із фруктозою і тими складними цукрами, які при гідролізі дають фруктозу (сахароза, інουλін). Реакція ґрунтується на утворенні із фруктози при нагріванні з кислотою нестійкої речовини – оксиметилфурфуролу, що з резорцином (*m*-діоксибенzenом) дає червоне забарвлення.



Мета роботи. Навчитися за допомогою реакції Селіванова розпізнавати кетогексози.

Обладнання і реактиви. Штатив із пробірками. Водяна баня. Розчин фруктози ($\omega=1\%$). Хлоридна кислота, концентрована та ($\omega=20\%$). Резорцин кристалічний.

Хід роботи. У пробірку до 2-3см³ розчину фруктози доливають стільки ж концентрованої хлоридної кислоти й додають кілька кристалів резорцину. Пробірку з рідиною нагрівають 1-2хв. у киплячій водянній бані.

При тривалому кип'ятінні цю реакцію дають також глюкоза, мальтоза і сахароза, тому, якщо у випробуваному розчині знаходяться зазначені цукри, вміст хлоридної кислоти повинен бути не більше 12%, осад і кольори при перебігу реакції повинні з'являтися не пізніше 20-30 сек. після початку кипіння.

Можна робити цю реакцію з готовим реактивом Селіванова. При цьому 0,05г резорцину розчиняють у 100см³ хлоридної кислоти ($\omega=20\%$). У пробірку вносять 1-2см³ реактиву, додають 2-3 краплі розчину фруктози і нагрівають до кипіння. Утворюється оксиметилфурфурол, який далі вступає в реакцію конденсації з резорцином з утворенням барвника червоного кольору.

Лабораторна робота 3

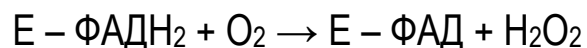
Ензиматичний метод кількісного визначення глюкози у біологічних рідинах

Принцип методу. Метод застосовується для специфічного визначення вмісту глюкози у біологічних рідинах у присутності інших вуглеводів і редукуючих речовин не вуглеводної природи.

Мета роботи. Засвоїти специфічну методику для кількісного визначення глюкози у біологічних рідинах.

Обладнання та реактиви Центрифуга на 5000об/хв. Центрифужні пробірки. Фотоелектроколориметр або спектрофотометр. Піпетки градуйовані або дозатори. Цинк сульфат ($\omega=5\%$). Натрій гідроксид ($c=0,3$ моль/дм³). Натрій хлорид ($\omega=9\%$). Біологічна рідина. Робочий реактив для визначення глюкози. Стандартний розчин глюкози.

Хід роботи. Біологічну рідину звільняють від білків та у розчині окиснюють глюкозу за участі ферменту глюкозооксидази (ЕС 1.1.3.4.). Цей фермент каталізує окиснення β ,D-глюкози киснем повітря до глюконової кислоти. Глюкозооксидаза є флавіновим ферментом, що має простетичну групу ФАД. Окиснення глюкози під дією глюкозооксидази відбувається так:



Гідроген пероксид, що утворився, під дією пероксидази окиснює доданий до реакційної суміші хромогенний акцептор о-толідин. Забарвлений у синій колір розчин колориметрують у кюветах з товщиною шару 5мм із світлофільтром з довжиною хвилі 590нм. Стандартні розчини глюкози обробляють аналогічним способом і порівнюють їх оптичну густину з оптичною густиною досліджуваних розчинів.

Пряма залежність між вмістом глюкози і інтенсивністю забарвлення зберігається в межах від 1 до 22 ммоль/дм³.

Для осадження білків у досліджуваній крові чи іншій біологічній рідині в центрифужну пробірку вносять $0,4\text{см}^3$ розчину цинк сульфату ($\omega=5\%$), $0,4\text{см}^3$ натрій гідроксиду ($c=0,3$ моль/дм³), $1,1\text{см}^3$ розчину натрій хлориду ($\omega=9\%$) і $0,1\text{см}^3$ біологічної рідини. Вміст пробірки ретельно перемішують і центрифугують при 5000об/хв. протягом 10–15хв. Для визначення глюкози з центрифужної пробірки відбирають 1см^3 надосадової рідини і переносять його в пробірку, додають 3см^3 робочого реактиву для визначення глюкози, який містить глюкозооксидозу, пероксидазу, о-толідін. У ході реакції розвивається забарвлення вмісту пробірки, яке досягає свого максимуму через 10–15хв. після внесення робочого реактиву в залежності від активності препарату глюкозооксидази. Для того, щоб визначити час, за який розвивається максимальна інтенсивність забарвлення розчину, використовують один із стандартних розчинів глюкози. Для цього через 5хв. після додавання до стандартного розчину глюкози робочого розчину для визначення глюкози через кожні 2хв. вимірюють інтенсивність забарвлення стандартного розчину глюкози на фотоелектроколориметрі (спектрофотометрі) із світлофільтром із довжиною хвилі 590нм і товщиною шару 5мм проти розчину, що містить 1см^3 дистильованої води і 3см^3 робочого розчину для визначення глюкози. Спочатку інтенсивність забарвлення збільшується, далі залишається незмінною протягом декількох хвилин, а потім починає повільно зменшуватися. За отриманими даними беруть час розвитку забарвлення в усіх інших пробах.

Для визначення вмісту глюкози в досліджуваних біологічних рідинах будують калібрувальний графік.

Готують вихідний розчин глюкози: у мірній колбі на 100см^3 розчиняють глюкозу масою 0,2г, доводять дистильованою водою до риски; в 1см^3 цього розчину міститься 2мг глюкози. Для отримання розчинів з різним вмістом глюкози вихідний розчин розбавляють дистильованою водою згідно таблиці:

Таблиця 2. Схема розведення вихідного розчину

№ проби	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Об'єм вихідного розчину глюкози, см ³	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0
Об'єм дистильованої води, см ³	8,5	8,0	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5	4,0
Вміст глюкози, мг/см ³	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2

З кожної проби відбирають 1см³ стандартного розчину глюкози, переносять у пробірку, додають 3см³ робочого реактиву для визначення глюкози, перемішують. У розчині розвивається синє забарвлення, максимум інтенсивності якого досягає за час, який було встановлено раніше. Забарвлений розчин колориметрують у кюветах із товщиною шару 5мм із світлофільтром із довжиною хвилі 590нм проти розчину, що містить 1см³ дистильованої води і 3см³ робочого розчину для визначення глюкози. Будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис вміст глюкози в пробі, а на осі ординат – оптичну густину розчину.

За калібрувальним графіком знаходять вміст глюкози в пробі досліджуваного розчину. Концентрацію глюкози в досліджуваній крові чи іншій біологічній рідині розраховують за формулою:

$$c = \frac{a \cdot V_1 \cdot 1000}{V_2 \text{mM}} \text{ ммоль/дм}^3, \text{ де}$$

c – концентрація глюкози в крові, ммоль/дм³;

a – вміст глюкози в пробі досліджуваного розчину, знайдений за калібрувальним графіком, мг/см³;

V_1 – загальний об'єм розчину, з якого осаджувались білки біологічної рідини, см³ (згідно з наведеною методикою – 2см³);

V_2 – об'єм біологічної рідини (крові), взятої для аналізу, см³;

mM – мілімолярна маса глюкози, мг/моль;

1000 – перерахунок на 1дм³ біологічної рідини (крові).

Лабораторна робота 4

Кількісне визначення глюкози у крові

спектрофотометричним методом за реакцією з пікриновою кислотою (метод Покровського і Крайко)

Принцип методу. У лужному середовищі глюкоза при нагріванні відновлює пікринову кислоту до пікرامінової кислоти, яка має червоне забарвлення. Отриманий забарвлений розчин спектрофотометрують при довжині хвилі 440нм.

Мета роботи. Ознайомитися з кількісним методом Покровського і Крайко для колориметричного визначення глюкози в крові.

Обладнання та реактиви Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Центрифуга на 4000об/хв. Центрифужні пробірки. Пробірки. Мікропіпетки або дозатори. Водяна баня. Дистильована вода. Кров. Стандартний розчин глюкози. Насичений розчин пікринової кислоти. Натрій гідроксид ($\omega=10\%$).

Хід роботи. У пробірку вносять 1см³ дистильованої води. Набирають у мікропіпетку 0,05см³ досліджуваної крові. Занурюють кінець мікропіпетки у дистильовану воду, що знаходиться в пробірці, і видують у воду кров. Промивають піпетку декілька разів, набираючи у неї рідину, в яку вона занурена, і видують цю рідину знову у пробірку. Залишають на 5хв. для гемолізу еритроцитів крові. У другу пробірку вносять 1см³ дистильованої води і 0,05см³ стандартного роз-

чину глюкози. Також промивають мікропіпетку, якою вносили розчин глюкози. У стандартному розчині концентрація глюкози становить 3,5 ммоль/дм³. У кожен пробірку додають по 5 крапель насиченого розчину пікринової кислоти, добре перемішують, центрифугують протягом 10хв. при 4000об/хв. До центрифугату додають 5 крапель розчину натрій гідроксиду ($\omega = 10 \%$) і вміщують пробірки в киплячу водяну баню на 3хв. Потім пробірки охолоджують проточною водою і спектрофотометрують забарвлений розчин при довжині хвилі 440нм проти води.

Концентрацію глюкози в крові розраховують за формулою:

$$c = \frac{D_1 a}{D_2} \text{ ммоль/дм}^3, \text{ де}$$

c – концентрація глюкози в крові, ммоль/дм³;

a – концентрація глюкози в стандартному розчині, ммоль/дм³;

D_1 – оптична густина досліджуваного розчину;

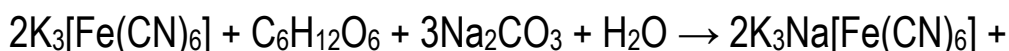
D_2 – оптична густина стандартного розчину глюкози.

Лабораторна робота 5

Кількісне визначення глюкози у крові за методом Хагедорна–Йенсена

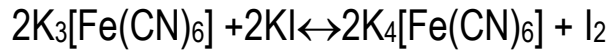
Принцип методу. Метод Хагедорна–Йенсена визначення глюкози в крові не специфічний і може бути використаний також для визначення інших моносахаридів і деяких дисахаридів. Метод заснований на реакції окиснення глюкози й інших вуглеводів калій гексаціано(III)-фератом у слабколужному середовищі при певних умовах, які повинні кожного разу точно дотримуватися для одержання відтворюваних результатів.

Глюкоза окиснюється до солі глюконової кислоти, калій гексаціано(III)-ферат відновлюється до гексаціано(II)-ферату:



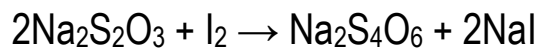


Калій гексаціано(III)-ферат беруть у надлишку, але точно відому кількість, і частку, яка залишилась після окиснення глюкози, визначають йодометричним методом:



Внаслідок оборотності цієї реакції калій гексаціано(II)-ферат переводять у нерозчинну сіль за участі цинк сульфату $K_2Zn_3[Fe(CN)_6]_2$.

Вільний йод, що утворився, відтитрують натрій тіосульфатом:



Мета роботи. Освоїти кількісне визначення глюкози у біологічних рідинах за методом Хагедорна–Йенсена. Поглибити знання про роль глюкози у процесах метаболізму та особливості цих процесів у різних біооб'єктах.

Обладнання та реактиви. Пробірки. Водяна баня. Паперові фільтри. Мікробюретки. Сироватка крові. Натрій гідроксид ($c=0,1$ моль/дм³). Цинк сульфат ($\omega=0,45\%$). Калій гексаціано(III)-ферат ($c=0,0017$ моль/дм³). Розчин А (10г цинк сульфату і 50г натрій хлориду розчиняють у воді і доводять водою до 200см³; до 40см³ цього розчину додають 1г калій йодиду). Оцтова кислота ($\omega=3\%$). Натрій тіосульфат ($c(1/2)=0,0025$ моль/дм³). Крохмаль ($\omega=1\%$).

Хід роботи. У пробірку вносять 0,1-0,2см³ сироватки крові. Для видалення білків приливають 1см³ розчину натрій гідроксиду ($c=0,1$ моль/дм³) і 4см³ розчину цинк сульфату ($\omega=0,45\%$). Перемішують вміст пробірки, пробірку нагрівають у киплячій водяній бані 3 хвилини, після чого суміш фільтрують у іншу пробірку. Промивають осад на фільтрі гарячою водою 3 рази по 2см³.

Одночасно ставлять контрольну пробу, яка замість сироватки крові містить такий же об'єм води.

В усі проби додають по 2см^3 (точно!) розчину калій гексаціано(III)-ферату ($c=0,0017\text{моль/дм}^3$) і ставлять у киплячу водяну баню на 15 хвилин. В цей час відбувається окиснення глюкози (і можливих інших відновників). Слід мати на увазі, що така кількість окисника калій гексаціано(III)-ферату може окислити не більше, ніж $0,385\text{мг}$ глюкози. Отже, сироватки крові треба взяти стільки, щоб у цій пробі глюкози не було більше вказаної кількості.

Після нагрівання всі проби охолоджують до кімнатної температури, додають у кожну 3см^3 реактиву А, 2см^3 розчину оцтової кислоти ($\omega=3\%$) і розчин крохмалю ($\omega=1\%$) до чіткого синього забарвлення. Титрують із мікробюретки розчином натрій тіосульфату ($c(1/2)=0,0025\text{моль/дм}^3$) до знебарвлення. Додавати всі реактиви треба перед самим титруванням.

Вміст глюкози розраховується за спеціальною таблицею (табл. 3). При титруванні визначається йод, що відповідає надлишку калій гексаціано(III)-ферату, який залишився після окиснення глюкози у пробі сироватки крові. Оскільки кількість окисника, взятого для окиснення глюкози в пробі сироватки, відома – 2см^3 , ($c=0,0017\text{моль/дм}^3$) і кількість окисника, що залишилась, визначена йодометрично, можна розрахувати кількість $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, що пішла на окиснення глюкози. Чим менше витрачено тіосульфату, тим було більше глюкози в даній пробі. Таблиця складена так, що у ній певному об'єму розчину натрій тіосульфату, витраченому на титрування надлишку калій гексаціано(III)-ферату, відповідає та маса глюкози (в мг), яка була окиснена.

Якщо, наприклад, на титрування надлишку окисника пішло $1,51\text{см}^3$ тіосульфату, за таблицею це відповідає $0,086\text{мг}$ глюкози. На титрування холостої проби нехай пішло $1,97\text{см}^3$ тіосульфату, що відповідало б $0,005\text{мг}$ глюкози. Цю „масу глюкози” слід відняти від маси, знайденої у досліді:

m (дослідна) – m (холостої проби) = m (глюкози).

Таблиця 3. Вміст глюкози в крові при визначенні за Хадегорн-Йенсеном, мг

Розчин $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (см ³)	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	0,385	0,382	0,379	0,376	0,373	0,370	0,367	0,364	0,361	0,358
0,1	0,355	0,352	0,350	0,348	0,345	0,343	0,341	0,338	0,336	0,333
0,2	0,331	0,329	0,327	0,325	0,323	0,321	0,318	0,316	0,314	0,312
0,3	0,310	0,308	0,306	0,304	0,302	0,300	0,298	0,296	0,294	0,292
0,4	0,290	0,288	0,286	0,284	0,282	0,280	0,278	0,276	0,274	0,272
0,5	0,270	0,268	0,266	0,264	0,262	0,260	0,259	0,257	0,255	0,253
0,6	0,251	0,249	0,247	0,245	0,243	0,241	0,240	0,238	0,236	0,234
0,7	0,232	0,230	0,228	0,226	0,224	0,222	0,221	0,219	0,217	0,215
0,8	0,213	0,211	0,209	0,208	0,206	0,204	0,202	0,200	0,199	0,197
0,9	0,195	0,193	0,191	0,190	0,188	0,186	0,184	0,182	0,181	0,179
1,0	0,177	0,175	0,173	0,172	0,170	0,168	0,166	0,164	0,163	0,161
1,1	0,159	0,157	0,155	0,154	0,152	0,150	0,148	0,146	0,145	0,143
1,2	0,141	0,139	0,138	0,136	0,134	0,132	0,131	0,129	0,127	0,125
1,3	0,124	0,122	0,120	0,119	0,117	0,115	0,113	0,111	0,110	0,108
1,4	0,106	0,104	0,102	0,101	0,099	0,097	0,095	0,093	0,092	0,090
1,5	0,088	0,086	0,084	0,083	0,081	0,079	0,077	0,075	0,074	0,072
1,6	0,070	0,068	0,066	0,065	0,063	0,061	0,059	0,057	0,056	0,054
1,7	0,052	0,050	0,048	0,047	0,045	0,043	0,041	0,039	0,038	0,036
1,8	0,034	0,032	0,031	0,029	0,027	0,025	0,024	0,022	0,020	0,019
1,9	0,017	0,015	0,014	0,012	0,010	0,008	0,008	0,005	0,003	0,002
Розчин $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (см ³)	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09

Концентрація глюкози у крові розраховується за формулою:

$$C(\text{глюкози}) = \frac{m(\text{глюкози})}{mM(\text{глюкози}) \cdot V}; \text{ де}$$

$m(\text{глюкози})$ – маса глюкози в пробі, знайдена по таблиці, мг;

$mM(\text{глюкози})$ – мілімолярна маса глюкози, мг/моль;

V – об'єм сироватки крові, дм^3 .

Наприклад:

$$C(\text{глюкози}) = \frac{0,086\text{мг} - 0,005\text{мг}}{180\text{мг/моль} \cdot 0,0002\text{дм}^3} = 2,25\text{ммоль/дм}^3.$$

Вміст цукру у крові визначають за допомогою емпірично складеної таблиці, за якою знаходять еквівалент глюкози (в мг) кількості витраченого розчину натрій тіосульфату ($c(1/2)=0,0025\text{моль/дм}^3$) для титрування як дослідної, так і контрольної проб. Цілі і десяті частки см^3 розчину натрій тіосульфату, витраченого на титрування дослідних і контрольних проб, знаходяться в першому вертикальному ряду, соті частки – у верхньому горизонтальному, а вміст глюкози або відновлюючих домішок (в мг) – на місці їх пересічення.

Лабораторна робота 6

Загальні властивості дисахаридів

Дослід 1. Реакції на сахарозу. Відновлення йонів металів

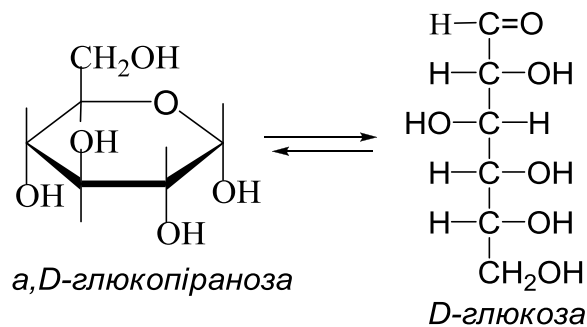
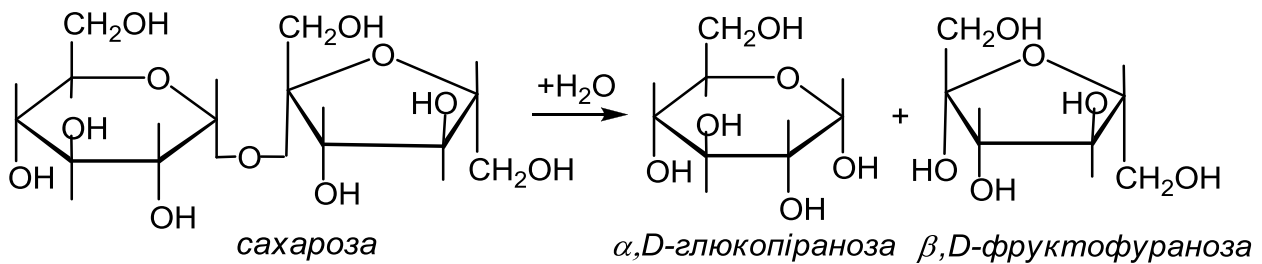
Принцип методу. Ця реакція знайомить із відсутністю здатності сахарози до відновлення йонів металів. Це пояснюється зв'язаним станом карбонільних груп гексоз, що утворюють її молекулу.

Мета роботи. Ознайомитися з реакцією, що демонструє відсутність здатності сахарози відновлювати йони металів.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки або дозатори. Розчин сахарози, ($\omega=1\%$). Хлоридна кислота. Лакмус. Розчин натрій гідроксиду, ($\omega=10\%$). Розчин купрум сульфату, ($\omega=1\%$).

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 2-3 см³ розчину сахарози. В одну з них додають декілька крапель хлоридної кислоти, перемішують і кип'ячать 3-5 хв. на відкритому вогні. Потім рідину охолоджують і нейтралізують за лакмусом шляхом додавання розчину натрій гідроксиду. З обома пробами (кип'яченою і некип'яченою) проводять реакцію Троммера та ін.

Негативна реакція Троммера у першій пробірці вказує на відсутність вільних карбонільних груп у сахарозі. Позитивна реакція Троммера у другій (кип'яченій) пробірці – випадіння червоного осаду вказує на те, що при кип'ятінні відбувся гідроліз сахарози і вивільнилися карбонільні групи.



Дослід 2. Кольорові реакції на сахарозу

Принцип методу. Проба із кобальт(II) сульфатом (CoSO₄) заснована на появі фіолетового забарвлення рідини у лужному середовищі в присутності сахарози.

Мета роботи. Ознайомитися з кольоровою реакцією на сахарозу.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки або дозатори. Розчин сахарози ($\omega=1\%$). Розчин CoSO₄ ($\omega=2\%$).

Хід роботи. До 2-3см³ розчину сахарози доливають декілька крапель CoSO₄ (ω=2%). При додаванні надлишку луку (1см³) рідина забарвлюється у фіолетовий колір.

Лабораторна робота 7
Якісні реакції на пентози

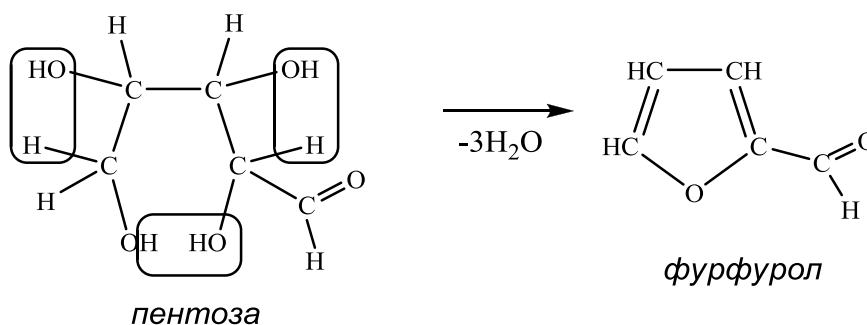
Дослід 1. Проба з орцином (метилдіоксибенzenом)

Принцип методу. Під впливом концентрованої хлоридної або сульфатної кислот при нагріванні пентози виділяють три молекули води, перетворюючись у фурфурол, який з орцином C₆H₅(OH)₂CH₃ утворює сполуку зеленого забарвлення.

Під впливом HCl відбувається гідроліз пентозану:



Далі хлоридна кислота віднімає воду, утворюючи леткий гетероциклічний альдегід фурфурол. Фурфурол вступає в реакцію конденсації з орцином, що обумовлює відповідну зміну забарвлення.



Мета роботи. Ознайомитися з якісною реакцією на пентози – пробую з орцином.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки. Шпатель. Розчин пентози (арабінози або ксилози), (ω=1%). Хлоридна кислота, 1:1. Орцин кристалічний. FeCl₃.

Хід роботи. У пробірку наливають 2-3см³ розчину пентози, додають рівний об'єм хлоридної кислоти, декілька кристалів орцину і

добре перемішують. При нагріванні утворюється зелене забарвлення. Якщо додати FeCl_3 , чутливість реакції значно збільшується.

Дослід 2. Проба з флороглюцином (1,3,5-триоксибенzenом)

Принцип методу. При нагріванні з хлоридною кислотою пентоза перетворюється у фурфурол. Фурфурол вступає в реакцію конденсації з флороглюцином ($\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_3$). Утворюється барвник, що має вишнево-червоне забарвлення.

Мета роботи. Ознайомитися з якісною реакцією на пентози – пробую з флороглюцином.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки. Шпатель. Розчин пентози (арабінози або ксилози), ($\omega=1\%$). Хлоридна кислота, 1:1. Флороглюцин кристалічний.

Хід роботи. В пробірку наливають 2-3см³ розчину пентози, додають рівний об'єм хлоридної кислоти, декілька кристалів флороглюцину і добре перемішують. При нагріванні утворюється червоне забарвлення.

Дослід 3. Реакція з аніліном ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$ амінобензен)

Принцип методу. Сліди фурфуролу визначають за характерним рожевим забарвленням при дії на нього аніліном у присутності оцтової кислоти.

Мета роботи. Навчитися за допомогою реакції з аніліном відрізнати пентози від гексоз.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками. Піпетки. Шпатель. Тирса. Хлоридна кислота 1:1. Анілін. Оцтова кислота льодяна.

Хід роботи. Для отримання пентози у пробірку вносять небагато тирси, кип'ятять з 2-3см³ хлоридної кислоти (1:1), причому одночасно із звільненням пентози з поліпентозанів відбувається перехід її у фурфурол. Фурфурол, що утворився, визначають при додаванні декількох крапель аніліну та льодяної оцтової кислоти. З'являється червоне забарвлення.

Лабораторна робота 8

Кількісне визначення пентоз за методом Мейбаум

Принцип методу. При нагріванні пентози у кислому середовищі утворюється фурфурол, який конденсується з орцином у присутності слідів ферум(III) хлориду. Утворюється продукт конденсації, забарвлений у зелений колір.

Мета роботи. Освоїти методику колориметричного визначення пентоз за реакцією з орцином, поглибити знання про властивості і біологічну роль пентоз.

Обладнання та реактиви Центрифуга на 3000об/хв. Центрифужний стакан. Спектрофотометр або колориметр. Ступка з товкачем. Колба на 100см³. Лійка. Плитка. Пробірка з пробкою із зворотним повітряним холодильником. Водяна баня. Кальцій нітрат ($\omega=80\%$). Хлоридна кислота ($c=2$ моль/дм³). Орциновий реактив (розчиняють 0,2г орцину в 100см³ хлоридної кислоти, ($\omega=30\%$), і додають 0,1г ферум(III) хлориду).

Хід роботи. Водорості масою 0,1-0,2г розтирають у ступці з 5см³ розчину кальцій нітрату ($\omega=80\%$), суміш переносять у колбу на 100см³, промивають ступку 10см³ розчину кальцій нітрату ($\omega=80\%$), об'єднуючи промивні води з основним розчином. Колбу накривають лійкою, ставлять на плитку, нагрівають до кипіння і кип'ятять 5 хвилин.

У киплячому розчині кальцій нітрату ($\omega=80\%$) розчиняється крохмаль. Після кип'ятіння вміст колби охолоджують, переносять у центрифужний стакан і центрифугують 5 хвилин при 3000 об/хв. Надосадову рідину з розчиненим в ній крохмалем виливають, осад геміцелюлоз промивають гарячою водою, знову центрифугують, промивні води виливають.

Промитий осад геміцелюлоз переносять у широку пробірку, додають 10см³ розчину хлоридної кислоти (с=2 моль/дм³), пробірку закривають пробкою із зворотним повітряним холодильником, ставлять у киплячу водяну баню і нагрівають при слабкому кипінні протягом 45 хвилин, періодично перемішуючи вміст пробірки. При цьому відбувається гідроліз геміцелюлоз, а целюлоза ніяких змін не зазнає.

Після закінчення нагрівання вміст пробірки охолоджують, відділяють розчин від осаду фільтруванням або центрифугуванням. У розчині будуть знаходитись пентози.

Переносять у пробірку 3см³ отриманого розчину, додають 3см³ орцинового реактиву. Пробірку закривають пробкою із зворотним повітряним холодильником і ставлять у киплячу водяну баню на 20 хвилин. Одночасно готують стандартний розчин арабінози або рибози. Для цього в мірну колбу на 500см³ вносять піпеткою 5см³ вихідного розчину пентози (0,2г в 200см³ розчину) і доводять водою до риски. З цього розчину відбирають 3см³ (міститься 30мкг пентози), переносять у пробірку, додають 3см³ орцинового реактиву і далі проводять ті ж самі операції, що із досліджуваним розчином.

При нагріванні пентози у кислому середовищі утворюється фурфурол, який конденсується з орцином у присутності слідів ферум (III) хлориду. Утворюється продукт конденсації, забарвлений у зелений колір.

Пробірки охолоджують і спектрофотометрують при $\lambda=660\text{нм}$ проти контролю на реактиви (замість розчину пентози або досліджуваного розчину беруть 3см³ води і 3см³ орцинового реактиву).

Масу пентоз у пробі, взятій для аналізу, розраховують за формулою:

$$m = \frac{D_1}{D_2} \cdot a, \text{ де}$$

m – маса пентоз в досліджуваній пробі;

D_1 – оптична густина досліджуваного розчину;
 D_2 – оптична густина стандартного розчину пентози;
 a – маса пентози в пробі стандартного розчину.

Роблять перерахунки на вміст пентоз в 1г рослинного матеріалу.

Лабораторна робота 9

Кількісне визначення цукрів за методом Фелінга

Принцип методу. Метод заснований на принципі проби Троммера. Завдяки додаванню сегнетової солі забезпечується утримання в розчині Cu^{2+} у складі водорозчинної комплексної сполуки. Внаслідок цього розчин стає більш зручним для кількісного визначення.

Мета роботи. Навчитись кількісно визначати цукри методом Фелінга.

Обладнання та реактиви. Порцелянова чашка. Піпетка на 10см^3 або дозатор. Циліндр на 50см^3 . Металевий штатив із кільцем і бюреткою. Нагрівальні прилади. Реактив Фелінга. Розчин цукру, ($\omega=0,5 - 1\%$).

Хід роботи. У невелику порцелянову чашку піпеткою відмірюють 10см^3 реактиву Фелінга і циліндром – 40см^3 дистильованої води. Чашку ставлять на кільце, закріплене на металевому штативі. Знизу поміщають пальник і нагрівають рідину до кипіння. Над чашкою закріплюється бюретка. Як тільки рідина у чашці почне кипіти, з бюретки краплями доливають розчин цукру (або іншої рідини, досліджуваної на цукор), увесь час помішуючи. При титруванні необхідно, щоб кипіння рідини не припинялося. Титрування продовжують доти, поки рідина над червоним осадом Cu_2O , що утворився, стане безбарвною, (але не жовтою). Вміст цукру в досліджуваному розчині повинен бути приблизно $0,5\%$ і не більше 1% .

Витрачена для досягнення цього моменту кількість досліджуваного розчину містить $0,05\text{г}$ глюкози. Цей метод є швидким у вико-

нанні, але не дуже точним. Через те, що 1см^3 розчину Фелінга відновлює $0,005\text{г}$ глюкози, то на відновлення 10см^3 розчину необхідно $0,05\text{г}$ глюкози. Таким чином ця кількість глюкози буде міститися у витраченій кількості кубічних сантиметрів досліджуваної рідини.

Приклад розрахунку. На відновлення 10см^3 розчину Фелінга витрачено $6,5\text{см}^3$ рідини, що досліджується. Це значить, що $6,5\text{см}^3$ цієї рідини містять $0,05\text{г}$ глюкози. Звідси обчислюють відсоток глюкози у досліджуваному розчині:

$$\omega = \frac{0,05 \cdot 100}{6,5} = 0,77\%$$

Лабораторна робота 10

Дослідження властивостей крохмалю

Крохмаль – полісахарид, мономером якого є глюкоза. У формі крохмалю рослина зберігає свої запаси цукру. Для рослинного організму крохмаль, що в них накопичується, є важливою харчовою речовиною.

Дослід 1. Кольорові реакції на крохмаль

Принцип методу. Характерною реакцією на крохмаль є поява синього забарвлення від розчину йоду в калій йодиді внаслідок утворення комплексу крохмалю з йодом.

Мета роботи. Ознайомитися з якісною кольоровою реакцією на крохмаль з розчином йоду в калій йодиді.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетка або дозатор. Розчин крохмалю ($\omega=1\%$). Розчин Люголя.

Хід роботи. У пробірку вносять $2-3\text{см}^3$ розчину крохмалю, доливають одну краплю розчину Люголя (J_2+KJ). Рідина забарвлюється у синій колір, що зникає при нагріванні і з'являється знову при охолодженні. Тому пробу з йодом необхідно проводити тільки з холодним розчином крохмалю.

Дослід 2. Колоїдні властивості крохмалю

Принцип методу. Зерна крохмалю різного походження відрізняються величиною, формою і будовою. Вони не розчинні у холодній воді, у гарячій же розбухають і дають густий розчин полімеру, що називається крохмальним клейстером, за властивостями схожий на колоїди.

Мета роботи. Ознайомитися з колоїдними властивостями крохмалю.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки або дозатори. Шпатель. Розчин крохмалю ($\omega=1\%$). Амоній сульфат кристалічний. Етиловий спирт. Етер діетиловий.

Хід роботи. У три пробірки наливають по 2-3см³ розчину крохмалю. У пробірку № 1 додають кристалічний $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ до повного насичення. Над амоній сульфатом, що не розчинився, утворюється осад крохмалю (висолювання). У пробірку №2 до розчину крохмалю додають етанол і спостерігають випадіння крохмалю в осад. У пробірку №3 додають етер і також спостерігають випадіння крохмалю в осад.

Дослід 3. Кислотний гідроліз крохмалю

Принцип методу. Крохмаль не проявляє виражених відновних властивостей, але при нагріванні його з концентрованою мінеральною кислотою він гідролізується до декстринів різної складності та моносахариду глюкози.

Мета роботи. Ознайомитися з реакцією гідролізу крохмалю мінеральними кислотами.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетка або дозатор. Розчин крохмалю ($\omega=1\%$). Хлоридна кислота. Розчин Люголя. Лакмус. Розчин натрій гідроксиду ($\omega=10\%$). Реактив Фелінга.

Хід роботи. У пробірку наливають 3-5см³ розчину крохмалю і декілька крапель концентрованої хлоридної кислоти. Добре пе-

ремішують і кип'ятять на відкритому вогні. Через 1-2 хв. після початку кипіння беруть пробу для реакції з йодом. Декілька крапель розчину піпеткою виливають у пробірку, в якій знаходиться 5-6см³ дистильованої води, і сюди ж доливають 1-2 краплі розчину Люголя. Утворюється фіолетове забарвлення, яке вказує на наявність у розчині амілодекстринів. Пробірку з розчином крохмалю кип'ятять ще 1-2хв. і знову проводять таку ж пробу з йодом. Отримують червоно-буре забарвлення від присутності еритродекстринів. Знову кип'ятять і через кожні 2-3хв. повторюють проби з йодом. Крохмаль через ахродекстрини і мальтозу розщеплюється до глюкози. Реакція з йодом виходить негативна - рідина забарвлюється у жовтий колір.

Прогідролізований розчин крохмалю нейтралізують (за лакмусом), додають реактив Фелінга і нагрівають. Випадає жовтий осад CuOH або ж червоний Cu₂O.(Проба на глюкозу).

Дослід 4. Гідроліз крохмалю амілазою

Принцип методу. Під впливом амілази крохмаль розщеплюється з утворенням дисахариду – мальтози. А потім мальтаза розщеплює мальтозу до глюкози.

Мета роботи. Ознайомитися з реакцією гідролізу крохмалю амілазою слини.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки або дозатори. Водяна баня. Термометр. Розчин крохмалю (ω=1%). Хлоридна кислота. Розчин Люголя. Лакмус. Розчин натрій гідроксиду (ω=10%). Реактив Фелінга.

Хід роботи. У пробірку наливають 3-5см³ розчину крохмалю і додають 0,5 -1см³ слини, добре перемішують і ставлять у водяну баню на 10—15хв. за 37–40°С. Про закінчення гідролізу визначають за реакцією з йодом. Відсутність синього забарвлення свідчить про гідроліз, що відбувся. Наявність глюкози підтверджується позитивною

реакцією Троммера або Фелінга. Отримані результати записують у вигляді таблиці 4:

Таблиця 4. Результати дослідів

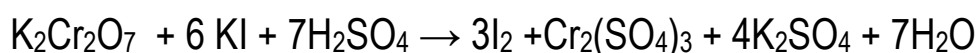
№ п/р	Речовина, що досліджується	Проба Троммера	Проба з йодом	Висновки
1	Розчин крохмалю			
2	Гідролізат:			
3	1-а проба 2-а проба			

Лабораторна робота 11

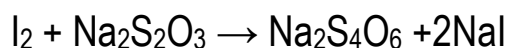
Кількісне визначення вмісту крохмалю йодометричним методом

Принцип методу. Метод заснований на розчиненні крохмалю при нагріванні у розчині кальцій нітрату ($\omega=80\%$) і осадженні його з отриманого розчину йодом. У присутності KI і $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ йод повністю осаджує крохмаль у вигляді темно-синьої сполуки, яка містить від 14 до 16% йоду.

Після відділення осаду центрифугуванням і промивання крохмаль окиснюють $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ у присутності H_2SO_4 до CO_2 і H_2O . Надлишок $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ визначають йодометричним методом:



Йод, що виділився, титрують розчином натрій тіосульфату у присутності крохмалю як індикатора:



Йод, адсорбований крохмалем, практично не впливає на точність визначення.

Мета роботи. Визначити кількість резервного крохмалю у багатоклітинних прісноводних зелених водоростях. З'ясувати роль полісахаридів у життєдіяльності водоростей, практичне значення і застосування полісахаридів водоростей.

Обладнання та реактиви. Ступка з товчачиком. Конічна колба на 100см³. Лійка для обмеження випаровування. Нагрівальні прилади. Центрифуга на 3000об/хв. Центрифужні стакани. Мірна колба на 50см³. Скляні палички. Водяна баня. Кальцій нітрат ($\omega=80\%$). Вода дистильована. Розчин йоду ($\omega=0,5\%$). KI ($\omega=20\%$). K₂Cr₂O₇ (с(1/6) = 0,5 моль/дм³). Натрій тіосульфат (с(1/2)=0,1 моль/дм³)

Хід роботи. У пробі досліджуваного матеріалу повинно міститися від 20 до 200мг крохмалю. Зелені водорості масою 3-5г розтирають у ступці з 5см³ розчину кальцій нітрату ($\omega=80\%$). Розтерту масу переносять у конічну колбу на 100см³, промивають ступку розчином Са(NO₃)₂ об'ємом 10см³ ($\omega=80\%$) і виливають промивний розчин у ту ж колбу. Колбу закривають лійкою для обмеження випаровування, кип'ятять 3 хвилини при слабкому нагріванні. При цьому крохмаль переходить у колоїдоподібний стан. Кип'ятити більш довгий час не можна, бо тоді частина крохмалю буде гідролізована.

Після кип'ятіння у колбу додають 20см³ дистильованої води, ополіскуючи нею лійку. Після перемішування вміст колби переносять до центрифужного стакану, центрифугують 3хв. при 3000 об/хв і зливають лужний розчин у мірну колбу на 50см³.

Колбу, в якій проводилось кип'ятіння, і осад промивають 2-3 рази гарячою дистильованою водою порціями по 5-10см³, центрифугують і додають центрифугат до основного розчину у колбі. Вміст колби доводять дистильованою водою до риски, перемішують.

З отриманого розчину крохмалю відбирають піпеткою 10см³, переносять до центрифужної пробірки, в яку попередньо наливають розчин йоду ($\omega=0,5$) об'ємом 2см³, перемішують і залишають на 15хв. для виділення осаду. При цьому осаджується йодкрохмальна сполука темно-синього кольору. Після цього центрифугують, прозорий розчин зливають якомога повніше, а осад промивають розчином, що містить 5% Са(NO₃)₂ і 0,01% йоду. Для цього до осаду додають розчин для

промивання об'ємом 5см^3 , перемішують скляною паличкою, яку потім ополіскуюють цим же розчином. Промивання повторюють 3-4 рази у залежності від кількості домішок.

До промитого осаду у пробірці додають розчин $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($c(1/6)=0,5$ моль/дм³) об'ємом 5см^3 у сульфатній кислоті, перемішують скляною паличкою, пробірку разом із скляною паличкою ставлять у кип'ячу воду на 10хв., перемішуючи вміст пробірки.

Після цього пробірку охолоджують, розчин із пробірки переносять у колбу для титрування, змивають залишок $10-15\text{см}^3$ дистильованої води. Додають 60см^3 дистильованої води для розведення сульфатної кислоти, вносять розчин КІ ($\omega=20\%$) об'ємом 5см^3 і йод, що виділився, титрують розчином натрій тіосульфату ($c(1/2)=0,1$ моль/дм³) додаючи в кінці титрування індикатор крохмаль. Окремо титрується розчин $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($c(1/6)=0,5$ моль/дм³) об'ємом 5см^3 після попереднього розведення таким же об'ємом води, як і при титруванні розчину з крохмалем.

Вміст крохмалю визначають за формулою:

$$X = \frac{Vc(a - b)M100 \cdot 0,001}{V_1m}, \text{ де}$$

X – вміст крохмалю в досліджуваному матеріалі, %;

V – загальний об'єм досліджуваного розчину крохмалю, см^3 ;

V_1 – аліквотний об'єм крохмального розчину, взятий для осадження крохмалю йодом, см^3 ;

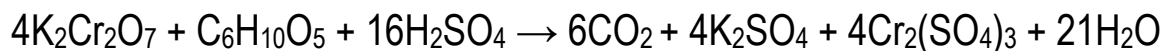
c – молярна концентрація еквівалента розчину натрій тіосульфату, моль/дм³;

a – об'єм розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c(1/2)=0,1$ моль/дм³), затрачений на титрування 5см^3 розчину $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($c(1/6) = 0,5$ моль/дм³) в контролі, см^3 ;

b – об'єм розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c(1/2)=0,1$ моль/дм³), затрачений на титрування залишку $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ після окиснення крохмалю, см^3 ;

m– маса досліджуваного матеріалу, г;

M– молярна маса еквівалента залишку глюкози в крохмалю при його окисненні до CO₂ і H₂O. Становить 6,75 г/моль;



При окисненні шести атомів Карбону у залишку глюкози до шести молекул CO₂ відбувається зміщення 24 електронів від атомів Карбону до атомів Хрому в калій дихроматі.

$$M(1/24) = \frac{M(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)}{24} = 6,75 \text{ г/моль}$$

100– перерахунок у проценти;

0,001– перерахунок см³ у дм³.

Лабораторна робота 12

Дослідження властивостей глікогену

Дослід 1. Виділення глікогену за методом Пфлюгера

Принцип методу. Печінку або м'язову тканину кип'ятять із рівним об'ємом розчину КОН. При цьому гідролізуються білки тканини, а глікоген переходить у розчин, з якого потім осаджується спиртом.

Мета роботи. Ознайомитися з одним із методів виділення глікогену у лабораторних умовах.

Обладнання та реактиви. Центрифужні пробірки. Штатив. Центрифуга. Водяна баня. Склянка з льодом. Піпетки або дозатори. Розчин калій гідроксиду (ω=15% і 60%). Спирт. Розчин хлоридної кислоти (ω=2,5%). Розчин натрій гідроксиду (ω=10%). Реактив Фелінга.

Хід роботи. У центрифужну пробірку наливають 2см³ розчину КОН; туди ж кладуть 1,5-2г тканини. Пробірку ставлять на годину в киплячу водяну баню, часто збовтують. Через годину пробірку виймають із бані, охолоджують і додають до неї 8-10см³ спирту. Випадає осад глікогену. Пробірку ставлять у центрифугу і центрифугують.

Рідину зливають. Осад розчиняють у 2см³ розчину КОН ($\omega=15\%$) і знову додають 8-10см³ спирту. Знову випадає осад глікогену. Центрифугують і рідину над осадом зливають.

Дослід 2. Гідроліз глікогену

Принцип методу. При гідролізі глікогену кип'ятінням упродовж 5-10хв. з розведеною хлоридною кислотою кінцевим продуктом є глюкоза, з якою потім проводять пробу з реактивом Фелінга.

Мета роботи. Навчитися проводити гідроліз глікогену кип'ятінням. Пояснити принцип гідролізу глікогену.

Обладнання та реактиви. Нагрівальні прилади. Штатив з пробірками. Осад глікогену з дослідів №1. Розчин хлоридної кислоти ($\omega=2,5\%$). Розчин натрій гідроксиду ($\omega=10\%$). Реактив Фелінга.

Хід роботи. Осад глікогену розчиняють в 3-4см³ розчину хлоридної кислоти й кип'ятять 15-20хв. Охолоджують і нейтралізують розчином лугу, додають реактив Фелінга й кип'ятять. Проба повинна бути позитивною на глюкозу.

Лабораторна робота 13

Визначення вмісту глікогену в тканинах

Принцип методу. Аналіз тканин на глікоген включає розчинення тканин у гарячому розчині лугу, осадження глікогену спиртом, кислотний гідроліз його і кількісне визначення глюкози, що утворилась. При дії гарячого лугу на тканини гідроліз α -(1→4)- і α -(1→6)- зв'язків у молекулах глікогену майже не відбувається.

При визначенні глікогену за допомогою антрону попередній гідроліз глікогену не обов'язковий. У присутності концентрованої сульфатної кислоти глюкоза або її залишки у глікогені з антроном дають продукти, що мають синє забарвлення. За інтенсивністю цього забарвлення визначають вміст глюкози чи глікогену у досліджуваній тканині.

Мета роботи. Визначити рівень глікогену у тканинах тварин, птиці та риби. Поглибити знання про будову та роль цього полісахариду в енергетичному забезпеченні організму.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Центрифуга. Центрифужні пробірки. Водяна баня. Мірна колба на 50см³. Піпетка з широким носиком. Печінка або м'язи. Пробірки. Калій гідроксид ($\omega=30\%$). Натрій сульфат ($\omega=10\%$). Етанол. Дистильована вода.

Хід роботи. Щойно виділену тканину (печінку, м'язи) масою 500мг вносять у пробірку з 2см³ гарячого розчину калій гідроксиду ($\omega=30\%$). Пробірку нагрівають протягом 30-60 хвилин на киплячій водній бані при частому перемішуванні вмісту. Після чого охолоджують і додають до вмісту пробірки 0,2см³ розчину натрій сульфату ($\omega=10\%$) і 5см³ етанолу. Суміш добре перемішують, залишають до наступного дня в холодильнику. Потім осад, що утворився, відділяють центрифугуванням протягом 40хв. при 7000 об/хв. Супернатант відкидають, а осад розчиняють у 2см³ води. До одержаного розчину додають 4 см³ етанолу, перемішують і залишають на 30хв. у холодильнику. Осад, що випав, відділяють центрифугуванням, надосадову рідину відкидають. Утворений осад ще раз переосаджують спиртом. Після третього переосадження глікогену надосадову рідину видаляють. Осад глікогену розчиняють у воді, кількісно переносять з пробірки у мірну колбу на 50см³, доводять водою до риски, перемішують.

У дві пробірки (дві повторності досліду) вносять по 0,5см³ отриманого досліджуваного розчину глікогену, а дві інші (дві повторності контролю на реактиви) – по 0,5см³ води. У всі пробірки додають по 5см³ антронового реактиву. Додавати реактив необхідно швидко, так, щоб струмінь реактиву попадав у центр проби. Для цього слід використати піпетку з широким носиком. Суміш негайно ретельно перемішують і вміщують пробірки у водяну баню кімнатної температури

на 10-15хв., а потім переносять у киплячу водяну баню на 15хв. При нагріванні слідкують, щоб у пробірки не попала вода. Інакше вміст пробірок може помутніти, що заважатиме колориметруванню. Після закінчення нагрівання пробірки швидко охолоджують у проточній воді і залишають у темряві на 30хв. Розвивається синє забарвлення.

Забарвлені розчини спектрофотометрують при $\lambda=620\text{нм}$ або колориметрують (червоний світлофільтр) у кюветах з $l = 5\text{мм}$ проти контролю на реактиви.

Для визначення вмісту глікогену в пробі будують калібрувальний графік. Для цього готують вихідний стандартний розчин глюкози, що містить 200 мг глюкози в 500см^3 насиченого розчину бензойної кислоти. В 1см^3 такого розчину міститься 400мкг глюкози. Шляхом розведення вихідного розчину глюкози насиченим розчином бензойної кислоти отримують серію розчинів із вмістом глюкози в 1см^3 400; 300; 200; 100; 50 мкг.

Далі відбирають по $0,5\text{см}^3$ отриманих розчинів, додають по 5см^3 антронового реактиву і проводять такі ж операції, як і з досліджуваними пробами. На осі абсцис відкладають вміст глюкози в пробі, а на осі ординат – оптичну густину розчинів.

За калібрувальним графіком знаходять вміст глюкози, яка входить до складу полісахаридного ланцюга глікогену. Для перерахунку на вміст глікогену у пробі отриманий результат помножують на 0,9, оскільки відносна молекулярна маса залишку глюкози у молекулі глікогену становить 162,1, глюкози – 180,1, то $162,1$ поділити на $180,1 = 0,8999$, або 0,9.

Вміст глікогену у досліджуваній тканині розраховують за формулою:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{m \cdot V_1 \cdot 10^6}, \text{ де}$$

X – вміст глікогену в досліджуваній тканині, %;

a – вміст глікогену в досліджуваній пробі, мкг;

V – загальний об'єм розчину глікогену, виділеного з досліджуваної маси тканини, см³;

V_1 – аліквотний об'єм розчину глікогену, взятий для реакції з антроном, см³;

m – маса тканини, взятої для аналізу, г;

100 – перерахунок на проценти;

$1 \cdot 10^6$ – перерахунок з мікрограмів на грами.

ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ВУГЛЕВОДИ ОРГАНІЗМІВ”

1. Із запропонованих тверджень виберіть правильні:

- а) при гліколізі спряження синтезу АТФ з окисненням відбувається на стадії дії альдолази на фруктозо-1,6-дифосфат;
- б) перетворення 1,3-дифосфогліцеринової кислоти в 3-фосфогліцеринову кислоту супроводжується синтезом молекули АТФ;
- в) перетворення 2-фосфоенолпірувату в піруват відбувається з перенесенням фосфору на АДФ з утворенням АТФ;
- г) полісахариди – високомолекулярні сполуки, що містять залишки моносахаридів тільки одного виду;
- д) продуктами гідролізу багатьох полісахаридів є гексози та їх похідні;
- е) за хімічною будовою дисахариди є глікозидами моносахаридів, агліконами яких є залишки моносахаридів.

2. Напишіть рівняння реакцій перетворення D-глюкози в піровиноградну кислоту таким шляхом, у якому бере участь фермент фосфофруктокіназа.

3. Обґрунтуйте твердження:

- а) вміст глікогену в тканинній визначають, обробляючи її гарячим розчином лугу ($\omega=30\%$), осадженням глікогену з отриманого розчину етанолом, наступним кислотним гідролізом осаду і кількісним визначенням мальтози, яка при цьому утворюється;
- б) глікоген повністю гідролізується за участі β -амілази;
- в) глікоген – білий аморфний порошок, легко розчиняється у воді з утворенням опалесціючих розчинів.

4. Глікоген масою 15,2г метилювали, а потім отриманий продукт гідролізували. Внаслідок такої обробки утворилось 8,9 ммоль 2,3-діметилглюкози. Визначте частку залишків глюкози (%), що мають α -

1,6-глікозидний зв'язок; число залишків глюкози, що припадає на один α -1,6-глікозидний зв'язок; кількість 2,3,6-триметилглюкози (ммоль), яка утворилася в результаті такої обробки глікогену; число залишків глюкози в молекулі глікогену, відносна молекулярна маса якого становить $1,8 \cdot 10^6$.

5. Функцією вуглеводів є:

- а) захисна
- б) резервна
- в) структурна
- г) енергетична
- д) каталітична

6. Природні моносахариди відносяться до

- а) L - ряду
- б) D- ряду

4. ЛІПІДИ

4.1. Загальна характеристика ліпідів

Ліпіди – біологічна група речовин різних за хімічною будовою, хімічними властивостями, фізіологічними функціями, основною ознакою яких є нерозчинність або погана розчинність у воді і розчинність в органічних розчинниках: рідких вуглеводнях, спиртах, етерах й естерах, ацетоні, хлороформі, чотирихлористому вуглеці та ін.

Ліпіди у природі дуже поширені. Вони містяться в усіх живих клітинах і виконують життєво важливі функції (структурну, метаболічну, захисну, енергетичну та ін.). Розрізняють прості і складні ліпідні сполуки. Молекули простих ліпідів складаються із залишків спиртів (гліцерину, гліколів, вищих або циклічних) та вищих жирних кислот. До простих ліпідів відносять нейтральні жири, діольні ліпіди, стерини і воски. У молекули складних ліпідів входять залишки спиртів, вищих жирних кислот та інших речовин (азотисті основи, H_2SO_4 , H_3PO_4 , вуглеводи та ін.). До складних ліпідів відносять фосфати, сульфати, гліколіпіди та ін.

У складі жирів тваринного походження переважають залишки насичених жирних кислот, які визначають їхню тверду консистенцію. Серед них значного поширення набули коров'яче масло і такі різні тваринні жири, сало, лой тощо.

У жирах рослинного походження переважають залишки ненасичених жирних кислот, тому вони мають рідку консистенцію. Найбільш поширеними є такі олії, як соняшникова, льяна, оливкова, ріпакова, мигдалева та ін. Різні продукти їжа містять різну кількість жирів. У рослинах їх найбільше міститься в насінні (рицина – 55 – 75, ріпак – 35 – 42, льон – 27 – 50, соняшник – 27 – 60; кукурудза – 4 – 8, овес – 3 – 5, пшениця – 1 – 2 %).

Жири є важливим джерелом енергії. При тканинному окисненні 1 г жиру утворюється 39 кДж. Важливо ще й те, що вони є джерелом ендогенної води. Окиснення 100 г жиру в тканинах дає 106 – 108 г води, що має велике значення для тварин спекотних регіонів землі та для тих представників тваринного світу, які впадають у сплячку. Цінним є й те, що жири є розчинниками багатьох органічних речовин, у тому числі і жиророзчинних вітамінів. Жири з печінки тріскових риб є відомим джерелом вітамінів А і D. Загалом слід зазначити, що біоресурси водних просторів є невичерпними.

У багатьох планктонних організмах вміст жирів великий. Вони є формою зберігання запасів енергії і виконують важливу роль у плавучості. Планктонні рослини часто відкладають жир, а не більш важкий крохмаль. Так, всі діатомові водорості відкладають тільки жир. Деякі види синьо-зелених водоростей, у яких відбувається процес фотосинтезу з виділенням кисню, не синтезують поліненасичені жирні кислоти. Переважаючими в жирно-кислотному спектрі найбільш простих представників *Cyanophyta*, які не здатні фіксувати азот і рости гетеротрофно, є насичена пальмітинова кислота та у дещо меншій мірі – пальмітоолеїнова й олеїнова. У ліпідах синьо-зелених водоростей виявлено галактоліпіди – моногалактозилдіацилгліцерини. З фосфоліпідів є фосфатидилгліцериди.

У клітинах термофільної синьо-зеленої водорості *Synechococcus elongatus* вміст ліпідів коливається у межах від 10,5 до 14,4% на суху речовину залежно від способу вирощування.

Компоненти, що омиляються, складають 43,4 – 44,4% від загальних ліпідів, а ті, що не омиляються, – 6,2-9,5%, гідрофільні 47,7-49,1%. У фракції нейтральних ліпідів містяться вільні жирні кислоти, триацилгліцероли, стерини і стериди. Основними жирними кислотами є пальмітинова (50%), пальмітоолеїнова (6,4–14,8%), олеїнова (25,4-

29,7%). Ненасичені жирні кислоти в *Selongates* представлені тільки олеїною кислотою.

У прісноводних діатомових водоростей *Stephanodiscus hantzschii* і *Melosiravarians* основними жирними кислотами є пальмітинова, пентакозенова, причому насичених жирних кислот менше ніж ненасичених.

У морських водоростей *Cystoseira harbata* і *Fucus virsoides* пальмітинової кислоти міститься 70% від усіх жирних кислот.

У результаті фотоокиснення вільних жирних кислот утворюються токсичні продукти, які пригнічують ріст бактерій на водоростях.

На вміст жирних кислот у водоростях впливають умови культивування. При автотрофному вирощуванні зелених водоростей зростає вміст ліноленої кислоти, а при гетеротрофному – відповідно зменшується вміст лінолевої і олеїнової.

Водорості містять стероли. У *Rhodlophyta* від 75 до 100% загальної маси стеролів складає холестерол. *Ceratium*, *Geledium*, *Centroceras* містять десмостерол, *Centroceras* містить також стигмастерол і ситостерол. У *Lessonia* фракція стеролів представлена фукостеролом (89%) і 2,4-метиленхолестеролом (11%). Вміст стеролів у водоростях можна використати як одну з таксономічних ознак.

Вміст жиру у рибі залежить передусім від виду, а також від рівня та складу ліпідів корму (табл. 5).

Таблиця 5. Вміст жиру в деяких видів риб, %

Осетер	10,9	Щука	0,4
Скумбрія	8,4	Сазан	4,7
Оселедці	5,6	Ставрида	4,6
Окунь морський	6,6	Судак	0,5
Окунь річковий	0,5	Тріска	0,2

Незважаючи на те, що ліпіди змінюються у процесі їх засвоєння, риби, які харчуються у прісних водоймах, відрізняються за складом

ліпідів від тих, які харчуються у морі. Як морські, так і прісноводні риби здатні синтезувати поліненасичені жирні кислоти, але відмінності у складі жирних кислот ліпідів тіла риб із різних районів у більшості випадків обумовлені характером корму. Ліпіди корму, як правило, подібні до ліпідів самих риб.

Триацилгліцероли риб містять 16-18,8% насичених жирних кислот і 81,3-84,2% - ненасичених від загальної маси жирних кислот. Ненасичені жирні кислоти у жирі риб представлені лінолевою, ліноленою, арахідоною кислотами. Високий вміст ненасичених жирних кислот зумовлює рідку консистенцію жиру. Такий жир нестійкий внаслідок легкого окиснення ненасичених жирних кислот. При гідролізі й окисненні жиру змінюється його колір, смак, запах у зв'язку з утворенням у ньому пероксидів, альдегідів, кетонів, оксикислот і низькомолекулярних жирних кислот.

Температура плавлення риб'ячого жиру знаходяться у межах 26,4 – 32,8°C; йодне число – 113,4 – 157,6; коефіцієнт омилення – 184-189,9.

Вміст C_{18} ненасичених жирних кислот в організмі прісноводних риб вищий, а вміст C_{20} і C_{22} ненасичених жирних кислот нижчий, ніж у морських риб. Пальмітоолеїнова кислота в значних кількостях входить до складу ліпідів прісноводних риб. У цілому ліпіди морських і прісноводних риб подібні між собою за співвідношеннями основних жирних кислот.

У прісноводних риб вищий вміст лінолевої кислоти у порівнянні з морськими. Ці відмінності пояснюють різницею в харчуванні.

Так, осетер *Acipenser sturio* живе у морській і прісній воді, але в екземпляра, спійманого у Північному морі, склад ліпідів був „прісноводним”. Вугрі *Anguilla anguilla* чітко розрізняються за складом ліпідів у прісній і морській воді, а риби, спіймані в дельтах рік, що впадають у море, характеризуються проміжним типом будови жирів.

Тип харчування, очевидно, є тут вирішальним фактором. У морських риб вміст лінолевої кислоти складає 0,7–3% від суми жирних кислот, а у прісноводних – 6%.

Фосфатиди риб представлені фосфатидилхолінами, сфінгомелінами, фосфатидилетаноламінами. Сумарний вміст фосфатидів у риб складає 0,4–1,1%.

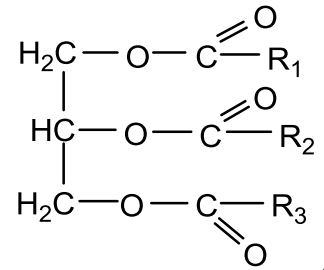
Із стеролів у риб найпоширенішим є холестерол як у вільному стані, так і в комплексі з білками.

Ліпіди еласмобранхій специфічні. Жирні кислоти ліпідів акул відрізняються тим, що вміст насичених і ненасичених жирних кислот з 18 атомами Карбону вище середнього для всіх морських тварин.

У пластинчастозябрових риб, на відміну від костистих, ніколи не буває плавального міхура. Але у них велика печінка, особливо у тих акул, які є добрими плавцями. Так, в акули *Etmopterus spinax* у середньому 17% маси її тіла займає печінка, яка на 75% складається з жиру. Для порівняння слід зазначити, що печінка ссавців містить близько 5% жиру. Половину жиру в печінці акули складає ненасичений вуглеводень сквален ($C_{30}H_{70}$), назва якого походить від назви акул *Squalus*. У печінці деяких глибоководних акул міститься до 90% сквалену, який складає до чверті її маси. Сквален легший, ніж трісковий печінковий жир. Накопичення великих кількостей сквалену у печінці пластинчастозябрових риб допомагає рибі наблизитися до нейтральної плавучості – мати щільність тіла таку, як і вода.

Сквален особливо ефективний тому, що пластинчастозяброві риби, на відміну від костистих, мають порівняно легкий хрящовий скелет, який не містить важких фосфатів Кальцію. У скатів, що живуть на дні, печінка менша і містить менше жиру. У деяких глибоководних костистих риб плавальний міхур наповнений не повітрям, а жиром.

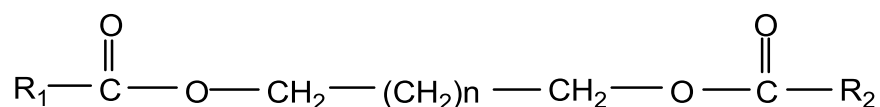
Ацилгліцероли – естери триатомного спирту гліцеролу і вищих жирних кислот. Їх ще називають нейтральними жирами. Загальна формула триацилгліцеролів:



До складу цих жирів входять насичені жирні кислоти: лауринова, міристинова, пальмітинова, стеаринова, лігноцеринова та ін.; ненасичені: пальмітоолеїнова, лінолева, ліноленова, арахідонова, а також деякі оксикислоти: церебронова, рицинолева, оксинервонова. У більшості випадків жирні кислоти, що входять до складу ацилгліцеролів, мають парну кількість атомів Карбону. Співвідношення між насиченими і ненасиченими жирними кислотами у різних триацилгліцеролів буває різне. Як уже відмічалось, коли у складі жиру переважають насичені жирні кислоти, то жир має тверду консистенцію, а коли ненасичені – рідку.

У природних нейтральних жирах рідко буває присутня якась одна жирна кислота, наприклад тристеарилгліцерол, триолеїлгліцерол, трипальмітоолеїлгліцерол. Переважають жири, до складу яких входять різні жирні кислоти, наприклад олеїлстеарилпальмітоїлгліцерол.

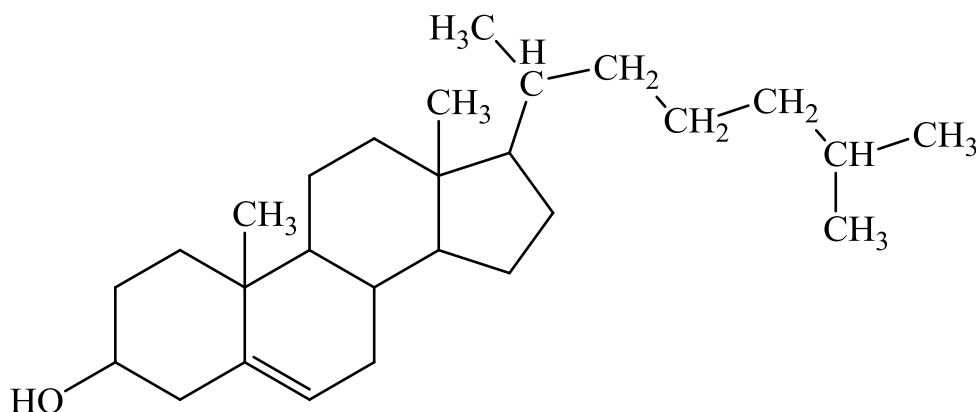
Діольні ліпіди – естери двоатомних спиртів етандіолу, пропандіолу, бутандіолу й ін. та вищих жирних кислот:



Стероли і стериди. Стероли – вторинні циклічні спирти, похідні циклопентанпергідрофенантрону. Стериди – естери стеролів і вищих жирних кислот. В залежності від походження розрізняють зоо-, фіто- і

мікостероли. Стероли – кристалічні речовини, майже не розчиняються у воді, але набухають і тому можуть утримувати значні кількості води.

Розчиняються в органічних розчинниках, вступають у хімічні реакції, характерні для спиртів. Найбільш важливим стеролом є холестерол:

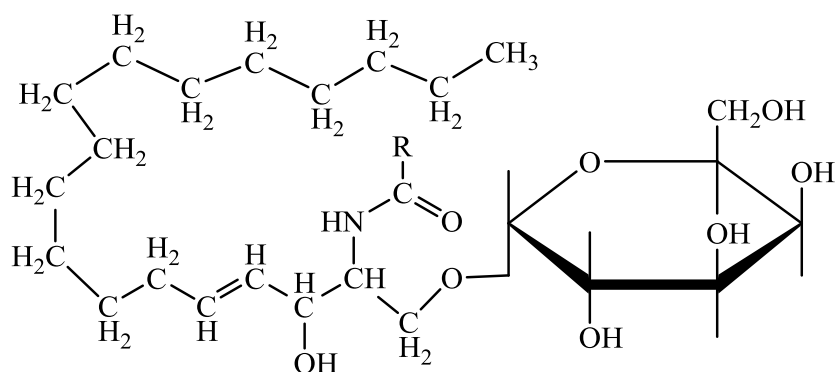


До групи стеролів відносять також їх похідні: вітаміни групи D, жовчні кислоти, кортикостероїдні і статеві гормони, стероїдні алкалоїди, деякі терпенові антибіотики і ін.

Воски – група ліпідів, до складу яких входять естери вищих одноатомних чи двоатомних спиртів і вищих жирних кислот, вільні вищі жирні кислоти, вільні вищі насичені спирти, вуглеводні (C₂₇ – C₃₃), у деяких випадках вітамін A₁ інші речовини.

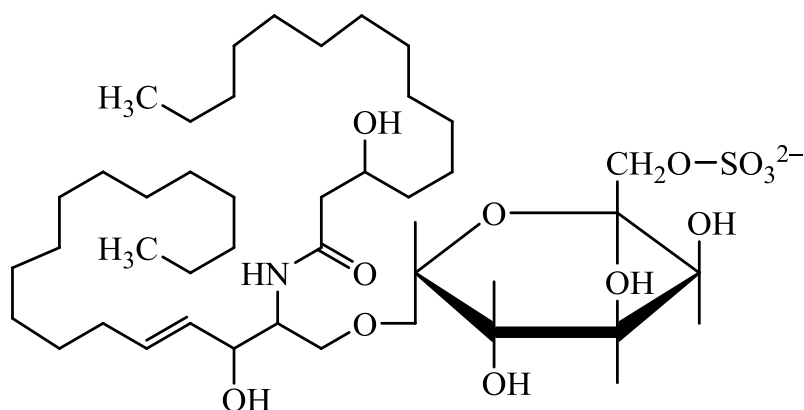
Розрізняють воски тваринного походження (бджолиний, ланолін, спермацет), рослинного походження, викопні (церезин і монтан).

Гліколіпіди. Серед гліколіпідів розрізняють цереброзиди і гангліозиди. Цереброзиди побудовані із залишків сфінгозину, вищих жирних кислот і галактози:



Гангліозиди мають у своєму складі залишки сфінгозину, вищої жирної кислоти, гексоз (галактози, глюкози), галактозаміну і сіалових кислот.

Сульфатиди мають у своєму складі залишки сфінгозину, церебронової або лігноцеринової кислоти, галактози і сульфатної кислоти:



До ліпідів відносять також інші природні сполуки, нерозчинні у воді: вільні вищі жирні кислоти, вільні вищі спирти, жиророзчинні вітаміни А, D, Е, К, F, Q, вуглеводні (наприклад сквален), каротиноїди, простагландини.

Фосфоліпіди. Фосфоліпіди являють собою групу ліпідів, до складу молекул яких входять естери спиртів і вищих жирних кислот, фосфатної кислоти і аміноспиртів.

Фосфатиди з іншими ліпідами і білками входять до складу клітинних мембран, обумовлюють їх вибірккову проникність для різних речовин, беруть участь у процесах клітинного дихання. Структура молекул фосфоліпідів, що містять полярну і неполярну частини (від'ємний заряд фосфату і позитивний атома Нітрогену, гідрофобний довгий ланцюг залишків вищих жирних кислот), обумовлює поверхнево-активні властивості ліпиду, дає можливість формувати плівкові структури у моношарі на межі розділу фаз, взаємодіяти з різними полярними і неполярними сполуками і активно брати участь в реакціях анаболізму і катаболізму.

Значна кількість фосфатидів міститься у нервовій тканині (до 30%), печінці (16%), нирках (11%), серці (10%). Фосфатиди синтезуються у комплексі Гольджі.

Залежно від спирту, на основі якого утворюється фосфатид, розрізняють гліцерофосфатиди, інозитфосфатиди і сфінгозинфосфатиди.

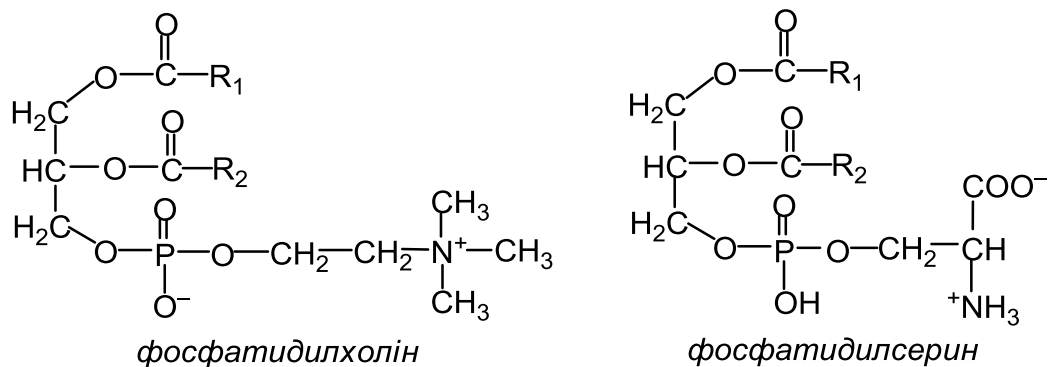
Молекула гліцерофосфатидів представляє собою естер гліцеролу і вищих жирних кислот, фосфатної кислоти і аміноспиртів. У залежності від характеру аміноспирту гліцерофосфатиди поділяють на фосфатидилхоліни, фосфатидилетаноламіни і фосфатидилсерини.

Фосфатидилхолінів багато в тканинах спинного і головного мозку, легенях, міокарді, нирках.

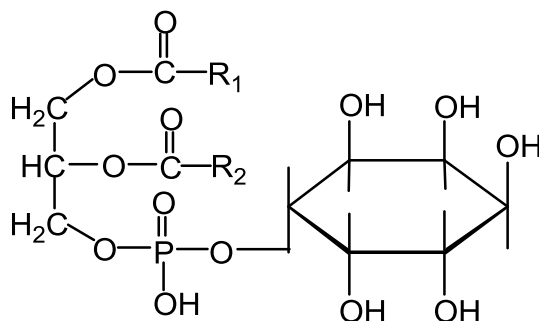
Фосфатидилетаноламіни складають ліпідну основу тканин головного мозку людини (66%), печінки великої рогатої худоби (51%), міокарду (30%). Значні кількості фосфатидилетаноламінів містять мітохондрії.

На відміну від фосфатидилхолінів, фосфатидилетаноламіни погано розчиняються у спирті і цю властивість використовують для розділення цих ліпідів.

У молекулах фосфатидилсеринів роль аміноспирту виконує амінокислота серин.

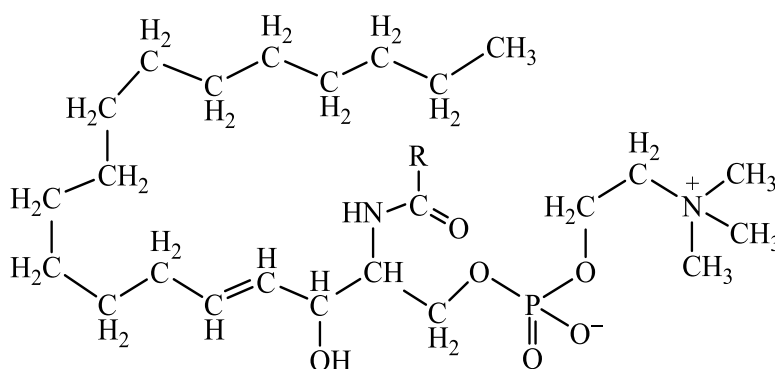


Інозитфосфатиди представляють собою естери гліцеролу і вищих жирних кислот, фосфатної кислоти і шестиатомного спирту інозиту:



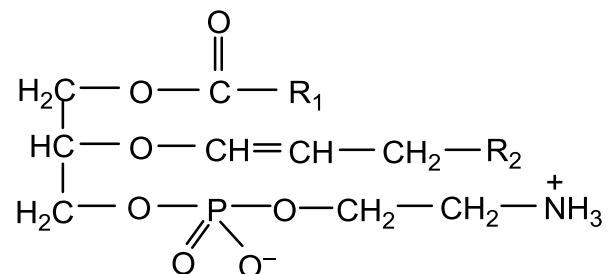
Інозитфосфатиди виявляються у мозку, особливо в мієлінових оболонках нервових волокон.

Молекули сфінгозинфосфатидів утворені із залишків сфінгозину, вищих жирних кислот, фосфатної кислоти і холіну:



Ці ліпіди часто називають сфінгомієлінами – вони складають основу мієлінових оболонок нервових волокон.

До фосфатидів відносяться плазмалогени, у яких до спиртової групи гліцеролу у другому положенні замість жирної кислоти приєднується альдегід жирної кислоти в енольній формі:



4.2. Біологічна роль та метаболізм холестеролу

Стероли і стериди широко розповсюджені в рослинних і тваринних організмах. У залежності від походження розрізняють зоо-, фіто- і мікостероли. Найбільш розповсюдженим стеролом є холестерол, відкритий при дослідженні жовчних каменів, які на 90% складаються з холестеролу.

Холестерол в організм тварин і людини може поступати з їжею, а також синтезуватись з ацетил-КоА. Всмоктування холестеролу їжі покращується у присутності солей жовчних кислот. Холестерол всмоктується у лімфатичні судини кишечника. При всмоктуванні основна частина його естерифікується жирними кислотами, переважно стеариновою, пальмітиною або олеїною, і з'являється в хіломікронах лімфи у вигляді естерів холестеролу.

У тваринному організмі холестерол складає 0,25-0,30% сухої речовини. Найбільше холестеролу міститься в нервовій тканині, особливо у білій речовині головного мозку (4-5,3%), У сірій речовині його 0,9-1,4%.

Печінка є і головним джерелом, і основним центром розподілення холестеролу плазми, частина якого вивільняється з крові, з'являючись у жовчі.

Основним місцем синтезу холестеролу є печінка, хоч і інші тканини, наприклад кишечник, надниркові залози, шкіра, нервова тканина, аорта і репродуктивні органи також синтезують цей стерол. В усіх тканинах, за винятком нервової, холестерол знаходиться у стані безперервного обміну.

Основна регуляція синтезу холестеролу здійснюється на пусковій стадії його утворення, а саме при відновленні 3-окси-3-метилглутарил-КоА в мевалонову кислоту. Підвищений вміст вуглеводів або триацилгліцеролів стимулює синтез холестеролу з ацетил-КоА. Чим більш насичені жирні кислоти їжі, тим вища концентрація холестеролу в сироватці. Контроль синтезу холестеролу здійснюється за механізмом зворотного зв'язку.

Швидкість перетворення холестеролу в його метаболіти, у тому числі і жовчні кислоти, впливає на рівень виділення холестеролу печінкою у жовч і, внаслідок цього, на кількість холестеролу, яка всмоктується з кишечника. Таким чином, цей холестерол, так як і холестерол їжі, може впливати на швидкість синтезу холестеролу. Біосинтез холестеролу у печінці пригнічується холестеролом, що надходить з їжею.

4.3. Основні біологічні функції ліпідів

Енергетична функція. Цю функцію в організмі виконують переважно триацилгліцероли (нейтральні жири), які утворюють депо в жировій тканині. При повному окисненні 1г жиру звільняється близько 38,9 кДж енергії.

Структурна функція. Цю функцію виконують переважно фосфоліпіди і інші ліпіди, що входять до складу ліпоротеїнових комплексів біологічних мембран клітин і субклітинних структур – ядра, мітохондрій, ендоплазматичної сітки, лізосом і ін.

Захисна функція. Ліпіди захищають внутрішні органи від механічних пошкоджень, переохолодження.

Ліпіди як регулятори обміну речовин. Ліпідами є багато біологічно активних речовин (жиророзчинні вітаміни, каротиноїди, стероїдні гормони, простагландини і ін).

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Ліпіди

Лабораторна робота 1

Дослідження властивостей жирів

Дослід 1. Визначення температури плавлення та застигання жиру

Принцип методу. Температура плавлення найбільш поширених жирів – триацилгліцеролів залежить від характеру вуглеводних ланцюгів молекул жирних кислот, що входять до складу цих естерів. Чим вищий вміст кислот з коротким ланцюгом або ненасичених кислот, тим нижча температура, при якій вони плавляться. Рослинні олії за звичайних умов є рідкими, оскільки у їх складі частка ненасичених жирних кислот складає 95-97%. Жири тваринного походження здебільше тугоплавкі, в них переважають насичені жирні кислоти з довгими вуглеводневими ланцюгами.

Природні жири певної точки плавлення не мають, оскільки вони не є індивідуальними речовинами, а являють собою суміші різних ацилгліцеролів, вільних жирних кислот, вітамінів, пігментів, інших речовин, що розчинні в жирах.

Температура плавлення жирів у зв'язку з цим має певний діапазон від початку розплавлення до повного розплавлення зразка жиру.

Мета роботи. Освоїти методику визначення температури плавлення та застигання жиру. Порівняти цей показник для риб і ссавців.

Обладнання та реактиви. Неширока пробірка. Капіляр діаметром 1,5-2мм. Різний жир. Лід чи морозильна камера. Термометр.

Хід роботи. Чистий сухий капіляр діаметром 1,5-2мм заповнюють охолодженим жиром на висоту близько 2см, витримують протягом однієї години в льоду чи в морозильній камері.

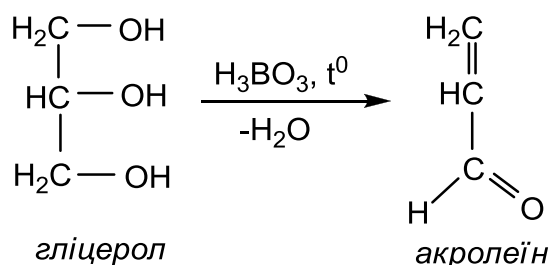
У нешироку пробірку поміщають 2-3см³ розтопленого жиру й туди ж вставляють термометр. Пробірка поміщається у склянку з во-

дою, температура якої повинна бути нижче точки застигання жиру. Вода у склянці рівномірно перемішується. Температура почне падати, а потім зупиняється на одному рівні. Це і є температура застигання.

Через якийсь час може наступити невелике підвищення температури, пов'язане з випаданням із розчину гліцеридів із високою точкою плавлення.

Дослід 2. Виявлення жирів. Акролеїнова проба

Принцип методу. Жири дають характерну масляну пляму. Склою паличкою краплю жиру наносять на шматок паперу. З'являється сальна пляма, що не зникає при нагріванні. Реакцією на присутність жиру може бути акролеїнова проба. При нагріванні жиру з речовинами, що віднімають воду, як, наприклад, KHSO_4 , NaHSO_3 або H_3BO_3 , з'являються дуже їдкі пари акролеїну, що утворюються з гліцеролу у зв'язку з відщепленням від останнього двох молекул води:



Мета роботи. Освоїти методику та пояснити принцип проведення акролеїнової проби.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Рослинна олія. Тваринний жир. Риб'ячий жир. Віск. KHSO_4 або NaHSO_3 кристалічні.

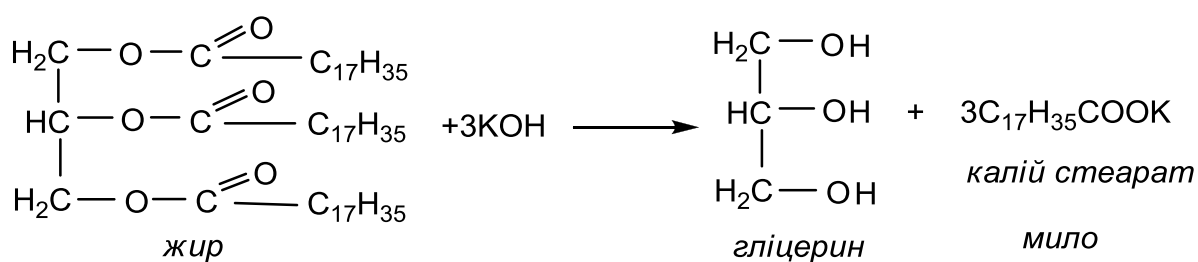
Хід роботи. Беруть дві сухі пробірки. В одну з них додають декілька крапель рослинної олії, або риб'ячого жиру, в іншу - тваринного жиру. У кожену пробірку додають сухого порошку KHSO_4 або NaHSO_3 . Перемішують й обережно нагрівають. З'являється різкий запах акролеїну. Ту ж реакцію проводять із воском. Отримані результати заносять у таблицю 6:

Таблиця 6. Результати акролеїнової проби

№ пробірки	Вміст пробірок	Результат (позитивний або негативний)	Висновок
1	Яловичий жир		
2	Риб'ячий жир		
3	Соняшникова олія		
4	Віск		

Дослід 3. Гідроліз жирів

Принцип методу. При гідролізі жир розкладається на свої компоненти: трьохатомний спирт гліцерол і вищі жирні кислоти. Цей процес має назву омилення. Якщо гідроліз іде під впливом кислот, перегрітої водяної пари або під впливом ферментів (ліпаз), жир розпадається на гліцерол і жирні кислоти. Якщо гідроліз іде у присутності лугів, то утворюються гліцерол і мила. Останні являють собою солі вищих жирних кислот. КОН утворює рідкі мила (зелене мило), NaOH утворює тверді мила. Солі лужних металів розчинні у воді, солі лужноземельних і важких металів у воді не розчинні (нерозчинні мила). Реакція протікає за наступним рівнянням:



Мета роботи. Освоїти методику проведення гідролізу жирів та дослідити продукти гідролізу.

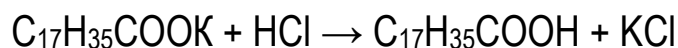
Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Пробірка із пробкою й трубкою як повітряний холодильник. Випарювальна чашка. Водяна баня. Лійка з фільтром. Жир тваринний. Жир рослинний. Жир риб'ячий. Спиртовий розчин лугу. Хлоридна кислота (1:1). Спирт.

Розчин соди ($\omega=10\%$). Фенолфталеїн. Натрій хлорид, кристалічний. Розчин кальцій хлориду, ($\omega=10\%$). Розчин купрум сульфату, ($\omega=10\%$). Розчин п्लомбум ацетату, ($\omega=10\%$). Розчин AgNO_3 , ($\omega=10\%$).

Хід роботи. Приблизно 0,5г жиру (тваринного, риб'ячого або рослинного) поміщають у широку пробірку і доливають 5см^3 концентрованого спиртового розчину лугу (NaOH або KOH). Пробірку закривають пробкою, через яку проходить повітряний холодильник, і нагрівають протягом 20-30хв. Нагрівання припиняють, коли крапля гідролізату, внесена у воду, не утворює жирних плям на поверхні. Після закінчення гідролізу рідину переливають у випарювальну чашку, додають 20см^3 дистильованої води і нагрівають на водяній бані, щоб видалити спирт. Із отриманим розчином мила проводять наступні реакції.

Дослід 4. Виділення вільних жирних кислот

Хід роботи. До частини гідролізату додають (1:1) хлоридну або сульфатну кислоту. Випадає осад вільних жирних кислот.



МИЛО КИСЛОТА

Осад фільтрують і промивають на фільтрі дистильованою водою до зникнення кислоти на лакмус реакції промивних вод.

Частину осаду жирних кислот розчиняють в діетиловому етері і доливають у пробірку, де знаходиться $1-2\text{см}^3$ спирту, додають 1 краплю розчину соди, 2 краплі фенолфталеїну. Рожеве забарвлення зникає, відбувається нейтралізація соди вільними жирними кислотами. Виділені вільні жирні кислоти жирні на дотик і маслять папір.

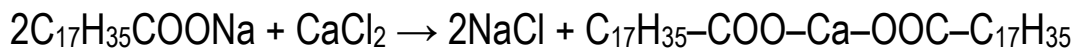
Дослід 5. Висолювання мила

Хід роботи. Частину гідролізату наливають у пробірку і насичують кристалічним NaCl . Мило висолюється, тобто випадає з розчину.

Дослід 6. Розчинність різних мил

Хід роботи. Гідролізат, що залишився, розливають у 5 пробірок. У першу додають дистильовану воду і збовтують. Утворюється піна.

У другу доливають декілька крапель розчину CaCl_2 . Випадає нерозчинний осад кальцієвого мила. У третю пробірку доливають декілька крапель 10% розчину CuSO_4 ($\omega=10\%$). При цьому випадає осад мідного мила. У четверту додають декілька крапель AgNO_3 - випадає осад срібного мила. У п'яту додають декілька крапель $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, випадає осад свинцевої солі (свинцевий пластир). Випадають нерозчинні у воді мила лужноземельних і важких металів:



Нерозчинністю кальцієвих і магнієвих мил пояснюється погана милкість твердої води. При нагріванні свинцевого мила виходить в'язкий, клейкий пластир, що має велике значення в медицині і ветеринарії.

П'яту пробірку розбавляють водою і збовтують. У результаті зниження поверхневого натягу утворюється піна.

Дослід 7. Визначення кислотного числа жиру

Принцип методу. Кислотне число жиру характеризує наявність у жирі вільних жирних кислот. Кислотне число вимірюється масою калій гідроксиду (в мг), яка необхідна для нейтралізації вільних жирних кислот, що містяться в 1г жиру. Метод визначення кислотного числа заснований на тому, що вільні жирні кислоти, які є в жирі, відтитровують розчином калій гідроксиду ($c=0,1$ моль/дм³).

Мета роботи. Освоїти методику визначення кислотного числа жиру. Порівняти цей показник для риб і ссавців.

Обладнання та реактиви. Аналітичні терези. Конічна колба об'ємом 50-100см³. Риб'ячий жир. Нейтральна суміш етанолу і діети-

лового етеру (1:1). Фенолфталеїн. Спиртовий розчин калій гідроксиду ($c = 0,1$ моль/дм³).

Хід роботи. Жир масою 2-3г, зважений на аналітичних терезах, вміщують у конічну колбу об'ємом 50-100см³ і розчиняють у 10-15см³ нейтральної суміші етанолу і діетилового етеру (1:1). Для нейтралізації до суміші спирту і етеру (1:1) додають 3-4 краплини розчину фенолфталеїну, а потім краплинами спиртовий розчин калій гідроксиду ($c = 0,1$ моль/дм³) до появи блідо-рожевого забарвлення. Після розчинення жиру вносять 1-2 краплини розчину фенолфталеїну і титрують спиртовим розчином калій гідроксиду ($c = 0,1$ моль/дм³) до блідо-рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 30с.

Кислотне число розраховують за формулою:

$$\text{Кислотне число} = \frac{VT}{m}, \text{ де}$$

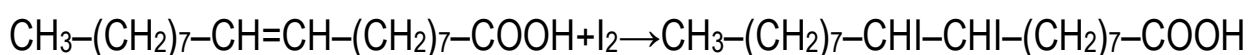
V - об'єм розчину КОН, який використано на титрування взятої маси жиру, см³;

T - титр розчину КОН, мг/см³;

m - маса взятого для аналізу жиру, г.

Дослід 8. Визначення йодного числа жиру

Принцип методу. Йодне число жиру характеризує рівень ненасичених жирних кислот, що входять до складу даного жиру, як вільних кислот, так і в складі естерів. Ненасичені сполуки легко приєднують йод за місцем подвійного зв'язку, наприклад:



Олеїнова кислота

Йодне число визначається масою йоду (в г), яка приєднується до 100г жиру.

Мета роботи. Освоїти методику визначення йодного числа, жиру. Порівняти цей показник для риб і ссавців.

Обладнання та реактиви. Аналітичні терези. Конічна колба на 250см³ з пришліфованим скляним корком. Скляний бюкс. Градуйована піпетка. Водяна баня. Бюретка. Риб'ячий жир. Етанол. Спиртовий розчин йоду ($c(1/2)=0,2$ моль/дм³). Дистильована вода. Натрій тіосульфат ($c(1/2)=0,1$ моль/дм³). Розчин крохмалю.

Хід роботи. У суху конічну колбу об'ємом 250см³ з пришліфованим скляним корком вміщують 3-4 краплини досліджуваного жиру. Масу внесеного жиру визначають так: зважують скляний бюкс з жиром і піпеткою, відбирають піпеткою 3-4 краплини жиру, переносять жир у колбу і знову зважують бюкс з піпеткою. За різницею мас бюкса з жиром і піпеткою до відбору і після відбору проби визначають масу жиру, взятого для визначення йодного числа. В колбу додають 25см³ етанолу для розчинення жиру. Якщо жир погано розчиняється, колбу можна підігріти на водяній бані. В іншу таку ж колбу вносять 25см³ етанолу (контроль). У кожену колбу (дослід і контроль) додають із бюретки 12,5см³ спиртового розчину йоду з молярною концентрацією еквівалента 0,2 моль/дм³, перемішують, додають по 100см³ дистильованої води і добре збовтують, закривши корком. Через 5хвилин вміст колб титрують розчином натрій тіосульфату ($c(1/2)= 0,1$ моль/дм³) до появи солом'яного забарвлення, а потім вносять 1см³ розчину крохмалю і закінчують титрування до знебарвлення вмісту колби.

Йодне число (в г) розраховують за формулою:

$$\text{Йодне число} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot T \cdot 100}{m}, \text{ де}$$

V_1 - об'єм розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c(1/2) = 0,1$ моль/дм³), який пішов на титрування контролю, см³;

V_2 - об'єм розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c(1/2) = 0,1$ моль/дм³), який пішов на титрування дослідної проби, см³;

T – титр розчину $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($c(1/2) = 0,1$ моль/дм³) за йодом, г/см³ ($T=0,0127$ г/см³);

m – маса досліджуваного жиру, г.

Дослід 9. Визначення числа омилення і естерного числа жиру

Принцип методу. Числом омилення жиру називається маса калій гідроксиду (у мг), яку необхідно витратити на нейтралізацію як вільних, так і зв'язаних в естерах жирних кислот, що містяться в 1г жиру.

Вміст вільних жирних кислот у жирі характеризується кислотним числом, а вміст зв'язаних в естерах кислот – естерним числом. Естерне число – маса калій гідроксиду (в мг), яка необхідна для нейтралізації жирних кислот, які звільнюються при омиленні естерних зв'язків в 1г жиру.

Естерне число визначається як різниця між числом омилення і кислотним числом.

Мета роботи. Освоїти методику визначення естерного числа жиру. Порівняти цей показник для риб чи ссавців і рослин.

Обладнання та реактиви. Аналітичні терези. Колба об'ємом 50см³. Бюретка. Спиртовий розчин калій гідроксиду ($c=0,5$ моль/дм³). Корки із зворотними повітряними холодильниками. Водяна баня. Риб'ячий жир. Рослинна олія. Розчин фенолфталеїну. Хлоридна кислота ($c=0,5$ моль/дм³).

Хід роботи. У дві колби об'ємом 50см³ вносять 0,5 жиру чи олії, зваженого з точністю до 1мг, а в третю колбу – 0,5см³ води. Потім у всі колби додають із бюретки по 15см³ спиртового розчину калій гідроксиду ($c=0,5$ моль/дм³). Колби закривають корками із зворотними повітряними холодильниками і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 40 хвилин при періодичному збовтуванні. Рідина в колбі повинна слабо кипіти, верхня частина холодильника не повинна бути гарячою.

Після закінчення омилення в кожену колбу додають по 15-20 см³ води, по 3-4 краплини розчину фенолфталеїну і титрують розчином хлоридної кислоти ($c=0,5$ моль/дм³) до зникнення малинового забарвлення.

Число омилення розраховують за формулою:

$$\frac{(V_1 - V_2) \cdot T}{m}$$

Число омилення = $\frac{(V_1 - V_2) \cdot T}{m}$, де

V_1 - об'єм розчину HCl ($c=0,5$ моль/дм³), який пішов на титрування контролю (колба з водою), см³;

V_2 - об'єм розчину HCl ($c=0,5$ моль/дм³), який пішов на титрування досліджуваної проби (колба з жиром чи олією), см³;

T - титр розчину HCl ($c=0,5$ моль/дм³) за калій гідроксидом, мг/см³ ($T=28$ мг/см³);

m - маса досліджуваного жиру, г.

Естерне число = Число омилення - Кислотне число

Дослід 10. Розчинність жирів

Принцип методу. Досліджують розчинність різних жирів: риб'ячого жиру, яловичого або свинячого сала, коров'ячого масла, маргарину, рослинних олій у різних розчинниках.

Мета роботи. Засвоїти методику визначення розчинності різних жирів у різноманітних розчинниках.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Скляні трубки. Піпетки або дозатори. Водяна баня. Різні жири. Етер діетиловий. Хлороформ. Спирт етиловий.

Хід роботи. Беруть три серії пробірок по чотири в кожній. У першу серію пробірок (№ 1-4) поміщають маленький шматочок, приблизно з горошину, твердого жиру (наприклад, яловичого), у другу серію пробірок (№ 5-8) наливають декілька крапель рослинної олії, у третю (№ 9-13) - декілька крапель риб'ячого жиру. Потім у першу пробірку кожної серії наливають 2-3 см³ дистильованої води, у другу -

діетилового етеру, у третю – хлороформу, у четверту – спирту. Всі пробірки добре збовтують і спостерігають. Якщо в якій-небудь пробірці розчинення не відбувається, її обережно підігривають на водяній бані. Результати дослідів записують у таблицю.

Таблиця 7. Результати дослідів

№ п/р	Розчинник				
	Жир	Вода	Етер	Хлороформ	Спирт
1	Яловичий				
2	Риб'ячий				
3	Рослинна олія				

Дослід 11. Емульгування жирів

Принцип методу. При збовтуванні риб'ячого жиру з водою утворюється нестійка емульсія. Суміш розділяється на два шари. При додаванні ж декількох крапель ($\omega=5\ldots 10\%$) розчину Na_2CO_3 , до суміші жиру з водою й наступному збовтуванні утворюється досить стійка емульсія. Вплив соди полягає у тому, що в природних жирах завжди є деяка кількість вільних жирних кислот, з якими сода утворює мило, що дає дисперсній фазі оболонку, яка стабілізує останню. При додаванні соди до прогрітого жиру емульсія утворюється дуже стійка, що обумовлено присутністю великої кількості вільних жирних кислот у прогрітому маслі й утворенням із них мила. Проба на емульгування з нейтральним жиром (свіжим) негативна, тому що в ньому немає вільних жирних кислот і тому не утворюється стабілізуюча оболонка з мила.

При збовтуванні нейтрального жиру з розведеним розчином білка утворюється стійка емульсія. Емульсія стає стійкою у присутності речовин, що знижують поверхневий натяг, таких як мила, білки, жовчні кислоти.

Мета роботи. Освоїти методику емульгування жирів.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Жир нейтральний. Жир прогірклий. Розчин Na_2CO_3 ($\omega=10\%$). Жовч. Білок. Розчин хлоридної кислоти, ($\omega=10\%$).

Хід роботи. Беруть 8 пробірок. У кожену з них наливають по 3 см³ дистильованої води й додають декілька крапель жиру. У перші 5 пробірок додають жир нейтральний, а у пробірки 6, 7 і 8 – жир прогірклий. Потім у пробірки № 2 і 7 додають 2-3 краплі 10% розчину соди, у пробірку №3 – жовчі, у пробірку № 4 – розчин білка, у пробірки № 5 й 8 – розчин кислоти. У пробірках 1 і 6 знаходиться тільки жир і вода. Всі пробірки закривають і ретельно збовтують. Залишають на 5хв. стояти й спостерігають стійкість емульсії. Результати заносять в таблицю .

Таблиця 8. Результати досліду

№ п/р	Вміст пробірок	Висновки
1	Нейтральний жир + вода	
2	Нейтральний жир +сода	
3	Нейтральний жир +жовч	
4	Нейтральний жир +білок	
5	Нейтральний жир +кислота	
6	Прогірклий жир +вода	
7	Прогірклий жир +сода	
8	Прогірклий жир +кислота	

Лабораторна робота 2

Визначення загального вмісту вільних ліпідів у тканинах за допомогою апарату Сокслета

Принцип методу. Ліпіди з досліджуваної тканини вилучають шляхом їх безперервної екстракції в апараті Сокслета жиророзчинниками. Загальний вміст ліпідів визначають за різницею мас зразка до і після екстракції. Для екстракції ліпідів використовують органічні розчинники: діетиловий етер, петролейний етер з температурою кипіння

не вище 60°C, хлороформ, чотирихлористий вуглець і ін. Найчастіше використовують діетиловий етер. Він повинен бути перегнаним і очищеним від пероксидів.

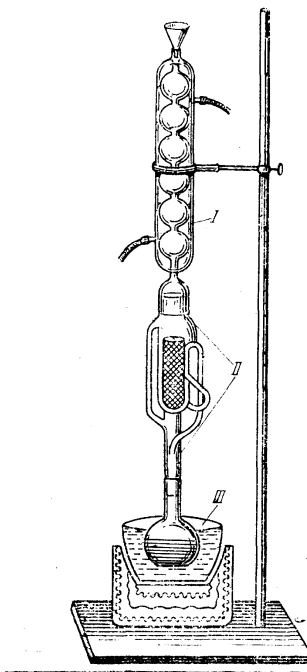
У діетиловому етері розчиняються триацилгліцероли, жирні кислоти, стероли, фосфатидилхоліни, фосфатидилетаноламіни, пігменти, воски, ефірні олії і ін. Таку суміш часто називають фракцією сирого жиру.

Мета роботи. Ознайомитися з методикою визначення загального вмісту вільних ліпідів у тканинах. Порівняти вміст вільних ліпідів у різних органах та тканинах.

Обладнання та реактиви. Апарат Сокслета. Колба на 1000 см³. Ділильна лійка. Водяна баня. Вакуум-сушильна шафа з подачею вуглекислого газу або азоту. Паперовий пакетик чи патрон. Фільтрувальний папір знежирений. Калій перманганат ($\omega=4\%$). Натрій гідроксид або калій гідроксид ($\omega=40\%$). Етер діетиловий. Натрій сульфат безводний. Розчин крохмалю. Досліджуваний матеріал (м'язи, печінка та ін). Калій йодид. Діетиловий етер перед роботою очищають. Для цього 500см³ етеру змішують з 50см³ розчину калій перманганату ($\omega=4\%$) і 5см³ розчину натрій гідроксиду або калій гідроксиду ($\omega=40\%$), збовтують у колбі і залишають у темряві на добу. Потім суміш розділяють у ділильній лійці. Нижній шар зливають, а верхній – діетиловий етер – промивають 5-6 разів дистильованою водою у співвідношенні 2:1. Етер висушують безводним натрій сульфатом протягом доби, переганяють на заздалегідь нагрітій водяній бані. При перегонці етеру в лабораторії не повинно бути працюючих джерел відкритого вогню. Відсутність в етері пероксидів визначають за реакцією з KI. Пероксиди окиснюють йодид-іон до вільного йоду, який виявляють розчином крохмалю.

Хід роботи. Апарат Сокслета (рис. 2). складається з трьох частин: колби, екстрактора і холодильника. В колбу вносять розчинник,

якого не повинно бути більше 3/4 об'єму колби. Колбу з розчинником нагрівають на водяній бані. Водяну баню не можна нагрівати на відкритому вогні, а тільки на електроплитці із закритою спіраллю. Досліджуваний матеріал поміщають в екстрактор у спеціальному патроні з фільтрувального паперу або пакетику. Через холодильник пропускають сильний струмінь води для надійного охолодження. Всі сполучення в апараті Сокслета повинні бути на шліфах.



*Рис. 2. Апарат Сокслета
I – холодильник; II – екстрактор;
III – колба*

Досліджуваний матеріал (м'язи, печінка, інші органи і тканини) попередньо висушують до постійної маси у вакуум – сушильній шафі з подачею в неї сухого вуглекислого газу або азоту. Якщо сушити матеріал у звичайній сушильній шафі при 100-105°C, то ненасичені жирні кислоти, що входять до складу жиру, будуть швидко окиснюватись. Окиснений жир погано екстрагується із зразка, що призводить до зниження результатів аналізу.

Близько 2г висушеного матеріалу ретельно подрібнюють, переносять у паперовий патрон чи пакетик і зважують. Фільтрувальний

папір, з якого роблять патрон чи пакетик, повинен попередньо бути знежиреним.

Після зважування патрона чи пакетика з вміщеним у них досліджуваним матеріалом переносять в екстрактор апарата Сокслета, який заздалегідь заповнюють етером так, щоб зразок був повністю занурений у розчинник. При цьому частина жиру вже переходить у розчин.

Потім всі частини апарата Сокслета герметично з'єднують, включають холодильник і джерело нагрівання. Під час роботи апарат повинен стояти виключно у вертикальному положенні. Час вилучення жиру із зразка в апараті залежить від характеру матеріалу, ступеню його подрібнення, взятої для аналізу маси матеріалу, від швидкості наповнення екстрактора розчинником після спорожнення. Вилучення жиру із зразка досліджуваного матеріалу відбувається протягом 5-12 годин.

Гарячі пари етеру піднімаються по трубці екстрактора в холодильник, конденсуються і знову стікають в екстрактор. Коли рідина в екстракторі підніметься вище верхнього коліна сифона, етер, що містить жири, почне стікати в колбу. Процес повторюється аж до повного вилучення жиру із зразка.

Для визначення закінчення екстракції краплину етеру, що стікає з екстрактора, наносять на фільтрувальний папір. Якщо екстракція закінчилась, на висушеному фільтрувальному папері не повинно залишитися жирної плями.

Після закінчення екстракції знежирені патрон чи пакетик виймають з апарата Сокслета і висушують спочатку на склі у витяжній шафі, а після випаровування етеру – у сушильній шафі при 100-105°C до постійної маси. Для повного висушування треба близько 5 годин. Потім зважують патрон чи пакетик із вмістом на аналітичних терезах.

Вміст ліпідів у досліджуваній тканині (в %) визначають за різницею маси зразка до і після екстракції.

Лабораторна робота 3

Дослідження властивостей фосфатидів і стеринів

Дослід 1. Виділення фосфатидів

Принцип методу. До ліпідів також відносяться фосфатиди і стерини (та їх естери з жирними кислотами). Найбільш часто зустрічаються лецитини і кефаліни. Лецитини розчинні у хлороформі, етері, спирті, бензині, сірковуглеці. На відміну від жирів не розчиняються у ацетоні і можуть бути виділені з розчинів у хлороформі, спирті або етері при додаванні ацетону.

Кефаліни – сполуки, побудовані за типом лецитинів, але мають замість залишків холіну залишки етаноламіну: $\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{OH}$.

Фосфатиди присутні в кожній клітині тваринного організму. Особливо багато їх у нервовій тканині й у жовтку курячого яйця.

Мета роботи. Навчитися виділяти фосфоліпіди з досліджуваного розчину. Пояснити механізм утворення осаду фосфоліпідів.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Скляна паличка. Лійка з фільтром. Водяна баня. Тигель. Ацетон. Розчин калій або натрій гідроксиду ($\omega=10\%$). Розчин хлоридної кислоти ($\omega=10\%$). Калій гідросульфат кристалічний. Калій нітрат. Нітратна кислота. Амоній молібдат. Спирт. Кадмій хлорид, спиртовий розчин. Хлороформ. Діетиловий етер. Хлоридна кислота, розведена. Спиртовий розчин платини хлориду ($\omega=10\%$).

Хід роботи. До згущеного до сиропоподібної консистенції екстракту при енергійному помішуванні скляною паличкою додають ацетон невеликими порціями. Випадає осад фосфатидів. У розчині залишається холестерол. Рідину відфільтровують у пробірку і проводять з

нею реакції на холестерол. Осад фосфатидів використовують для реакції на лецитини.

Дослід 2. Гідроліз фосфатидів

Хід роботи. Більшу частину осаду фосфатидів переносять до пробірки, нагрівають з 2-3см³ калій або натрій гідроксиду ($\omega=10\%$) і кип'ятять протягом 5-10хв. Відбувається гідроліз лецитину на його компоненти. При цьому відчувається запах оселедцевого розсолу внаслідок часткового відщеплення триметиламіну з холіну. Після гідролізу у розчині встановлюють наявність жирних кислот, гліцеролу, фосфатної кислоти і холіну.

1. Виділення жирних кислот

Хід роботи. Рідину розбавляють невеликою кількістю води й підкиснюють хлоридною кислотою ($\omega=10\%$). Випадає осад вільних жирних кислот. Осад відфільтровують. Фільтрат нейтралізують ($\omega=10\%$) лугом і випарюють на водяній бані досуха.

2. Виявлення холіну

Хід роботи. Частину отриманого сухого залишку розчиняють у спирті й осаджують холін спиртовим розчином платини хлориду ($\omega=10\%$). Осад, що утворився, відфільтровують, висушують і розчиняють у можливо меншій кількості гарячої води. Після охолодження або при повільному випарюванні на повітрі виділяються (іноді великі) помаранчево - червоні кристали хлороплатинату холіну.

3. Виявлення гліцеролу

Хід роботи. Іншу частину осаду сплавляють у пробірці з KHSO_4 . При цьому виявляють гліцерол (акролеїнова проба).

4. Виявлення фосфату

Хід роботи. Третю частину осаду сплавляють у тиглі з невеликою кількістю калій нітрату і натрій карбонату. Сплав розчиняють у 2см³ концентрованої нітратної кислоти, розтирають паличкою, злива-

ють у пробірку і нагрівають з великим надлишком амоній молібдату. Утворюється жовтий осад $[(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_{12} \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$.

Залишок суміші фосфатидів розчиняють у невеликій кількості теплого спирту і розчин ділять на дві частини:

1) при достатньому розведенні однієї частини розчину водою утворюється біла емульсія лецитину;

2) до іншої частини спиртового розчину додають спиртовий розчин кадмій хлориду. Утворюється білий осад кадмієвої сполуки лецитину.

Дослід 3. Розчинність фосфатидів

Хід роботи. У п'ять пробірок кладуть небагато лецитину. У першу пробірку наливають 2-3 см³ хлороформу, в іншу стільки ж етеру, у третю – спирту, у четверту – ацетону, у п'яту – воду. Всі пробірки добре збовтують. У перших трьох пробірках лецитин розчиняється, а в ацетоні і воді не розчиняється.

Якщо до розчину лецитину в діетиловому етері або хлороформі додати ацетон у надлишку – лецитин випадає.

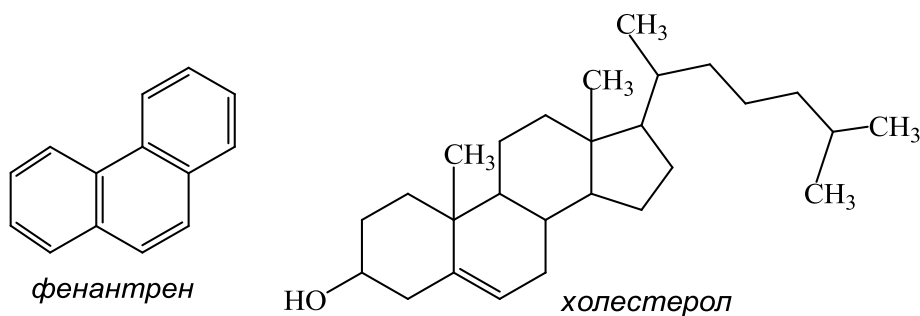
При додаванні до розчину лецитину у спирті декількох крапель розведеної сульфатної кислоти – лецитин випадає. Отримані результати занести до таблиці 9.

Таблиця 9. Результати дослідів

№ пробірки	Вміст пробірки	Спостереження
1	Лецитин + хлороформ	
2	Лецитин + діетиловий етер	
3	Лецитин + етиловий спирт	
4	Лецитин + ацетон	
5	Лецитин + вода	
6	Лецитин + хлороформ + ацетон у надлишку	

Дослід 4. Властивості холестеролу

Принцип методу. Холестерол відноситься до групи стеролів. Він являє собою високомолекулярний ненасичений вторинний спирт, який має у основі своєї молекули фенантренове кільце у поєднанні з циклопентаном.



Холестерол присутній у всіх клітинах тваринного організму, частково у вільному вигляді, частково у вигляді естерів холестеролу з вищими кислотами - холестеридів. Особливо багато його у нервовій тканині, жовчі, спермі, шкірному салі. Кращим матеріалом для одержання холестеролу є жовчні камені, які іноді складаються на 90% з холестеролу. Близькі за своєю будовою до холестеролу жовчні кислоти, статеві гормони й антирахітичний вітамін D.

Подібно до жирів, холестерол не розчинний у воді і розчиняється в діетиловому етері, хлороформі, бензені, ацетоні і гарячому спирті.

З водного спирту кристалізується з однією молекулою води у формі тонких безбарвних ромбоїдальних пластинок, що часто зростаються сходинкоподібно. Плавиться при $t = 148^{\circ}\text{C}$.

Мета роботи. Ознайомитися з якісними реакціями на холестерол.

Обладнання та реактиви. Водяна баня. Випарювальна чашка. Годинникове скло. Предметне і покривне скло. Мікроскоп. Водострумневий насос і колба для відсмоктування. Ефірно-ацетоновий фільтрат. Хлороформ. Сульфатна кислота концентрована. Льодяна оцтова кислота. Оцтовий ангідрид.

1. Осадження холестеролу

Хід роботи. Етерно-ацетоновий фільтрат, що залишився після осадження фосфатидів, випарюють досуха у чашці на водяній бані. Невелику частину осаду розчиняють на годинниковому склі у невеликій кількості ефірно-спиртового розчину або гарячого спирту.

При випаруванні розчинника холестерол випадає у вигляді характерних пластинчастих кристалів, які розглядають під мікроскопом (рис. 3).

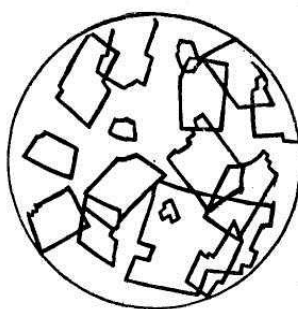


Рис. 3. Кристали холестеролу

Іншу більшу частину осаду розчиняють у 3-4см³ хлороформу і проводять ряд кольорових реакцій. Хімізм цих реакцій на холестерол обумовлений переводом його, шляхом відбирання елементів води, із вторинного спирту у ненасичений вуглеводень.

2. Реакція Сальковського на холестерол

Хід роботи. До розчину холестеролу у хлороформі додають рівний об'єм концентрованої сульфатної кислоти ($d=1,82$) і ретельно змішують. Після відстоювання верхній хлороформний шар рідини виявляється забарвленим у червоний колір; нижній шар (H_2SO_4) жовто-червоного кольору, що має зелену флуоресценцію: рідина в світлі, що проходить крізь рідину, прозора і жовто-червоного кольору, у відбитому світлі здається мутною із зеленим відтінком. Верхній хлороформний шар відсмоктують за допомогою водоструминевого насосу і до нижнього шару, що залишився, додають 1см³ льодяної оцтової кис-

лоти. З'являється рожево-червоне забарвлення. Флуоресценція зберігається.

Лабораторна робота 4
Кількісне визначення фосфатидилхолінів
у сироватці крові за фосфором

Принцип методу. Фосфатидилхоліни екстрагують із сироватки крові гарячим етиловим спиртом, потім спалюють аліквоту спиртової витяжки і визначають фосфат. За кількістю Фосфору розраховують без великої похибки вміст цих ліпідів у крові. Фосфор визначають за методом Фіске-Суббароу. При дії амоній молібдату на фосфат утворюється фосфорномолібденова кислота, яку відновлюють аскорбіною кислотою в молібденову синьку. Отриманий синій розчин спектрофотометрують і порівнюють з оптичною густиною стандартного розчину фосфату, обробленого аналогічним способом.

Мета роботи. Освоїти методику виділення фосфоліпідів з крові та їх кількісного непрямого визначення за вмістом Фосфору, визначити фізіологічні межі цих ліпідів у крові у нормі, закріпити навички аналізу органічних речовин із застосуванням методу мокрого спалювання.

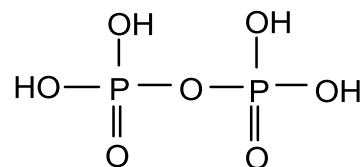
Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Пробірки. Скляні палички. Водяна баня. Мірна колба на 100см³. Фільтр. Конічна колба. Центрифужні пробірки. Колба К'ельдаля. Газовий пальник. Сироватка крові. Амоній молібдат ($\omega=2,5\%$). Спирт етиловий. Сульфатна кислота концентрована та ($\omega=10\%$). Пергідроль. Фенолфталеїн. Натрій гідроксид ($\omega=10\%$). Сульфатна кислота ($c(1/2)=2,5\text{моль/дм}^3$). Стандартний розчин KN_2PO_4 , що містить у 1см³ 0,1мг Фосфору. Аскорбінова кислота ($\omega=1\%$).

Хід роботи. У пробірку вносять 2см³ сироватки крові і 5см³ етилового спирту. Вміст пробірки перемішують скляною поличкою і

вміщують пробірку у киплячу водяну баню до закипання рідини у пробірці. Після цього ще раз добре перемішують вміст пробірки і фільтрують крізь сухий фільтр у суху мірну центрифужну пробірку. Промивають фільтр гарячим спиртом. Фільтрат доводять спиртом до об'єму 7см³.

Вносять 2см³ фільтрату у колбу К'ельдаля для спалювання, додають 10-12 крапель концентрованої сульфатної кислоти, поміщають колбу у штатив у витяжній шафі і нагрівають газовим пальником до тих пір, доки у колбі майже не залишиться рідини і вміст буде являти собою чорну масу. Після цього нагрівання припиняють, дають колбі трохи охолонути, додають 15-20 крапель пергідролю і знову сильно нагрівають доокиснюючи вміст колби до повного його знебарвлення. Якщо весь доданий пергідроль використаний, але вміст колби не знебарвився, колбу знову трохи охолоджують, додають нову порцію пергідролю (5-10 крапель) і знову сильно нагрівають. Коли вміст колби знебарвиться, але пергідроль ще залишився, то треба нагрівати колбу до повного розкладу пергідролю (до припинення виділення з рідини бульбашок газу). Якщо в колбі залишиться деяка частина пергідролю, то він буде заважати у подальшій роботі, окиснюючи аскорбінову кислоту, яку застосовують для відновлення фосфорно-молібденової кислоти у молібденову синьку.

При спалюванні спиртового розчину фосфатидилхолінів у концентрованій сульфатній кислоті фосфат ліпиду буде у формі пірофосфатної кислоти:



Для переведення пірофосфату в ортофосфат у колбу додають 5-8 см³ води і кип'ятять 5 хвилин. Відбувається гідроліз пірофосфату.

Колбу охолоджують і далі визначають вміст ортофосфату за методом Фіске-Суббароу.

До вмісту колби додають 1-2 краплин фенолфталеїну, обережно нейтралізують розчином натрій гідроксиду ($\omega=10\%$) до появи малинового забарвлення, після цього додають декілька крапель розчину сульфатної кислоти ($\omega=10\%$) до зникнення забарвлення, тобто створюють слабкокисло середовище. В колбу додають 5см^3 розчину молібдату (суміш рівних об'ємів розчину амоній молібдату ($\omega=2,5\%$) і розчину сульфатної кислоти, ($c(1/2)=2,5$ моль/дм³), 10см^3 розчину аскорбінової кислоти ($\omega=1\%$). Кількісно переносять з колби К'ельдаля у мірну колбу на 100см^3 , доводять водою до риски, перемішують. З мірної колби рідину переносять у конічну колбу і нагрівають 10 хвилин до температури $40-50^\circ\text{C}$. Розвивається синє забарвлення розчину внаслідок відновлення аскорбіновою кислотою фосформолібдату у молібденову синьку. Забарвлений розчин спектрофотометрують при довжині хвилі 590нм у кюветах, $l=10\text{мм}$ проти контролю на реактиви (у мірну колбу на 100см^3 вносять розчин молібдату і аскорбінову кислоту, доводять водою до риски).

Таблиця 10. Приготування розчинів для побудови калібрувального графіка

№ проби	1	2	3	4	5	6	7	8
Об'єм стандартного розчину, що містить в 1 см^3 $0,1$ мг Фосфору	10	20	30	40	50	60	70	80
Об'єм розчину молібдату	5	5	5	5	5	5	5	5
Об'єм розчину аскорбінової кислоти, $\omega=1\%$, см^3	10	10	10	10	10	10	10	10
Об'єм дистильованої води, см^3	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100	до 100
Вміст Фосфору, $\text{мг}/\text{см}^3$	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08
Оптична густина розчину								

Для побудови калібрувального графіка готують стандартний розчин KN_2PO_4 , що містить в 1см^3 0,1мг Фосфору. Шляхом розведення вихідного розчину отримують розчини з вмістом в 1см^3 від 0,01 до 0,08 мг Фосфору.

За калібрувальним графіком знаходять вміст Фосфору в 2см^3 спиртового екстракту фосфатидилхолінів. Далі розрахунки ведуться за формулою:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot M \cdot 100}{V_1 V_2 \cdot M_1}, \text{ де:}$$

X – вміст фосфатидилхолінів у сироватці крові, мг/100 см^3 ;

a – вміст Фосфору в пробі, мг;

V – загальний об'єм спиртового екстракту фосфоліпідів, см^3 ;

V_1 – аліквотний об'єм спиртового екстракту фосфоліпідів, взятий для мінералізації, см^3 ;

V_2 – об'єм сироватки крові, взятий для аналізу, см^3 ;

M – середня молярна маса фосфатидилхолінів, (806 г/моль);

M_1 – молярна маса фосфору, г/моль.

Лабораторна робота 5

Кількісне визначення холестеролу у сироватці крові

Принцип методу. Кольорові реакції на холестерол обумовлені переходом його, як вторинного спирту, шляхом відщеплення води в ненасичений вуглеводень.

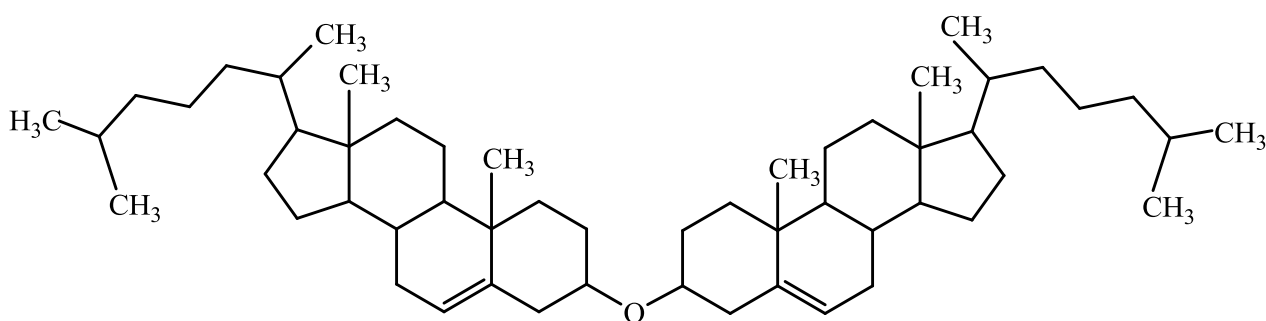
Мета роботи. Визначити вміст холестеролу у сироватці крові за реакцією Лібермана-Бурхарда, ознайомитись з фізіологічними межами ліпиду, засвоїти біологічну роль його.

Обладнання та реактиви. Спекторофотометр або фотоелектроколориметр. Пробірки. Мірна пробірка. Скляна паличка. Сухий фільтр. Сироватка крові. Льодяна оцтова кислота. Сульфосаліцилова

кислоти ($\omega=12\%$) в льодяній оцтовій кислоті. Оцтовий ангідрид. Концентрована ($\omega=98\%$) сульфатна кислота.

Хід роботи. У суху пробірку вносять $0,2\text{см}^3$ сироватки крові, додають 5 крапель льодяної оцтової кислоти і 15 крапель розчину сульфосаліцилової кислоти ($\omega=12\%$) в льодяній оцтовій кислоті. Сульфосаліцилова кислота осаджує білки сироватки крові. За допомогою мірної пробірки додають 3см^3 оцтового ангідриду і скляну лопаточку кристалічного Na_2HPO_4 (для зв'язування води сироватки крові). Вміст перемішують скляною паличкою і фільтрують через сухий фільтр у суху мірну пробірку. Промивають осад на фільтрі 1см^3 оцтового ангідриду. Об'єм фільтрату доводять оцтовим ангідридом до 5см^3 . Дуже обережно додають 2 краплі концентрованої ($\omega=98\%$) сульфатної кислоти, направляючи при цьому отвір пробірки від себе, і залишають на 20 хвилин у темному місці. Розвивається зелене забарвлення. При цьому відбувається дегідратація і дегідрування холестеролу і утворюється біхолестадієн зеленого кольору.

Стандартні розчини холестеролу обробляють аналогічним способом.



біхолестадієн

При виконанні роботи слід чітко дотримуватись правил техніки безпеки. Вся робота виконується у витяжній шафі. Оцтова кислота і оцтовий ангідрид леткі речовини і згубно діють на слизові оболонки дихальних шляхів; попадаючи на шкіру, викликають сильні опіки. При додаванні у цю суміш ще й концентрованої сульфатної кислоти маса

сильно розігрівається і може бути викид з пробірки (особливо берегти очі!)

На осі ординат відкладають значення оптичної густини, а на осі абсцис – масу холестеролу. Визначивши оптичну густину досліджуваного розчину за калібрувальним графіком знаходять вміст холестеролу в пробі сироватки крові.

Спектрофотометрують при довжиною хвилі 656 нм у кюветах, $l=10$ мм, закритих кришками, проти контролю, що містить всі компоненти, крім сироватки крові.

Таблиця 11. Приготування розчинів для побудови калібрувального графіка

№ проби	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Стандартний розчин 500мг% холестеролу в оцтовому ангідриді, см ³	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Оцтовий ангідрид, см ³	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	—
Вміст холестеролу, мг	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0

Розраховують вміст холестеролу у сироватці крові в ммоль/дм³.

$$c = \frac{a \cdot 1000}{V \cdot mM} \text{ ммоль/дм}^3, \text{ де}$$

a- вміст холестеролу в пробі, мг;

V – об'єм сироватки крові, взятий для аналізу, см³;

mM- мілімолярна маса холестеролу, мг/моль.

Лабораторна робота 6

Визначення фракцій ліпідів у м'язах

методом тонкошарової хроматографії

Принцип методу. Ліпіди екстрагують з тканин тварин сумішшю метанолу і хлороформу (1:1), яка руйнує ліпопротеїнові комплекси

біологічних мембран і тим самим дає можливість якомога повніше вилучати ліпіди. Найбільш повна екстракція ліпідів з тканин досягається тоді, коли тканину гомогенізують із сумішшю метанолу і хлороформу у співвідношенні, при якому забезпечується утворення однофазної системи з водою, що міститься в тканині. Додаючи до гомогенату надлишок хлороформу і воду, отримують двофазну систему, яку легко розділити. Хлороформний шар містить розчинені в ньому ліпіди. Втрата ліпідів з шаром метанол-вода і із залишком їх у тканині незначна.

Хлороформний екстракт ліпідів наносять на пластинку *Silufol* і проводять хроматографічне розділення ліпідів у системі розчинників *n*-гексан-діетиловий етер-оцтова кислота у співвідношенні 80:20:1.

Розташування плям речовин, що розділяються, на хроматограмі характеризується значеннями R_f , які являють собою відношення шляху, пройденого речовиною на хроматограмі, до шляху, пройденого рухомою фазою розчинника.

Мета роботи. Ознайомитися із визначенням фракцій ліпідів у м'язах методом тонкошарової хроматографії.

Обладнання та реактиви. Плоскодонна колба об'ємом 50см³. Паперовий фільтр. Лійка Бюхнера. Ділильна лійка об'ємом 50см³. Пластинка *Silufol* (15x15см). Термостат. Мікропіпетка. Ексикатор з пришліфованою кришкою. Витяжна шафа. Водяна баня. М'язова тканина. Метанол. Хлороформ. Цинк ацетат ($\omega=2\%$). Розчинник (*n*-гексан-діетиловий етер-льодяна оцтова кислота (80:20:1)). Кристали йоду.

Хід роботи. У плоскодонну колбу об'ємом 50см³ з пришліфованим корком вносять 3-4г ретельно подрібненої м'язової тканини, зваженої з точністю до 0,01г, і додають 13см³ метанолу, перемішуючи і розминаючи тканину до одержання однорідної маси. Потім додають 6,5см³ хлороформу і інтенсивно збовтують суміш протягом 10хв.

Після цього додають ще $6,5\text{см}^3$ розчину цинк ацетату ($\omega=2\%$) і струшують 30 секунд. Вміст посудини фільтрують крізь паперовий фільтр на лійці Бюхнера під вакуумом. Тканину, що залишилась на фільтрі, разом з фільтром переносять у ту ж колбу для повторної екстракції ліпідів. Вносять у колбу 10см^3 хлороформу і енергійно збовтують протягом 10хв. Повторний екстракт фільтрують у ту ж колбу. Посудину, у якій проводили екстракцію ліпідів, ополіскують 5см^3 хлороформу, ним же промивають тканину на фільтрі. Весь фільтрат збирають у ділильну лійку об'ємом 50 см^3 . Після відстоювання і розділення рідких фаз зливають хлороформний шар у суху посудину.

Пластинку *Silufol* (15x15 см) промивають розчинником (*n*-гексан-діетиловий етер-льодяна оцтова кислота (80:20:1) і висушують у термостаті протягом 30хв. при 100°C . На пластинку в 2см від нижнього краю наносять хлороформний екстракт ліпідів за допомогою мікропіпетки на $0,01\text{см}^3$. Маса нанесених ліпідів повинна бути близько 20мкг. На дно ексикатора вносять розчинник для хроматографії так, щоб висота рідини була близько 1см. Опускають пластинку нижнім кінцем у розчинник, ставлячи її похило під кутом близько 60° , закривають ексикатор пришліфованою кришкою і проводять проявлення хроматограми висхідним способом на відстань близько 10см.

Після закінчення проявлення пластинку висушують у витяжній шафі. Плями ліпідів на хроматограмі виявляють у парах йоду. Для цього в скляний стакан кладуть декілька кристалів йоду, накривають його склом і ставлять на водяну баню при 60°C . Відбувається сублімація йоду, пари йоду наповнюють стакан. У стакан з парами йоду при кімнатній температурі вносять хроматограму і витримують там близько 5хв. Розташування ліпідів виявляється у вигляді жовто-коричневих плям на білому або жовтуватому фоні пластинки.

Ліпіди розташовуються на хроматограмі в порядку збільшення величини R_f так: фосфоліпіди, холестерол, моноацилгліцероли, діацилгліцероли, вільні жирні кислоти, триацилгліцероли, стериди.

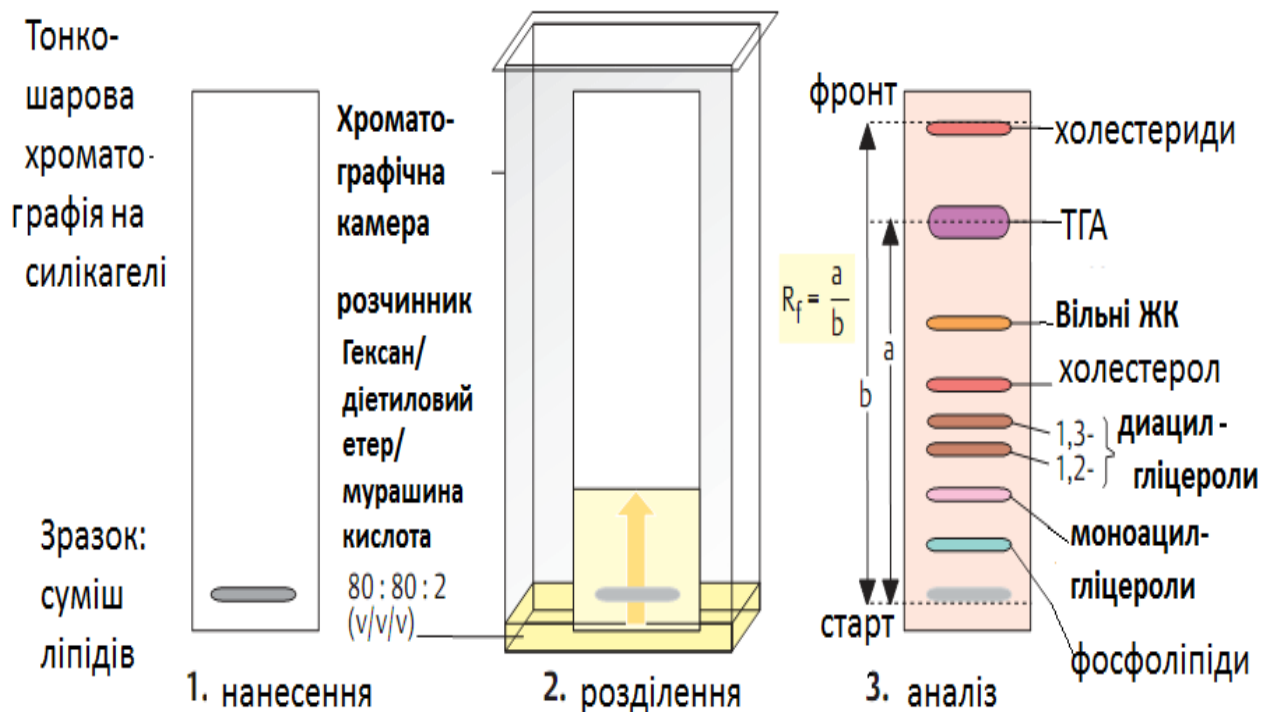


Схема тонкашарової хроматографії (цит. за Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. 3-е изд.: Пер. с нем. М.: Мир, 2009. – 469 с)

ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ЛІПІДИ”

1. Йодне число жиру визначається як маса йоду у грамах, що поглинається жиром масою 1 г при насиченні С=C-зв'язків з утворенням дійодпохідних. Число омилення – це маса калій гідроксиду у грамах, яка необхідна для повного омилення (гідролізу і наступної нейтралізації жирних кислот) 1г жиру.

Є чистий триацилгліцерол з числом омилення 198 і йодним числом 59,7. Визначити:

- а) відносну молекулярну масу цього триацилгліцеролу;
- б) скільки подвійних зв'язків є в його молекулі?

2. Складіть рівняння перших двох реакцій перетворення лінолевої кислоти перед її окисненням за механізмом β-окиснення.

3. Назвіть продукти, що утворюються:

а) при гідролізі 1-стеароїл-2-олеїлфосфатидилсерину у присутності сильної основи з наступним кислотним гідролізом;

б) при обробці 1-пальмітоїл-2-лінолеїлфосфатидилхоліну фосфоліпазою-D.

4. Якщо інкубувати піровиноградну кислоту, що має ¹⁴C-мітку в положенні 2, з тканиною печінки, то який з атомів Карбону β-окси-β-метилглутарил-КоА виявиться міченим?

5. Складіть рівняння реакції синтезу фосфатидилетаноламіну з діпальмітилгліцерину і ЦДФ-етаноламіну за участі етаноламінфосфотрансферази.

6. При рН 7,0 провели електрофорез суміші ліпідів, у якій містилися:

- а) кардіоліпін;
- б) фосфатидигліцерол;
- в) фосфатидилетаноламін;

г) фосфатидилсерин.

Вкажіть, які з цих сполук повинні рухатись до аноду, які до катоду і які залишатися на старті.

7. У якому атомі Карбону холестеролу буде виявлена мітка, якщо синтез холестеролу починався з 1-¹⁴C-ацетату?

8. Обґрунтуйте твердження:

а) ксантофіли є окисненими формами каротинів;

б) каротини забезпечують поглинання рослиною світла у тій ділянці спектра, де не поглинає хлорофіл;

в) каротиноїди є водорозчинними пігментами;

г) із збільшенням кількості подвійних зв'язків у молекулах каротиноїдів їх забарвлення переходить у більш довгохвильову частину спектра.

9. Укажіть на спільні риси у структурі холестеролу, холестанолу, холевої кислоти. Складіть схеми відповідних перетворень.

10. Обґрунтуйте твердження:

а) фосфатиди розщеплюються при гідролізі на складові структурні одиниці – вищі жирні кислоти, фосфатну кислоту, гліцерол;

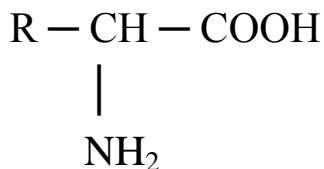
б) при дії гліцерафосфорилхоліндіестерази на α ,L-гліцерилфосфорилхолін утворюється холін і α -фосфогліцерол;

в) у нервовій тканині тварин ацетилхолін виконує роль макроергічної сполуки.

5. БІЛКИ Й АМІНОКИСЛОТИ

5.1. Будова та властивості амінокислот і білків

Амінокислоти є дифункціональними сполуками, які мають амінну і карбоксильну групи, що знаходяться у того ж самого атома Карбону. В організмі людини знайдено біля 70 амінокислот, 20 із них входять до складу білків. Ці амінокислоти називаються протеїногенними. Крім них є ще так звані „мінорні” амінокислоти, що є компонентами лише деяких білків. Амінокислоти, крім карбоксильної та амінної груп, мають бічні R-групи, причому саме ці хімічні групи визначають більшість властивостей тієї чи іншої амінокислоти. У загальному вигляді формула амінокислоти може бути представлена таким чином:



R-групою амінокислоти називають угруповання атомів у її молекулі, що зв'язані з α -атомом Карбону, яка не бере участі у формуванні поліпептидного ланцюга.

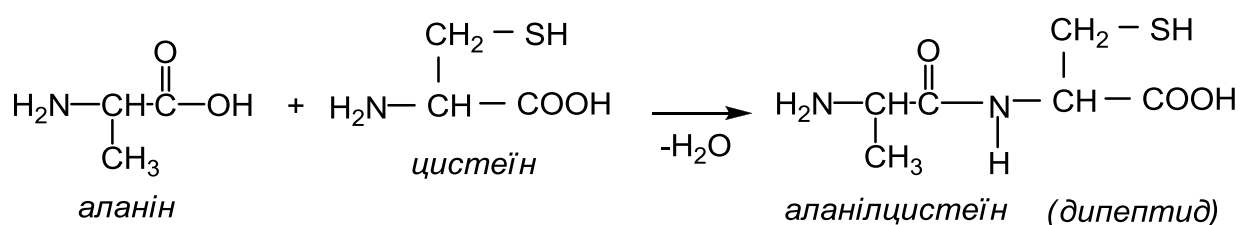
Багато дослідників займалися вивченням витрат амінокислот під час нересту з м'язів і перенесенням їх у гонади, що розвиваються. Було відмічено, що вміст проліну і гліцину, яких багато є у метаболічно інертній сполучній тканині, зменшується у гонадах по мірі їх росту, що пояснюється „розбавленням” цих амінокислот іншими амінокислотами, які накопичуються в ікрі, спермі і зменшується у м'язах, у той час як більш лабільні білки використовуються з м'язів. Вміст вільного лізину у м'язах тріски (*Gadus morhua*) досягає максимуму незадовго до нересту, у той час як вміст таурину знижується. Вміст вільної глутамінової кислоти і гліцину також збільшується у нерестовий період. Загальний вміст вільних амінокислот так само, як і їх співвідношення,

суттєво не змінюється на послідовних стадіях нерестової міграції атлантичного лосося *Salmo salar*.

Всі амінокислоти у водних розчинах існують у вигляді біполярних йонів. Біполярність амінокислот забезпечує високу розчинність у воді та високі дипольні моменти їх молекул. Відносно високі температури плавлення обумовлені тим, що кристали амінокислот мають йонну ґратку. У водних розчинах амінокислоти виявляють амфотерні властивості. Хімічна природа R-групи амінокислот дозволяє здійснювати реакції солеутворення (за NH₂- та COOH-групами); окиснення та відновлення (за SH- та SS-групами); алкілування, ацилювання та естерифікації (за NH₂-, OH-, COOH-групами); амідування (за COOH-групами); дезамінування за допомогою нітритної кислоти (за NH₂-групами), фосфорилювання та сульфатування (за OH-групами) та ін.

Здатність амінокислот вступати у хімічні реакції залежить від реакційної здатності відповідних груп. Моноаміномонокарбонові амінокислоти вступають у реакції, що характерні для їх амінних та карбоксильних груп. Інші амінокислоти, крім того, вступають у реакції, що характерні для сульфгідрильної, спиртової та фенольної груп, та ін.

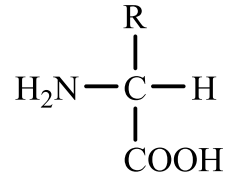
Однією із найважливіших хімічних властивостей α-амінокислот, що залежать від одночасної присутності у молекулі амінної та карбоксильної груп, є властивість у визначених умовах утворювати пептиди. Цей процес протікає за типом реакції поліконденсації.



Білки – високомолекулярні полімерні природні сполуки, мономерами яких є амінокислоти.

Для побудови білків використовуються приблизно 20 амінокислот і два аміді: амід глютамінової і амід аспарагінової кислот. Аміно-

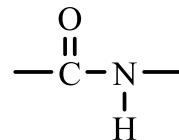
кислоти, що входять до складу білків, є виключно α ,L- амінокислотами. Як структурні ізомери вони є α -амінокислотами, тобто аміногрупа зв'язана з α -атомами Карбону; як оптичні ізомери вони є L-ізомерами:



Залежно від характеру R- групи білкові амінокислоти поділяються на амінокислоти з аліфатичними вуглеводневими R-групами (аланін, лейцин, ізолейцин, валін); амінокислоти з незарядженими полярними R-групами (оксиамінокислоти серин, треонін); дикарбонові амінокислоти (глутамінова, аспарагінова); амінокислоти з основними R-групами (лізин, аргінін, гістидин); тіоамінокислоти (цистеїн, метіонін); ароматичні амінокислоти (фенілаланін, тирозин, триптофан).

Амінокислота гліцин $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$, на відміну від інших амінокислот, не є оптично активною, не має асиметричного атома Карбону.

У білкових молекулах послідовно розташовані амінокислотні залишки ковалентно зв'язані між собою амідним зв'язком, утвореним при взаємодії карбоксильної групи одної амінокислоти і аміногрупи іншої:



Така різновидність амідного зв'язку, в утворенні якого беруть участь α -амінокислоти, називається пептидним зв'язком. У залежності від числа з'єднаних таким зв'язком амінокислот розрізняють дипептиди, трипептиди, нарешті поліпептиди.

На одному кінці поліпептидного ланцюга є вільна аміногрупа (N-кінець), а на іншому – вільна карбоксильна група (C-кінець).

Поліпептидні ланцюги білків можуть мати у своєму складі сотні амінокислотних ланок, причому білкова молекула може складатися чи з одного поліпептидного ланцюга, чи з декількох ланцюгів, що буває частіше.

Білкові молекули – це зовсім не хаотично побудовані полімери різної довжини; кожен білок має особливу амінокислотну послідовність поліпептидного ланцюга (первинну структуру) певну молекулярну масу, просторове розташування поліпептидних ланцюгів.

Поліпептидний ланцюг може закручуватися у спіраль (α -спіраль), яка стабілізується міжвитковими водневими зв'язками між CO- і NH-групами сусідніх витків спіралі поліпептидного ланцюга. Інший вид просторової конформації поліпептидних ланцюгів – β -структура. У даному випадку має місце складчаста структура; між двома поліпептидними ланцюгами виникають водневі зв'язки $-C=O \cdot NH-$.

α -Спіраль і β -структура – це вторинна структура білків.

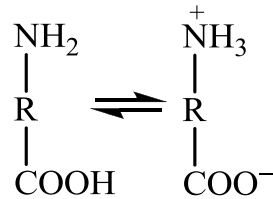
Третинна структура відноситься до способу укладки поліпептидного ланцюга з утворенням компактної, щільно упакованої структури, характерної для глобулярних білків.

Окремий поліпептидний ланцюг з певною первинною, вторинною і третинною структурами називається протомером або білковою субодиницею. Просторове розташування субодиниць являє собою четвертинну структуру білка. Молекули більшості білків, як глобулярних, так і фібрилярних, складаються з двох чи декількох субодиниць, які можуть бути не зв'язані між собою ковалентними зв'язками.

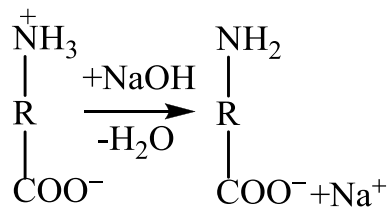
Білки, що складаються з декількох протомерів, називаються олігомерними білками. Якщо білок складається лише з одного поліпептидного ланцюга, то він не має четвертинної структури.

5.2. Фізико-хімічні властивості білків

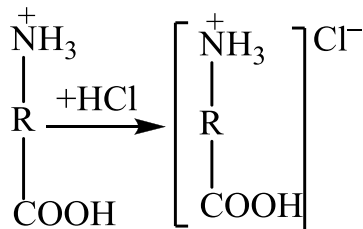
Молекули білка у водному середовищі, особливо поблизу їх ізоелектричної точки, мають вигляд біполярних йонів, що пояснюється хімічною взаємодією між карбоксильними і аміногрупами амінокислот.



У лужному середовищі білки виступають у ролі аніона.



У кислому середовищі білок відіграє роль катіона, наприклад, із хлоридною кислотою утворюється хлороводнева сіль (протеїнхлорид)



Таким чином фактором, що визначає поведінку білка у розчині, є концентрація гідроген-іонів. У кислому середовищі зменшується дисоціація карбоксильних груп білка і він переходить у катіон. У лужному середовищі пригнічується дисоціація основних груп і білок переходить у аніон.

При певному значенні рН дисоціація карбоксильних груп дорівнює протонізації аміногруп: кількість позитивних зарядів білкової молекули стає рівною кількості від'ємних й у цілому заряд білкової мо-

лекули дорівнює нулю. Білок, який не має електричного заряду, знаходиться в ізоелектричному стані і у електричному полі не буде рухатися ні до катоду, ні до аноду, а рН розчину, при якому білок знаходиться в ізоелектричному стані, називається ізоелектричною точкою білка.

У кислому середовищі зменшується дисоціація білка за карбоксильними групами, молекула білка отримує позитивний заряд, а у лужному середовищі зменшується протонізація аміногруп білка, молекули отримують від'ємний заряд і залишаються у розчині навіть при кип'ятінні. Додавання до розчину білка нейтральних солей полегшує і прискорює згортання білків при кип'ятінні внаслідок дегідратації їх молекул.

Білкові молекули мають електричні заряди, обумовлені наявністю дисоційованих карбоксильних груп і протонованих аміно- і іміногруп залишків амінокислот, що утворюють поліпептидний ланцюг, а також, у деякій мірі, за рахунок дисоціації фенольних гідроксилів тирозину і тіолових цистеїну.

За рахунок дисоціації карбоксильних груп залишків амінокислот молекула білка набуває від'ємного знаку заряду. Дуже незначний вклад у величину від'ємного заряду вносять дисоційовані ОН-групи тирозину і SH-групи цистеїну.

Протоновані аміногрупи ($R=NH_3^+$) чи іміногрупи ($R=NH_2^+$) забезпечують позитивний знак заряду в білкових молекулах. Кінцеві NH_3 -групи і $COOH$ -групи поліпептидного ланцюга суттєвого впливу на величину заряду молекули білка не мають.

Якби pK' цих груп були однакові, то суми їх зарядів дорівнювали б нулю. Оскільки pK' карбоксильної групи має нижче значення, ніж pK' аміногрупи, то за рахунок цих кінцевих груп молекула білка отримує деякий негативний заряд.

Основний вклад у величину електричного заряду білкової молекули дають дикарбонові амінокислоти глютамінова і аспарагінова, які у своїх R- групах містять дисоційовані карбоксильні групи ($-\text{COO}^-$) і обумовлюють негативний знак заряду, і амінокислоти лізин, аргінін, гістидин, що мають у R- групах протоновані аміногрупи ($-\text{NH}_3^+$), іміногрупи ($=\text{NH}_2^+$), завдяки чому білкова молекула набуває позитивного знаку заряду.

Сильні кислоти мають низькі, а сильні основи – високі значення pK' .

Так, pK' R-групи аспарагінової кислоти становить 3,86, глютамінової кислоти – 4,25, лізину – 10,53, аргініну – 12,48. Гістидин містить слабкоосновну імідазольну групу з $pK'=6,0$ при $pH\ 6,0$. Позитивно зарядженими виявляються R-групи більш, ніж у 50% залишків гістидину, а при $pH\ 7,0$ позитивний заряд має вже тільки 10% залишків гістидину. pK' фенольного гідроксилу тирозину складає 10,07, а pK' тіолової групи цистеїну – 8,33.

Заряд білкової молекули є сумарний ефект позитивних і негативних зарядів. Якщо в молекулі білка кислі амінокислоти (глютамінова, аспарагінова і в деякій мірі тирозин і цистеїн) переважають над основними (лізин, аргінін, гістидин), то загальний заряд молекули буде (-), такі білки називають кислими. Якщо ж білкова молекула містить більше основних амінокислот, то її сумарний заряд буде мати знак (+). В живих організмах переважають кислі білки. До основних належать гістони, протаміни.

Заряджені однойменно білкові молекули (позитивно чи негативно) відштовхуються, що забезпечує їх перебування у розчині у вільному стані. Але коли змінюється pH середовища, то при цьому змінюється і заряд білкових молекул. Якщо, наприклад, у розчині є кислий білок, знак заряду якого (-), то при додаванні до цього розчину кислоти (зниженні pH середовища) відбувається пригнічення ди-

соціації йоногенних груп ($R-COO^- + H^+ \rightarrow R-COOH$), від'ємний заряд зменшується і, нарешті, настає момент, коли кількість позитивних і негативних зарядів у білковій молекулі стане рівною, тобто їх сума дорівнюватиме нулю.

Кожен індивідуальний білок має своє значення ізоелектричної точки. Як вже було сказано, більшість білків кислі, їх ізоелектричні точки знаходяться при $pH < 7,0$, але, все ж таки, в слабкокислій зоні, а не в сильнокислій. Ізоелектричні точки основних білків знаходяться при $pH > 7,0$ -у слабколужній зоні. В ізоелектричному стані білкові молекули позбавлені електричного заряду і втрачають стійкість до коагуляції:

Молекули білка, хоч і мають діаметри, зіставні з розмірами низькомолекулярних сполук, мають дуже велику довжину і тому наближаються за поведінкою у розчинах до частинок дисперсної фази колоїдних систем. Діаметр білкових часточок у розчині перевищує 10 нм.

Як і колоїдні системи, білки в ізоелектричному стані термодинамічно нестійкі. Частинки дисперсної фази мають дуже розвинену поверхню розділу фаз. Згідно другого закону термодинаміки, будь-яка система прагне до зменшення вільної енергії. Величезна вільна поверхнева енергія частинок дисперсної фази обумовлена великою площею їх поверхні. Ця енергія може бути зменшена або за рахунок зменшення поверхні частинок, або за рахунок зменшення поверхневого натягу системи.

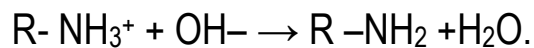
$$E_{\text{пов}} = \sigma \cdot S$$

Для зменшення поверхні білкові молекули в ізоелектричному стані злипаються (коагулюють). Під дією гравітації відбувається осідання (седиментація) утворених білкових агрегатів. Білки випадають в осад.

Якщо ж до кислого білка, що знаходиться в ізоелектричному стані, ще додати кислоту (далі знижувати рН), то відбуватиметься подаліше пригнічення дисоціації означених груп, які надавали молекулі знаку заряду (-). Тоді вже позитивних зарядів буде в білковій молекулі більше, ніж негативних, сумарний знак заряду стане (+). Відбувається перезарядка білкової молекули: (-); 0; (+).

Отримавши однойменні заряди, молекули білка відштовхуються одна від одної і переходять з осаду знову в розчин.

Основні білки, що мають знак заряду (+) за рахунок протонованих аміногруп чи іміногруп, в ізоелектричний стан переходять при збільшенні рН середовища за рахунок лугу:



Під коагуляцією розуміють зближення та склеювання білкових часточок, у результаті чого збільшується їх розмір і вони легко випадають у осад. В ізоелектричному стані у білків різко знижується ступінь дисоціації і часточки становляться електронейтральними. При цьому утворюються умови для порушення гідратаційної оболонки білків, що разом із втратою заряду сприяє їх коагуляції.

Важливою властивістю білків є їх розчинність у воді, водно-сольових розчинах і водних розчинах полярних розчинників (спирт). Процес розчинення білків тісно пов'язаний з гідратацією їх макромолекул, і будь-який фактор, що порушує цю гідратацію, буде у той же час знижувати розчинність білків у воді та сприяти випадінню їх у осад. Зменшення гідратації колоїдних часточок білків легко досягається додаванням до їх розчину речовин, що віднімають воду (спирт, ацетон, розчини нейтральних солей лужних металів та ін.). Ці речовини осаджують білки без явища денатурації, а солі важких металів – із денатурацією, сутністю якої є втрата білками гідрофільних та набуття гідрофобних властивостей.

При нагріванні розчину білка вище 60°C більшість білків коагулює, особливо легко цей процес протікає в ізоелектричній точці. При цьому порушується гідратаційна оболонка білкової молекули і третинна структура молекули білка втрачає гідрофільність, стає гідрофобною і легко осаджується.

Таким чином, основними факторами стабілізації білкових колоїдів є гідратація частинок і виникнення однойменного електричного заряду у результаті дисоціації основних і кислотних груп.

Для розчинів білкових речовин є характерним явище опалесценції, яке виникає у прохідному світлі внаслідок дифракції. При втраті факторів агрегативної стійкості (заряд, гідратаційна оболонка) розчини білка зі стану золю переходять у гель, при якому відбувається відділення дисперсної фази від дисперсійного середовища.

Усі реакції на білки засновані на наявності у них означених хімічних груп, зв'язків та на їх фізико-хімічних властивостях.

5.3. Заряд білкових молекул та суть електрофоретичного розділення їх суміші

Заряд білкових молекул у розчині визначається головним чином відносно великою кількістю йонізованих R-груп різних амінокислотних залишків. Амінокислотні залишки кислих амінокислот (глутамінової і аспарагінової) в R-групах мають дисоційовані карбоксильні групи і надають білковій молекулі від'ємного знаку заряду. Амінокислотні залишки основних амінокислот (лізину, аргініну, гістидину) в R-групах мають протоновані аміногрупи і надають білковій молекулі позитивного знаку заряду. Єдина α -аміногрупа і єдина карбоксильна група, розташовані на кінцях пептидних ланцюгів, в дуже незначній мірі впливають на визначення заряду білкової молекули. Для білків характерні певні ізоелектричні значення рН, при яких вони проявляють себе як біполярні йони і в цілому не несуть електричного заряду.

При значеннях рН розчину, більших від рІ, білок буде мати сумарний від'ємний заряд і буде рухатися в електричному полі у напрямку до аноду; його від'ємний заряд буде збільшуватись в міру підвищення рН середовища. При значеннях рН розчину, менших від рІ, білок буде мати сумарний позитивний заряд і буде рухатися в електричному полі у напрямку до катоду. На сумарний заряд білка сильно впливають солі, що є в середовищі, які по-різному впливають на ступінь йонізації різних типів R-груп. Білки можуть також зв'язувати деякі катіони і аніони. Внаслідок цього значення рН, що відповідає ізоелектричній точці білків, на практиці змінюється в залежності від природи середовища, в якому розчинений даний білок.

Для розділення суміші глобулярних білків можна скористуватися відмінностями в швидкостях руху різних білків в електричному полі при певних значеннях рН. Розділення білків, засноване на цьому, було вперше здійснено в 1937р. Арне Тизеліусом. Рух заряджених високомолекулярних частинок в електричному полі називається електрофорезом. Рухливість зарядженої частинки в електричному полі визначається відношенням швидкості його руху v до напруженості поля E і виражається в $\text{см}^2 \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$:

$$\mu = \frac{v}{E}.$$

Для білків ця величина при 25°C лежить в межах $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ см}^2 \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Для розділення білкових сумішей найбільш ефективним є метод зонального електрофорезу. Зональний електрофорез водного білкового розчину здебільшого проводиться на носії (фільтрувальний папір, поліакриламідний гель, крохмальний гель і ін.), тобто на матеріалах, які, будучи гідратованими і пористими, виявляють в той же час і механічну жорсткість. Тверде середовище робить неможливим змішування білків після припинення дії електричного поля. Положення білка в блоці гелю можна легко визначити за допомогою барвника

на білок. Найбільш суттєвою перевагою цього методу є те, що змінюючи довжину блоку чи інші умови, можна продовжувати електрофорез доти, поки індивідуальні білки не будуть повністю розділені на окремі дискретні зони. За проведення диск-електрофорезу білки одночасно зазнають впливу електричного поля і градієнта рН в поліакриламідному гелі. Білки розділяються на дуже тонкі смуги або, як їх називають, диски. Застосування диск-електрофорезу забезпечує чітке розділення надзвичайно малих кількостей складних білкових сумішей. Цей метод широко застосовується для виявлення мутантних форм білків. Для розділення мутантного і нормального білків достатньо, щоб їх молекули відрізнялися між собою на одну заряджену групу.

За допомогою диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі можна розділити білки сироватки крові на 20 фракцій, які характеризують стан організму. Зменшення вмісту альбумінів у сироватці крові вказує на захворювання печінки, де вони синтезуються, або втрату їх з сечею при патології нирок. Збільшення вмісту γ -глобулінів спостерігається при інфекційних процесах, а зменшення цієї фракції може свідчити про СНІД. Значне зниження альбумінів і підвищення всіх глобулінових фракцій відбувається при злоякісних пухлинах.

5.4. Реакції осадження білків

Висолювання білків це є оборотний процес коагуляції й осадження білків йонами солей лужних металів. У водному розчині білкові молекули заряджені й гідратовані, що забезпечує стійкість білкових розчинів. При високій концентрації солей, йони яких теж гідратовані, відбувається руйнування водних оболонок білкових молекул у результаті конкуренції за воду йонів солей. Крім того, йони солей з протилежним, ніж у білка зарядом, адсорбуються на поверхні білкової молекули, внаслідок чого частинки білка стають електронейтральними,

що знижує їх стійкість у розчині. При розбавленні водою білкових розчинів, які коагулювали під впливом солей лужних металів, білок знову переходить у розчинений стан (золь). Осади білків (гель), які отримані за допомогою висолювання, можуть бути знову розчинені після зменшення концентрації солей. Таким чином, процес висолювання білків є оборотним процесом.

Солі важких металів необоротно осаджують білки внаслідок зшивання поліпептидних ланцюгів багатовалентними атомами металів. Тому білки застосовують при отруєнні солями важких металів. Деякі з таких осадів (наприклад, з солями Купруму, Плюмбуму, Цинку) розчиняються у надлишку солі внаслідок адсорбції йонів цих металів на поверхні білкових частинок. У результаті цього білкові частинки набувають заряд і переходять у розчин. Розчинення осадів денатурованих білків у надлишку солей важких металів називається адсорбційною пептизацією. Під впливом солей важких металів (Плюмбуму, Купруму, Аргентуму, Меркурію) білки зі стану золя необоротно коагулюють у гель. Йони солей важких металів із білками утворюють стійкі комплексні сполуки. Крім того, важкі метали знімають електричний заряд і глибоко змінюють вторинну й третинну структури макромолекули білка. При надлишку плюмбум ацетату та купрум сульфату утворений ними осад розчиняється. Це явище пояснюється адсорбцією надлишку йонів метала й перезарядженням білкового комплексу, у результаті чого у розчин переходить комплекс зміненого білка з металом.

Концентровані мінеральні кислоти (крім фосфатної) викликають необоротне осадження білків із розчину. Це пояснюється дегідратацією колоїдних часточок білка, зняттям заряду, частковим гідролізом білкової молекули, утворенням солей із білка та кислот та ін. Надлишком мінеральних кислот (крім нітратної) розчиняють осад білків (гідроліз білка з утворенням водорозчинних продуктів гідролізу).

Органічні кислоти (трихлороцтова та сульфосаліцилова) необоротно осаджують тільки білки, а продукти їх розпаду (сечовина, амінокислоти, амідни та ін.) залишається у розчині.

Органічні розчинники (спирт, ацетон, хлороформ) витісняють білки з водних розчинів. Це пояснюється дегідратацією міцели білка, що призводить до зниження їх стійкості у розчині. Якщо у розчині білка присутня сіль NaCl, осад утворюється швидше внаслідок зняття заряду з колоїдної частинки. Це явище ще більш знижує стійкість розчину білка. Якщо осадження проводити на холоді й отриманий осад швидко відділити від розчинника, то білок знову може розчинитися у воді, тому що властивості його не змінюються, денатурація не встигає відбутися й осадження є оборотним. Якщо час впливу розчинника збільшити, білок денатурує.

При нагріванні білки згортаються, перетворюючись необоротно у гель. Механізм температурної коагуляції і денатурації білків пов'язаний із перебудовою структури макромолекул білків. Колоїдні частинки білка під впливом високої температури з гідрофільних стають гідрофобними. Відбуваються глибокі й необоротні зміни вторинної і третинної структури молекул білка – вони вивертаються немов би навиворіт. Швидкість температурної коагуляції залежить від присутності у розчині йонів солей і гідроген-іонів. У сильно кислих розчинах білкові частинки перезаряджаються внаслідок їх амфотерних властивостей і несуть позитивний заряд, що підвищує їх стійкість. У лужних розчинах стабільність білкового колоїду пояснюється від'ємним зарядом білкової частинки.

Наявність білка у досліджуваному об'єкті можна виявити за допомогою кольорових реакцій. Ці реакції можна розділити на дві групи: 1 – загальні, що обумовлені наявністю пептидного зв'язку і вільних амінних груп та 2 – специфічні, що обумовлені наявністю у білка окремих амінокислот, які здатні давати кольорові реакції. У лужному

розчині при додаванні купрум сульфату такі речовини, як біурет, поліпептиди й білки утворюють комплексні солі, які забарвлені у фіолетовий колір. Ця реакція обумовлена наявністю у молекулі білка пептидних зв'язків.

5.5. Класифікація білків. Характеристика окремих класів

За своїм складом білки поділяються на прості і складні. Прості білки дають при гідролізі лише амінокислоти і до складу них не входять ніякі інші органічні чи неорганічні компоненти. Складні білки при гідролізі дають не тільки амінокислоти, але також і інші складові.

За характером небілкової частини, яка називається простетичною групою, складні білки поділяються на нуклеопротейіни, ліпопротейіни, глікопротейіни, фосфопротейіни, гемопротейіни, металопротейіни і ін.

Нуклеопротейіни – складні білки, простетичною групою яких є нуклеїнові кислоти. Білковою частиною їх є переважно протаміни і гістони – основні білки, до складу яких входить значна кількість основних амінокислот (аргініну, лізину, гістидину).

Залежно від характеру простетичної групи нуклеопротейіни поділяються на дезоксирибонуклеопротейіни, що містять у своєму складі ДНК, і рибонуклеопротейіни, до складу яких входить РНК.

Зв'язок між білком і нуклеїновою кислотою переважно йонний. При дії концентрованих розчинів солей легко відбувається дисоціація нуклеопротейінів на білок і нуклеїнову кислоту.

Нуклеїнові кислоти являють собою полінуклеотиди, у яких нуклеотиди зв'язані в полімерний ланцюг 3'–5'–фосфодіестерними зв'язками між залишками рибози чи дезоксирибози.

Нуклеотиди є фосфатними естерами нуклеозидів – N-глікозидів рибози чи дезоксирибози і азотистих основ – аденіну, гуаніну, цитозину, урацилу, тиміну.

Мононуклеотидами ДНК є: дАМФ; дГМФ; дЦМФ; дТМФ.

ДНК входить до складу хромосом ядра клітин, вона є носієм спадкової інформації у вищих організмах.

Різновидностей РНК є декілька, які виконують різні функції в організмі: інформаційні або матричні РНК (іРНК або мРНК); рибосомальні РНК (рРНК); транспортні РНК (тРНК), ядерні РНК, вірусні РНК. РНК несе геномну інформацію у вірусів, в яких відсутня ДНК.

До складу нуклеотидів ДНК входить вуглевод дезоксирибоза, яку можна виявити (а отже і ДНК) за реакцією з дифеніламіном.

Нуклеопротейни розчинні в лужному середовищі і добре осаджуються кислотами. Дезоксирибонуклеопротейни осаджуються з розчинів солей низької концентрації, але розчинні в концентрованих сольових розчинах.

При кип'ятінні нуклеопротейнів з розведеними кислотами відбувається їх розщеплення на білок і нуклеїнову кислоту. Далі білок при нетривалому кип'ятінні частково гідролізується з утворенням незначної кількості амінокислот. Нуклеїнові кислоти деполімерізуються шляхом гідролізу фосфодіестерних зв'язків між нуклеотидами. Потім гідролізуються пуринові нуклеотиди з утворенням аденіну, гуаніну, дезоксирибози і фосфатної кислоти. Піримідинові нуклеотиди розщеплюються лише при тривалому гідролізі.

Дезоксирибонуклеопротейни входять, в основному, до складу клітинних ядер. Багаті клітинними ядрами клітини селезінки, щитоподібної залози, панкреатичної залози, печінки, нирок, лейкоцити, сперматозоїди. Рибонуклеопротейнів багато в дріжджах.

Глікопротейни – складні білки, простетичними групами яких є вуглеводи. При гідролізі простетичних груп глікопротейнів виявляють гексози (маннозу, галактозу, глюкозу), гексозаміни (глюкозамін, галактозамін), кислоти (глюкуронову, оцтову, сульфатну). Молярна маса глікопротейнів становить від декількох десятків тисяч до мільйонів дальтон.

Глікопротеїни зустрічаються у всіх тваринних, рослинних клітинах і мікроорганізмах. Більшість із них входять до складу оболонок клітини. Глікопротеїни клітинних оболонок знаходяться, мабуть, у зовнішньому білковому шарі плазматичної мембрани. У одного з класів глікопротеїнів залишки серину, що входять до складу поліпептидного ланцюга, зв'язані О-глікозидними зв'язками з олігосахаридами, що містять залишки N-ацетилнейтрамінової (сіалової) кислоти.

Як простетичні групи до складу глікопротеїнів входять гетерополісахариди хондроїтинсульфат, гіалуронова кислота, гепарин і ін. В цих глікопротеїнах кінцева ланка полісахариду ковалентно зв'язана через О-глікозидний зв'язок із залишком серину в білку.

Невеликі олігосахаридні групи часто приєднані до білків, що знаходяться на поверхні клітин, а також до тих білків, які входять до складу секретів різних залоз. Вуглеводні ланцюги прикріплені через О-глікозидний зв'язок до ОН-груп залишків серину, тиміну, а в колагені – до залишку оксилізіну. Крім того вуглеводний компонент глікопротеїнів може приєднуватись через N-глікозидний зв'язок до амідного Нітрогену аспарагіну.

Глікопротеїнами є деякі ферменти (наприклад, рибонуклеаза, α -амілаза), гормони (наприклад, тиреотропін, фолікулостимулюючий гормон, гормони гіпоталамуса), групові речовини крові, імуноглобуліни, деякі білки крові і тканин. Особливо важливе значення має глікопротеїн колаген сполучної тканини.

У більшості випадків функція вуглеводної частини глікопротеїнів залишається невідомою. Але в муцинах – слизових виділеннях епітеліальних покривів слизових оболонок, які виконують захисну функцію, є мастильним матеріалом, присутність великої кількості від'ємно заряджених груп сіалової кислоти, очевидно, обумовлює утворення жорсткої структури, що підвищує в'язкість білка. В деяких муцинах вміст вуглеводного компоненту перевищує 50%.

Глікопротеїнами є мукоїди хрящової (хондромукоїди), кісткової (остеомукоїди) тканин, а також білки скловидного тіла ока, зв'язок, сухожиль та ін. Глікопротеїни, що входять до складу сироватки крові антарктичних риб, є ефективними антифризами – понижують температуру замерзання рідин цих риб. Глікопротеїн колаген вважається метаболічно інертним та лише накопичується і не витрачається протягом всього життя індивідуума. Так, було встановлено, що колаген активно відкладається в тілі оселедця *Clupea pallasii* під час дозрівання. У рідині, яка виділяється з тканини при тепловій обробці, кількість гідролізованого колагену більше в тих випадках, коли риби спіймані під час нересту. Вимірювання вмісту колагену в шкірі і лусці показали його збільшення з 1,76% у червні до 4,06% у лютому, в м'язах його вміст збільшився в нерестовий період з 0,22 до 0,31%. У оселедця *Clupea hareugus* також спостерігається зміна вмісту колагену в нерестовий період, але це збільшення було більш виражене в кінці року, коли риба припинила харчуватися. У найбільшій мірі вміст колагену зростає у шкірі риби.

Є цікава гіпотеза, що синтез колагену відбувається з метою утилізації непотрібних амінокислот, коли під час голодування риби відбуваються розпад білків тіла.

Також було встановлено, що амінокислотний склад колагену двоякодишаючих риб близький до складу колагену ссавців, тоді як у *Gadus morhua* – представника іншої крайньої гілки еволюції риб – склад колагену зовсім інший.

При зміні температури води спостерігається раптове скорочення шкіри риби при нагріванні в результаті скорочення колагенових волокон. У тепловодних видів риб температура скорочення колагену вища, ніж у холодноводних. Характерні опорні властивості колагену створюються завдяки наявності у колагені гідроксипроліну, який у звичайних м'язах майже не зустрічається.

Найбільш низька температура скорочення колагену – у льодяної риби *Chionograso Kathleenaе*, яка живе в Арктиці при температурі не вище +3°C.

Альбуміни – група простих білків. Входять до складу цитоплазми клітин та різних рідин і тканин організму (сироватки крові, лімфи, плазми, ліквору). У вищих тварин альбуміни становлять основну частину білків плазми (>5%). Альбуміни належать до гідрофільних білків, вони добре розчинні у воді, слабких сольових розчинах, розбавлених кислотах і лугах. Для їх осадження необхідне 100% насичення розчинів нейтральними солями, наприклад амоній сульфатом. За хімічним складом альбуміни характеризуються високим вмістом амінокислоти лейцину (15%), значним вмістом сульфурвмісних амінокислот, лізину, аспарагінової і глутамінової кислот і незначним вмістом гліцину. Однією з важливих функцій альбуміну є забезпечення осмотичних характеристик, підтримання осмотичного тиску крові, створеного високомолекулярними сполуками. Завдяки здатності їх до комплексоутворення, альбуміни виконують також важливу транспортну функцію. За участю альбумінів здійснюється перенесення жирних кислот, ліпідів, білірубіну, амінокислот, йонів металів. За участю альбумінів регулюється вміст у плазмі крові йонів Ca^{2+} , стероїдних гормонів та інших речовин. Синтезуються в гепатоцитах печінки з попередника преальбуміну внаслідок відщеплення N-кінцевого пептиду.

Глобуліни – за формою молекул належать до глобулярних білків. Висолюються 30-50% розчином амоній сульфату. Молекулярна маса – від кількох тисяч до кількох мільйонів. Розрізняють α -, β - і γ -глобуліни. γ -Глобуліни – носії імунітету. Кількісне співвідношення між альбумінами та глобулінами виражають альбуміново–глобуліновим коефіцієнтом. До складу глобулінів входять амінокис-

лоти гліцин (3-4%), лейцин, валін, лізин, серин, глютамінова кислота, а також деяка частина вуглеводів.

Під час голодування у *Cyprinus carpio* зменшення білків у плазмі крові відбувається у першу чергу за рахунок альбумінів, а потім – за рахунок α - і β -глобулінів. Вміст γ - глобулінів не тільки не зменшився, але навіть збільшився, що можна пояснити або відносним зменшенням об'єму крові, або додатковим надходженням до кров'яного русла γ -глобулінів у результаті розщеплення білків інших тканин. У *Lota lota* спочатку було відмічено збільшення вмісту альбумінів, а потім зменшення. Вміст глобулінів при цьому рівномірно збільшувався. Таким чином очевидно, що основною білковою фракцією, що використовується при голодуванні, є альбуміни.

Хромопротеїни – складні білки, молекули яких складаються з простого білка і забарвленої простетичної групи. Простий білок частіше представлений гістонами, простетичні групи – похідними алоксазину (флавінові ферменти), каротину (родопсин) і порфірину (гемоглобін, міоглобін, гемінові ферменти).

Гемоглобін – червоний залізовмісний білок крові. Його молекула складається з білка глобіну і забарвлюючої речовини – гему. Специфічність гемоглобіну для кожного виду тварин визначається хімічною будовою глобіну, оскільки гем для всіх хребетних однаковий. Молекулярна маса білка досягає 68 кДа. Молекула гемоглобіну складається з чотирьох субодиниць, кожна субодиниця – з гему і молекули глобіну.

Молекула міоглобіну утворена одним гемом і однією молекулою глобіну. Міститься у м'язовій тканині, де депонує кисень і передає його відповідним ферментним системам. У морських тварин (дельфіна, тюленя, кита) міоглобін зв'язує близько 40% кисню тканин, становить до 20% сухої маси м'язів. При голодуванні риб м'язові білки

розщеплюються і використовуються швидше, ніж білки сполучної тканини.

5.6. Функції білків в організмі

У живих організмах білки виконують різноманітні функції.

Ферментативна функція. Багато білків є каталізаторами хімічних реакцій, що відбуваються в живих організмах. Всі ферменти – білки.

Запасні білки (овальбумін, казеїн, ферменти і ін.)

Транспортні білки (гемоглобін, міоглобін, сироваточний альбумін і ін.).

Скорочувальні білки (міозин, актин).

Захисні білки крові (антитіла, фібриноген, тромбін).

Білки – гормони (інсулін, гормон росту).

Структурні білки (глікопротеїни, склератин, фіброїн, колаген, мукопротеїни).

Деякі токсини є білкової природи (токсин ботулізму, зміїні отрути та ін.).

Крім двадцяти звичайних і декількох рідкісних амінокислот (оксипролін, оксилізін, десмозин), що входять до складу білків, відомо ще близько 150 інших амінокислот, які зустрічаються в різних клітинах і тканинах у вільному, або у зв'язаному стані, але ніколи не зустрічаються у складі білків. Більша частина цих амінокислот є похідними α -амінокислот, які містяться в білках, але є також β -, γ - і δ -амінокислотами. Деякі з них мають D-конфігурацію. Ці амінокислоти відіграють важливу роль як попередники чи проміжні продукти метаболізму. Наприклад, β -аланін входить до складу вітаміну B₃, γ -аміномасляна кислота є нейтромедіатором.

У водних організмів вільні амінокислоти виступають також як регулятори осмотичного тиску. Встановлено, що амінокислоти відіграють важливу роль у забезпеченні ізотонічності рідин водних

організмів і навколишнього середовища. При підвищенні чи пониженні солоності води вміст амінокислот у клітинах організму збільшується чи зменшується, і клітини, таким чином, залишаються ізотонічними з навколишнім середовищем. Так, м'язи і кров омарів і інших прибережних безхребетних збагачуються вільними амінокислотами, коли цих тварин переносять із розбавленої у звичайну морську воду або з прісної води в солонувату. Вільні амінокислоти беруть участь також у регуляції осмотичного тиску риб.

5.7. Біоресурси нітрогеновмісних речовин у природі

Біоресурси білків, амінокислот і, загалом, усіх нітрогеновмісних речовин значно примножуються за рахунок розмаїття джерел рослинного й тваринного походження, що знаходиться у водних просторах. Серед водоростей тільки синьо-зелені водорості є прокаріотами. Інші – еукаріоти. Синьо-зелені водорості мають найбільший філогенетичний вік – близько 3 мільярдів років. Вони є вершиною біохімічної еволюції автотрофних прокаріотів. Синьо-зелені водорості являють собою глухий кут гілки рослинної еволюції, про що свідчить примітивна будова їх клітини, відсутність статевого розмноження і джгутикових стадій. На відміну від більшості водоростей, вони можуть засвоювати вільний азот. Синьо-зелені водорості викликають „цвітіння” води, що знижує її якість. Ці водорості є фотоавтотрофами, тобто можуть використовувати CO_2 як єдине джерело Карбону. Разом з тим, вони можуть засвоювати Карбон, що входить до інших органічних сполук. До числа нітрогеновмісних речовин, що засвоюються синьо-зеленими водоростями, відносяться нітрати, амонійний Нітроген, гідроксиламін. Для всіх водоростей найкращим джерелом Нітрогену є нітрати. Утилізація NO_3^- у зелених, синьо-зелених водоростей, що ростуть у фотоавтотрофних умовах при нормальному вмісті CO_2 у повітрі і достатній освітленості, супроводжується виділенням у культуральне середовище

NO_2^- і NH_4^+ . Цей процес помітно стимулюється синім світлом, залежить від рівня фотосинтетичної радіації і корелює з фотоактивацією нітратредуктази. Утворення амонію, як правило, у всіх рослин йде шляхом відновлення нітратів: $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NH}_4^+$.

Поглинання клітинами NO_3^- прискорюється в присутності CO_2 . Відновлення нітрату тісно пов'язане з нециклічним транспортом електронів у ланцюгу фотосинтезу. Джерелом енергії для транспортування NO_3^- із середовища в цитоплазму служать тріозофосфати, що утворюються в циклі Кальвіна. Синьо-зелені водорості широко розповсюджені, особливо в гарячих джерелах, прісних і солоних водоймищах, рідше в морях. Вони часто перебувають у симбіозі з грибами, утворюючи лишайники. Синьо-зелені водорості можуть зв'язати в океані 10–40 кг азоту на 1 га. Первинними продуктами фіксації Нітрогену є глютамінова кислота і глютамін. Глутаматсинтетаза в *Anabaena cylindrica* локалізована в основному у вегетативних клітинах, а глютамінсинтетаза – в клітинах і гетероцистах. Саме глютамін, а можливо і амоній, є переносниками фіксованого Нітрогену з гетероцист у вегетативні клітини. Глутамінова кислота переноситься з вегетативних клітин у гетероцисти і перетворюється в аланін, аспарагінову кислоту, серин. Іншим шляхом поглинання амонію, наприклад у *Nostoc sp.*, є орнітиновий цикл, де CO_2 включається в цитрулін, а потім перетворюється в аспарагін.

Накопичення білка і незамінних амінокислот у певній мірі залежить від джерела освітлення. При опроміненні *Chlorella vulgaris* синім світлом 2400 лк вміст білка підвищується на 21–30%. Вищі водорості при червоному світлі містять білка на 15% менше, ніж при флуоресцентному. Якісний склад амінокислот також залежить від спектрального складу світла. При вирощуванні цієї водорості при флуоресцентному світлі в білках виявляється більше лізину і аргініну. Цю властивість білків використовують для одержання біомаси водоростей.

Так, культивують синьо-зелену водорість *Spirulina maxima*, яка містить у білках метіоніну, триптофану і інших амінокислот в таких кількостях, як і в казеїні молока. Ця водорість утворює 50 т сухої маси в рік на 1 га, яка містить 35% сирого протеїну, тобто в 10 разів більше, ніж утворює його соя. Водорості легко перетравлюється, так як у їх клітинних стінках відсутня целюлоза.

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Білки й амінокислоти

Лабораторна робота 1

Фізико-хімічні властивості білків

Дослід 1. Визначення ізоелектричної точки білка

Принцип методу. Оскільки конкретні білки мають певні значення pI , то цим користуються для фракціонування білків із суміші, створюючи відповідні значення pH середовища. Переводять білки в осад послідовно і відділяють кожного разу осад білків. Такий спосіб розділення суміші білків називається методом ізоелектричного осадження.

Ізоелектричні точки білків крові тварин мають значення здебільшого 5,5...5,8. Для того, щоб запобігти переходу цих білків у результаті ацидозу в ізоелектричний стан і коагулювати, що дуже небезпечно для організму, існують буферні системи крові, які утримують pH крові близько 7,4. При такому значенні pH кислі білки крові мають від'ємні заряди і знаходяться далеко від значень pI , що гарантує їх нормальне функціонування.

Мета роботи. Ознайомитися з методом визначення ізоелектричної точки білка. Вияснити роль pH для фракціонування білків із суміші.

Обладнання та реактиви. Водяна баня. Колба на 200см³. Пробірки. Білок. Натрій ацетат ($c=0,1$ моль/дм³). Оцтова кислота ($c=0,1$ моль/дм³). Дистильована вода. Кристалічний казеїн.

Хід роботи. Для дослідження можна взяти будь-який білок. Наводимо приклад визначення ізоелектричної точки білка казеїну.

Готують розчин казеїну ($\omega=0,1\%$) в розчині натрій ацетату ($c=0,1$ моль/дм³). Для цього до кристалічного казеїну масою 0,2г до-

дають 5см^3 розчину натрій ацетату ($c=0,1\text{моль/дм}^3$), розчиняють казеїн при слабкому нагріванні колби на водяній бані.

Після розчинення казеїну доводять об'єм до 200см^3 розчином натрій ацетату цієї ж концентрації, перемішують.

Далі беруть 5 пробірок і вносять у кожну відповідно компоненти згідно таблиці 12.

Після змішування компонентів через 30 хвилин спостерігають за інтенсивністю помутніння розчину у кожній пробірці. Слабке помутніння позначають (+), помірне $-(++)$, сильне $-(+++)$. рН у пробірці, де найбільша інтенсивність коагуляції, відповідає ізоелектричній точці цього білка.

Таблиця 12. Результати досліду

Компоненти	Пробірки				
	1	2	3	4	5
Розчин оцтової кислоти ($c=0,1\text{моль/дм}^3$), см^3	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
Дистильована вода, см^3	8,75	8,5	8,0	7,0	5,0
Розчин казеїну ($\omega=0,1\%$) в розчині натрій ацетату ($c=0,1\text{моль/дм}^3$), см^3	1	1	1	1	1
рН суміші	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
Спостережувана інтенсивність коагуляції					

Дослід 2. Реакції висолювання білків

Принцип методу. У водному розчині білкові молекули зарядженні і гідратовані, що забезпечує стійкість білкових розчинів. При високій концентрації солей, йони яких теж гідратовані, відбувається руйнування водних оболонки білкових молекул в результаті конкуренції за воду йонів солей. Крім того, йони солей адсорбуються на поверхні білкової молекули внаслідок чого зменшується заряд молекули білка, частинки білка менше відштовхуються, злипаються, випадають в осад.

Амоній сульфат має різко виражену висолоюючу здатність і осаджує білки в нейтральному середовищі, а ще краще в слабкокислому. Інші солі, наприклад натрій хлорид, осаджують білки лише при підкисненні розчину.

Для висолоювання різних білків потрібна різна концентрація одних і тих же солей. Отже білки можна висоловувати фракційно. Так, глобуліни випадають у осад при напівнасиченні розчину амоній сульфатом, а альбуміни осаджуються при повному насиченні.

Мета роботи. Провести реакції осадження білків методом висолоювання. Вияснити механізми зворотного і незворотного осадження білків.

Обладнання та реактиви Пробірки. Розчин білка. Розчин амоній сульфату. Складчастий фільтр. Нагрівальні прилади. Амоній сульфат кристалічний.

Хід роботи. Наливають у пробірку 1,5-2,0см³ розчину білка, додають рівний об'єм насиченого розчину амоній сульфату і струшують суміш. З'являється помутніння від утвореного осаду глобулінів. Звернути увагу на те, щоб розчин амоній сульфату був дійсно насичений, тобто на дні посудини з розчином був осад.

Мутну рідину фільтрують крізь складчастий фільтр. Частину прозорого фільтрату нагрівають до кипіння і спостерігають згортання альбумінів, що знаходились в розчині.

До іншої частини фільтрату додають при перемішуванні надлишок амоній сульфату у вигляді порошку до припинення його розчинення. З'являється помутніння, альбуміни випадають у осад.

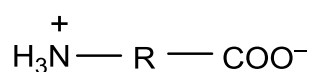
Осадження білків солями легких металів і амонію є оборотним процесом. При додаванні води білки знову розчиняються.

Дослід 3. Згортання білків при нагріванні

Принцип методу. Якщо білок кислий, молекули його мають знак заряду (-), а $pI < 7,0$. Якщо pH середовища більше значення ізоелек-

тричної точки білка, то білкові молекули будуть мати знак заряду (–). Отже лужне середовище буде запобігати досягненню кислим білком ізоелектричного стану ($pH < 7,0$) і білок випадати в осад не буде. Сильнокисле середовище теж буде стримувати досягнення білком ізоелектричного стану, особливо для основних білків, у яких $pI > 7,0$.

Білки, як амфотерні електроліти, дисоціюють як кислоти і як основи. У водному середовищі, особливо поблизу ізоелектричної точки, молекули білка являють собою біполярні йони:



У кислому середовищі зменшується дисоціація білка за карбоксильними групами, молекула білка отримує позитивний заряд. У лужному середовищі зменшується протонізація аміногруп білка, молекули отримують від'ємний заряд. Додавання до розчину білка нейтральних солей полегшує і прискорює згортання білків при кип'ятінні внаслідок дегідратації молекули білка.

Згортання білків при нагріванні відбувається внаслідок їх денатурації – порушенні четвертинної, третинної, вторинної структури молекули і є процесом практично незворотним.

Мета роботи. Провести реакції осадження білків при нагріванні. Вияснити механізми зворотного і незворотного осадження білків.

Обладнання та реактиви Нагрівальні прилади. Пробірки. Насичений розчин натрій хлориду. Оцтова кислота, ($\omega=1\%$, $\omega=10\%$). Натрій гідроксид ($\omega=10\%$).

Хід роботи. У п'ять пробірок наливають по 2см^3 розчину білка. Нагрівають вміст першої пробірки. Осад білка з'являється ще до того, як рідина закипить. Додають до другої пробірки одну краплину розчину оцтової кислоти, ($\omega=1\%$,) і нагрівають. Осад випадає швидше внаслідок того, що при підкисненні рН розчину наближається до ізоелектричної точки білка.

У третю пробірку додають біля $0,5\text{см}^3$ розчину оцтової кислоти, ($\omega=10\%$), і нагрівають. Осад білка не утворюється навіть при кип'ятінні. У даному випадку надлишок оцтової кислоти призводить до перезарядки молекул білка, молекули отримують позитивний заряд, взаємно відштовхуються і осад не утворюється. У четверту пробірку додають $0,5\text{см}^3$ розчину оцтової кислоти, ($\omega=10\%$), декілька крапель насиченого розчину натрій хлориду і нагрівають. Утворюється осад білка. У п'яту пробірку вносять біля $0,5\text{см}^3$ розчину натрій гідроксиду і нагрівають. Осад білка не утворюється навіть при кипінні.

Дослід 4. Осадження білків концентрованими мінеральними кислотами

Принцип методу. Розчинення осаду білка у надлишку хлоридної кислоти пояснюється тим, що відбувається перезарядка білкової молекули і перехід з ізоелектричного стану при $\text{pH} < \text{pI}$ у стан з позитивним зарядом білкової молекули.

Збільшення осаду білка у надлишку нітратної кислоти відбувається внаслідок процесів нітрування ароматичних амінокислот білка і зшивання поліпептидних ланцюгів білка за рахунок продуктів реакції. У надлишку концентрованої сульфатної кислоти відбувається руйнування молекул білка до найпростіших низькомолекулярних сполук, які не дають осаду.

Мета роботи. Провести реакції осадження білків концентрованими мінеральними кислотами. Вияснити механізми зворотного і незворотного осадження білків.

Обладнання та реактиви Пробірки. Концентровані нітратна, сульфатна і хлоридна кислоти. Білок.

Хід роботи. У три пробірки наливають по $1-2\text{см}^3$ концентрованих розчинів нітратної, сульфатної і хлоридної кислот. Потім, нахиливши кожну пробірку, по стінці доливають до неї з піпетки по $0,5\text{см}^3$ досліджуваного розчину білка так, щоб він не змішувався з кислотою. На

межі двох рідин з'являється білий аморфний осад білка. При струшуванні осад, що утворився при дії хлоридної і сульфатної кислот, розчиняються у їх надлишку.

Дослід 5. Осадження білків органічними кислотами

Принцип методу. Сульфосаліцилова і трихлороцтова кислоти є чутливими і специфічними реактивами на білок. Трихлороцтова кислота осаджує тільки білки і не осаджує продукти розпаду білка і амінокислоти і нею користуються для повного видалення білків з біологічних рідин.

Мета роботи. Провести реакції осадження білків органічними кислотами. Вияснити механізми зворотного і незворотного осадження білків.

Обладнання та реактиви Пробірки. Трихлороцтова ($\omega=5\%$), сульфосаліцилова ($\omega=20\%$) кислоти. Білок.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 2-3см³ розчину білка і додають в одну з них декілька крапель розчину трихлороцтової кислоти ($\omega=5\%$), в другу – декілька крапель розчину сульфосаліцилової кислоти ($\omega=20\%$). В обох випадках випадають осади білка.

Дослід 6. Осадження білків солями важких металів

Принцип методу. Солі важких металів необоротно осаджують білки внаслідок зшивання поліпептидних ланцюгів багатовалентними атомами металів. Тому білки застосовують при отруєнні солями важких металів. Деякі з таких осадів (наприклад, з солями Купруму, Плюмбуму, Цинку) розчиняються в надлишку солі внаслідок адсорбції йонів цих металів на поверхні білкових частинок: в результаті цього білкові частинки набувають заряд і переходять у розчин.

Розчинення осадів денатурованих білків у надлишку солей важких металів називається адсорбційною пептизацією.

Мета роботи. Провести реакції осадження білків солями важких металів. Вияснити механізми зворотного і незворотного осадження білків.

Обладнання та реактиви. Пробірки. Купрум сульфат. Плюмбум ацетат. Білок.

Хід роботи. У дві пробірки наливають по 1-2см³ досліджуваного розчину білка і повільно, краплинами при струшуванні додають у одну з них розчин купрум сульфату, а в іншу – розчин плюмбум ацетату. Випадають пластівчасті осади з сіллю Купруму голубуватого кольору, з сіллю Плюмбуму білого кольору.

Дослід 7. Осадження білків фенолом і формальдегідом

Принцип методу. Утворення осаду при дії на білок формальдегіду пояснюється взаємодією його з ароматичними амінокислотами білка з утворенням нерозчинних сполук типу феноло-формаль-дегідних смол.

Мета роботи. Провести реакції осадження білків фенолом і формальдегідом. Вияснити механізми зворотного і незворотного осадження білків.

Обладнання та реактиви Пробірки. Насичений водний розчин фенолу. Розчин формальдегіду ($\omega=40\%$). Білок.

Хід роботи. У дві пробірки вносять по 1-2см³ розчину білка, додають: у першу – рівний об'єм насиченого водного розчину фенолу, а у другу – рівний об'єм розчину формальдегіду ($\omega=40\%$). В обох пробірках випадає осад білка.

Дослід 8. Осадження білків спиртом

Принцип методу. При додаванні спирту відбувається дегідратація молекул білка.

Мета роботи. Провести реакції осадження білків спиртом. Вияснити механізми зворотного і незворотного осадження білків.

Обладнання та реактиви Пробірки. Етиловий спирт. Білок. Натрій хлорид кристалічний.

Хід роботи. У пробірку наливають 1-1,5см³ розчину білка і додають трохи кристалічного натрій хлориду. Приливають поступово туди ж 5-6см³ етилового спирту. Випадає пластівчастий осад білка.

Дослід 9. Осадження білків натрій вольфраматом

Принцип методу. Натрій вольфрамат дуже добре осаджує білки і часто застосовується для видалення їх з біологічних рідин і екстрактів.

Мета роботи. Провести реакції осадження білків натрій вольфраматом. Пояснити принцип видалення білків із біологічних рідин і екстрактів за допомогою натрій вольфрамату.

Обладнання та реактиви Пробірки. Білок. Натрій вольфрамат ($\omega=10\%$). Сульфатна кислота ($c(1/2)=0,66$ моль/дм³).

Хід роботи. До 3см³ розчину білка додають 0,5см³ розчину сульфатної кислоти ($c(1/2)=0,66$ моль/дм³) і після перемішування – 0,5см³ розчину натрій вольфрамату ($\omega=10\%$). Випадає осад.

Лабораторна робота 2

Якісні реакції на амінокислоти

Дослід 1. Ксантопротеїнова реакція

Принцип методу. Ця реакція дає можливість виявити у молекулі білка циклічні амінокислоти (фенілаланін, тирозин, триптофан). Реакцію обумовлюють ароматичні кільця амінокислот, що піддаються нітруванню. Це реакція нітрування ароматичних амінокислот, які входять до складу пептидів і білків, у результаті якої утворюються нітропохідні жовтого кольору. Реакція не специфічна, бо нітропохідні вільних ароматичних вуглеводнів теж мають таке забарвлення. Ксантопротеїнову реакцію дають прості ароматичні сполуки – бензен та його гомологи, фенол. Тирозин при нітруванні переходить у ніротирозин, із якого під впливом лугу утворюється амонійна сіль, що має хіноїдне

угруповання. Вміст забарвлюється в яскраво-оранжевий колір, що обумовлено виникненням у лужному середовищі хромофорної групи.

Мета роботи. Ознайомитися з однією з кольорових якісних реакцій на амінокислоти – ксантопротеїною.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Фенол, ($\omega=0,1\%$). Нітратна кислота концентрована. Розчин білка, розчин натрій гідроксиду ($\omega=20\%$) або амоніаку.

Хід роботи. Спочатку проводять реакцію з фенолом. У пробірку наливають 2 см^3 розчину фенолу й додають $1-2\text{ см}^3$ концентрованої нітратної кислоти. При обережному нагріванні з'являється жовте забарвлення.

У другу пробірку наливають 2 см^3 розчину білка й додають 6–10 крапель концентрованої нітратної кислоти. Під впливом кислоти з'являється осад білка, який при нагріванні забарвлюється у жовтий колір. Потім пробірці дають охолонути й обережно додають надлишок розчину натрій гідроксиду або амоніаку. При цьому жовте забарвлення переходить в оранжеве.

Дослід 2. Реакція Шульце-Распайля (на триптофан)

Принцип методу. Реакція заснована на здатності триптофану у кислому середовищі взаємодіяти з альдегідами, утворюючи при цьому забарвлені продукти конденсації. Під впливом сульфатної кислоти відбувається гідроліз сахарози до моносахаридів, які зневоднюються й перетворюються в оксиметилфурфурол. Триптофан, реагуючи з оксиметилфурфуролом, утворює комплекс, забарвлений у вишнево – червоний колір.

Мета роботи. Ознайомитися з методом якісного визначення триптофану.

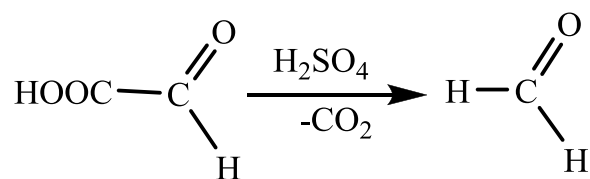
Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки на 1 см^3 . Розчин білка. Сахароза ($\omega=10\%$). Сульфатна кислота концентрована.

Хід роботи: У пробірку наливають 1 см³ розчину білка, додають 2 краплі розчину сахарози. Потім піпеткою нашаровують 1 см³ концентрованої сульфатної кислоти. На межі двох рідин з'являється вишнево-червоне забарвлення у вигляді кільця.

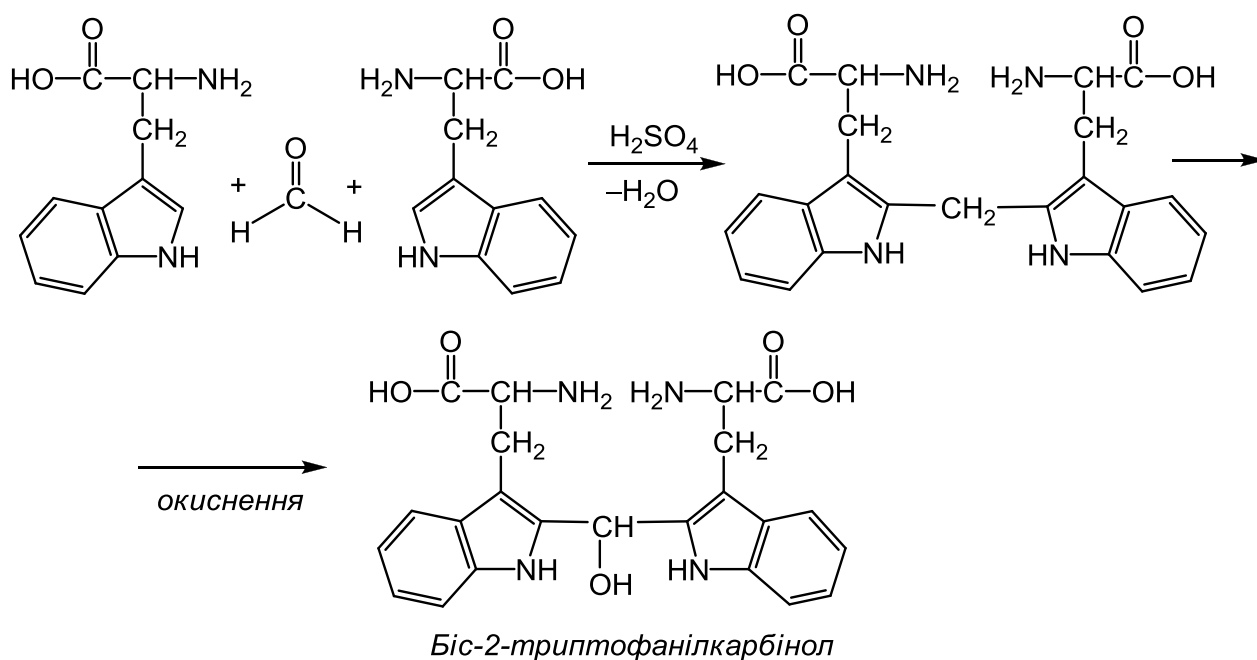
Дослід 3. Реакція Адамкевича (на триптофан)

Принцип методу. Це реакція на амінокислоту триптофан з гліоксалевою кислотою, в результаті якої відбувається конденсація двох залишків триптофану з утворенням сполуки, яка має довгий ланцюг спряжених подвійних зв'язків, що зумовлює виникнення червоно-фіолетового забарвлення.

Гліоксалева кислота за участі концентрованої сульфатної кислоти декарбоксилюється:



Утворений формальдегід вступає в реакцію конденсації з двома залишками триптофану у складі білка:



Мета роботи. Ознайомитися з методом якісного визначення триптофану за допомогою гліоксалевої кислоти.

Обладнання та реактиви. Нагрівальні прилади. Пробірки. Нерозведений білок. Льодяна оцтова кислота. Гліоксалева кислота. Концентрована сульфатна кислота.

Хід роботи. У пробірку вносять близько $0,5\text{см}^3$ нерозведеного білка, додають 2см^3 льодяної оцтової кислоти, до якої внесено трохи гліоксалевої кислоти. Суміш трохи нагрівають до розчинення осаду, який утворився. Охолоджують пробірку із сумішшю, а потім, нахиливши її, обережно, по стінці приливають близько 1см^3 концентрованої сульфатної кислоти так, щоб рідини не змішалися, а утворили два шари. При стоянні на межі двох рідин з'являється червоно-фіолетове кільце.

Дослід 4. Реакція Фоля (на сульфурвмісні амінокислоти)

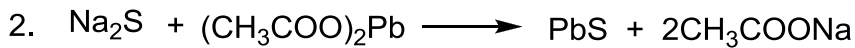
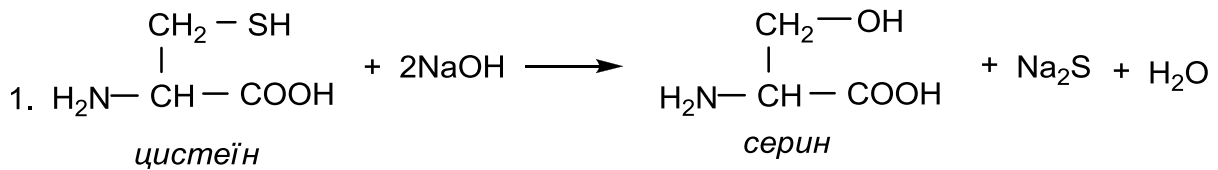
Принцип методу. До складу молекул більшості білків входять сульфурвмісні амінокислоти – цистеїн, цистин і метіонін. При нагріванні з лугом від цих амінокислот відщеплюється Сульфур у вигляді гідроген сульфід, що виявляється у реакції з плюмбум ацетатом.

Мета роботи. Ознайомитися з методом якісного визначення сульфурвмісних амінокислот.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Білок яйця, нерозбавлений. Розчин натрій гідроксиду, ($\omega=30\%$). Розчин плюмбум ацетату, ($\omega=0,5\%$).

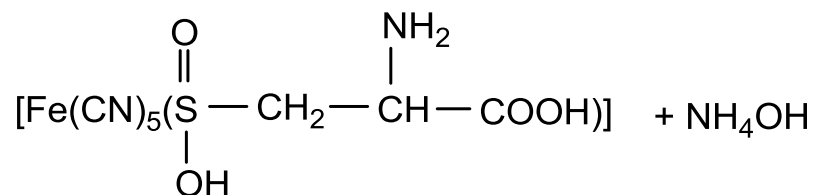
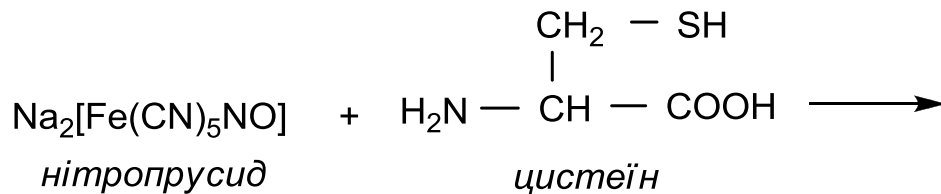
Хід роботи: У пробірку наливають $2\text{--}3\text{см}^3$ розчину білка, додають подвійний об'єм розчину натрій гідроксиду, 3-5 крапель розчину плюмбум ацетату і кип'ятять протягом 5 хвилин.

Спостерігають поступове потемніння розчину внаслідок утворення PbS .



Дослід 5. Нітропрусидна реакція

Принцип методу. Це реакція на амінокислоту цистеїн, що містить сульфгідрильну групу -SH. При взаємодії натрій нітропрусиду зі сполуками, що містять SH-групу, або S₂- розвивається пурпурове забарвлення. Ця реакція на білки теж не специфічна.



Мета роботи. Ознайомитися з методом якісного визначення сульфурвмісних амінокислот (цистеїну).

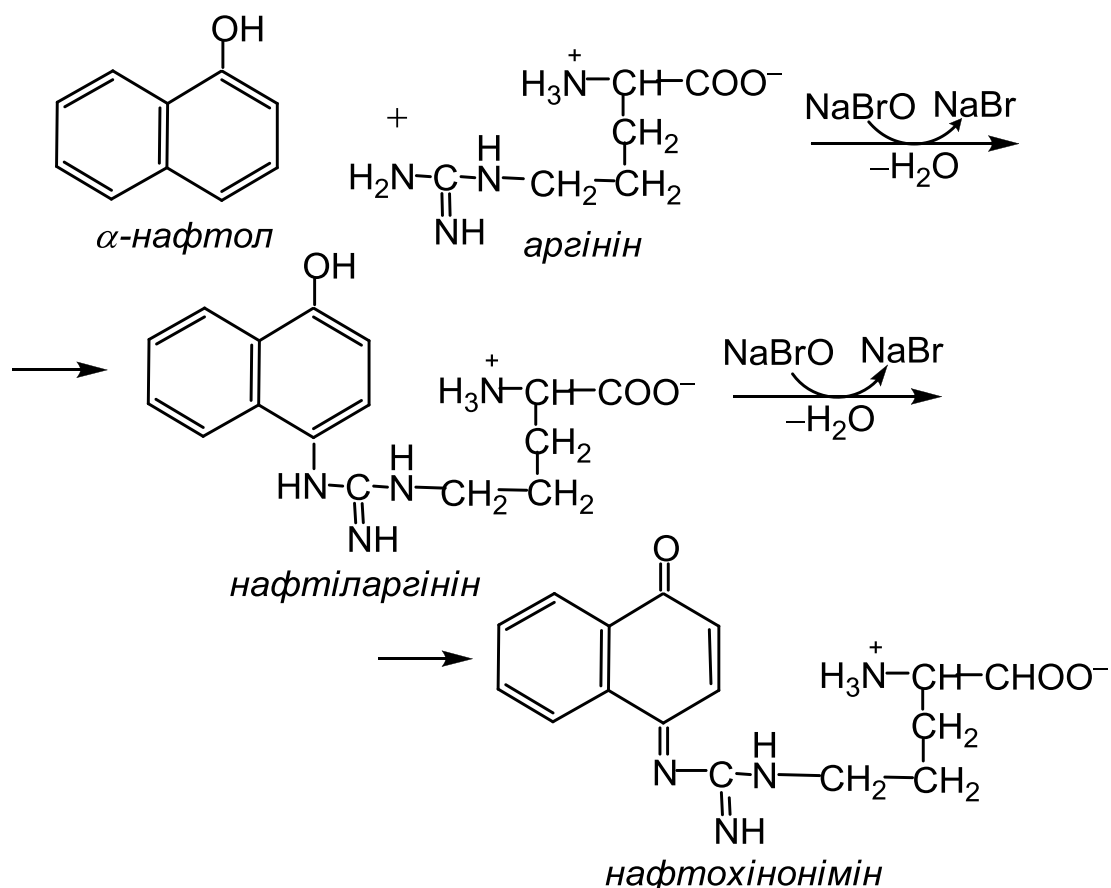
Обладнання та реактиви. Пробірки. Розведений білок. Насичений розчин амоній сульфату. Розчин натрій нітропрусиду (ω=5%). Концентрований розчин амоніаку.

Хід роботи. У пробірку вносять 1-2 см³ розведеного білка, додають рівний об'єм насиченого розчину амоній сульфату і 2-3 краплини розчину натрій нітропрусиду (ω=5%). Потім вносять декілька крапель концентрованого розчину амоніаку.

Якщо в білку присутній цистеїн, то відбувається реакція, у результаті якої розвивається пурпурове забарвлення.

Дослід 6. Реакція Сакагучі (на аргінін)

Принцип методу. Це реакція як на вільний аргінін, так і на аргінін у складі білків. За наявності окисника NaBrO аргінін взаємодіє з α -нафтолом з утворенням похідного нафтохіноніміну. Гіпотетично цю реакцію можна представити наступною схемою :



Мета роботи. Ознайомитися з методом якісного визначення аргініну.

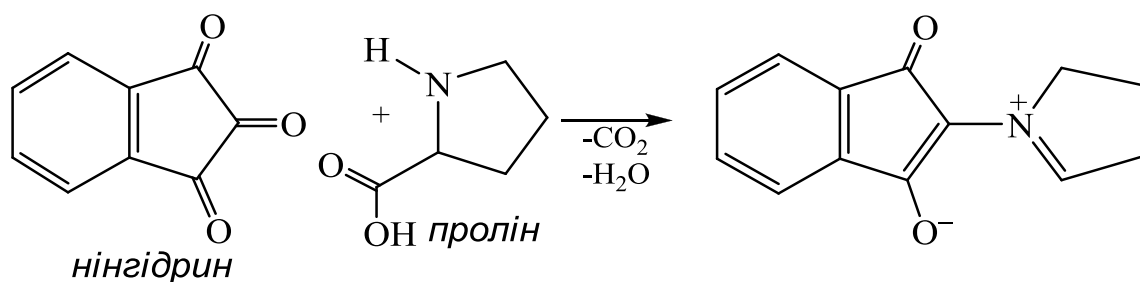
Обладнання та реактиви. Пробірки. Розведений розчин білка. Натрій гідроксид ($\omega=10\%$). Спиртовий розчин α -нафтолу ($\omega=0,2\%$). Натрій гіпоброміт ($\omega=5\%$). Розчин сечовини ($\omega=40\%$).

Хід роботи. У пробірку вносять $2-3\text{см}^3$ розведеного розчину білка, додають 1см^3 розчину натрій гідроксиду ($\omega=10\%$), зразу ж вносять декілька крапель спиртового розчину α -нафтолу ($\omega=0,2\%$). Перемішують, приливають $0,5\text{см}^3$ розчину натрій гіпоброміту. Розви-

вається червоне забарвлення вмісту пробірки. Для стабілізації забарвлення вносять у пробірку 1см³ розчину сечовини ($\omega=40\%$).

Дослід 7. Реакція проліну з нінгідрином

Принцип методу. При взаємодії амінокислоти проліну з нінгідрином утворюється сполука, яка має жовте забарвлення на відміну від інших білкових амінокислот, які з нінгідрином дають продукти, що мають червоно-фіолетове забарвлення.



Мета роботи. Ознайомитися з методом якісного визначення проліну.

Обладнання та реактиви. Пробірки. Водяна баня. Розчин проліну ($\omega=0,001\%$). розчин нінгідрину ($\omega=1\%$) в ацетоні ($\omega=95\%$).

Хід роботи. У пробірку вносять 2-3см³ розчину проліну ($\omega=0,001\%$), додають декілька крапель розчину нінгідрину в ацетоні. Вміст пробірки перемішують і нагрівають на водяній бані при 70°C протягом 5хв. Розвивається жовте забарвлення розчину.

Дослід 8. Реакція проліну з ізатином

Принцип методу При взаємодії проліну з ізатином утворюється сполука, що має синє забарвлення. Вважається, що реакція відбувається за такою схемою, що вказана нижче.

Мета роботи. Ознайомитися з реакцією взаємодії проліну з ізатином.

Обладнання та реактиви. Пробірки. Розчин проліну у льодяній оцтовій кислоті ($\omega=0,01\%$). Розчин ізатину ($\omega=0,03\%$) у льодяній оцтовій кислоті.

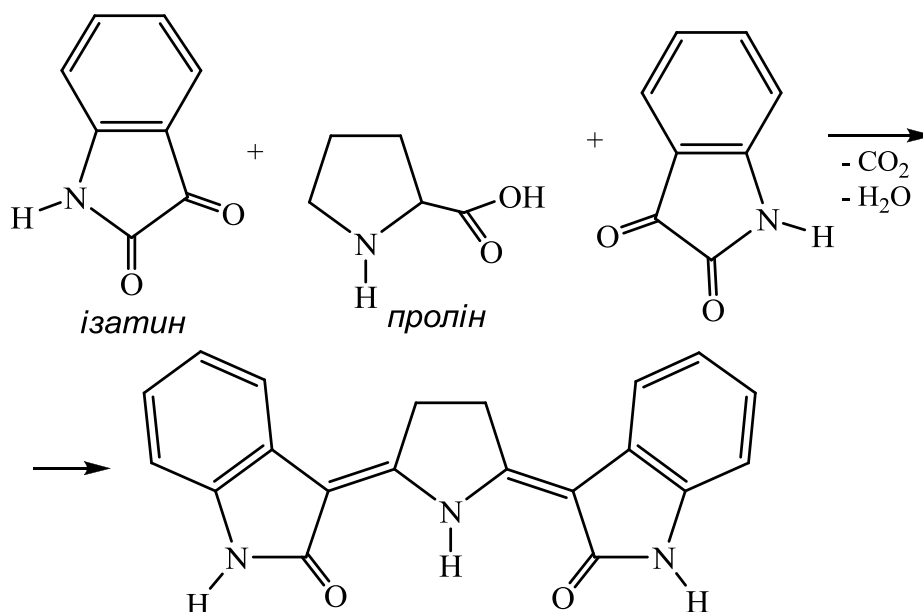


Схема взаємодії проліну з ізатином.

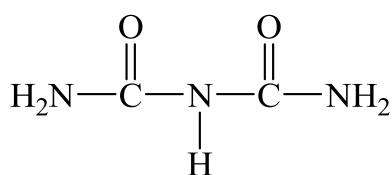
Хід роботи. У пробірку вносять 1-2см³ розчину проліну у льодяній оцтовій кислоті ($\omega=0,01\%$) і декілька крапель розчину ізатину ($\omega=0,03\%$) у льодяній оцтовій кислоті. Зразу ж з'являється сине забарвлення розчину.

Лабораторна робота 3

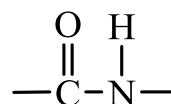
Якісні реакції на білки

Дослід 1. Біуретова реакція

Принцип методу. Біуретова реакція полягає у виникненні мідного комплексу, забарвленого у рожево-фіолетовий колір при нагріванні сильно лужного розчину сечовини – біурета ($\text{H}_2\text{NCONHCONH}_2$), або білка з солями Купруму. Забарвлення розчинів при проведенні біуретової реакції можуть бути від синього до червоного з переважанням фіолетового. Ця реакція не специфічна, бо подібний комплекс утворюють не тільки пептиди і білки, але навіть біурет

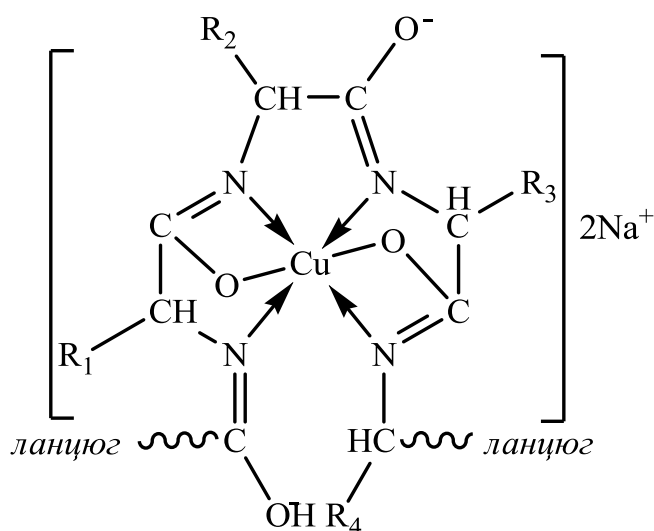


, який також має зв'язок



У зв'язку з цим реакція і отримала назву біуретова. Правильно було б сказати, що це реакція утворення пептидами і білками мідного комплексу такого ж самого, як і з біуретом.

Мета роботи. Ознайомитися з кольоровою якісною реакцією на білок – біуретовою. Пояснити принцип утворення мідного комплексу.



мідний комплекс білка

Обладнання та реактиви. Штативи з пробірками. Сечовина кристалічна. Натрій гідроксид ($\omega=30\%$). Купрум сульфат, ($\omega=1\%$). Розчин білка (білок двох яєць змішують із літром дистильованої води).

Хід роботи. Спочатку проводять реакцію з біуретом, який отримують із сечовини, а потім із білком. У суху пробірку беруть трохи (0,5г) сечовини й обережно нагрівають на полум'ї. Сечовина спочатку плавиться, а при подальшому нагріванні виділяється амоніак. У результаті нагрівання з сечовини утворюється біурет, а амоніак виділяється у вигляді газу (це визначають за запахом і зміною кольору універсального індикатонного паперу, змоченого у воді й піднесеного до пари, що виділяється з пробірки, на синій). До охолодженого біурету додають 1-2см³ розчину NaOH ($\omega=30\%$), струшують і додають декілька крапель розчину купрум сульфату ($\omega=1\%$). Після струшування розвивається рожеве забарвлення розчину.

Реакція з білком. У пробірку наливають 2см^3 розчину білка, додають 4см^3 розчину NaOH ($\omega=30\%$), добре перемішують і вносять за допомогою скляної палички декілька крапель розчину CuSO_4 . Якщо було внесено велику кількість розчину купрум сульфату, то надлишок купрум гідроксиду, що при цьому утворюється, буде маскувати рожево-фіолетове забарвлення мідного комплексу білка, весь розчин буде синім.

Дослід 2. Реакція з пікриною кислотою

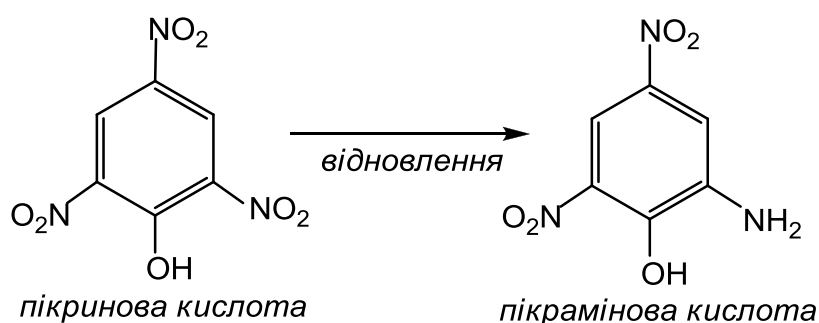
Принцип методу. Пікринова кислота при нагріванні з білком у лужному середовищі відновлюється до пікramінової кислоти (червоного кольору). Цю реакцію можна провести й із іншими відновниками, наприклад, із глюкозою.

Мета роботи. Ознайомитися з якісною реакцією на білок – із пікриною кислотою.

Обладнання та реактиви. Штативи з пробірками. Шпатель. Нагрівальні прилади. Пікринова кислота, насичений розчин. Розчин білка. Глюкоза, ($\omega=0,1\%$). Натрій гідрокарбонат кристалічний.

Хід роботи. У першу пробірку наливають 2см^3 розчину білка й додають 0,3-0,5г порошку натрій гідрокарбонату. Додають 1 – 2 краплі насиченого розчину пікринової кислоти й кип'ятять впродовж 5-10 хвилин. Поступово жовте забарвлення розчину переходить у червоне внаслідок відновлення пікринової кислоти у пікramінову.

У другу пробірку наливають 2см^3 розчину глюкози й додають 0,3-0,5г порошку натрій гідрокарбонату. Додають 1–2 краплі насиченого розчину пікринової кислоти й кип'ятять впродовж 5-10 хвилин. Спостерігається відновлення пікринової кислоти у пікramінову за рахунок глюкози.



Дослід 3. Ксантопротеїнова реакція

Принцип методу. Ксантопротеїнову реакцію дають прості ароматичні сполуки – бензен і його гомологи, фенол та ін.

Мета роботи: Ознайомитися з кольоровою якісною реакцією на білок – ксантопротеїновою реакцією.

Обладнання та реактиви. Штативи з пробірками. Фенол ($\omega=0,1\%$). Нітратна кислота концентрована. Розчин білка. Розчин амоніаку, або натрій гідроксиду, ($\omega=20\%$).

Хід роботи. Спершу проводять реакцію з фенолом. У пробірку наливають 2см^3 розчину фенолу й додають $1\text{--}2\text{ см}^3$ концентрованої нітратної кислоти. При обережному нагріванні з'являється жовте забарвлення.

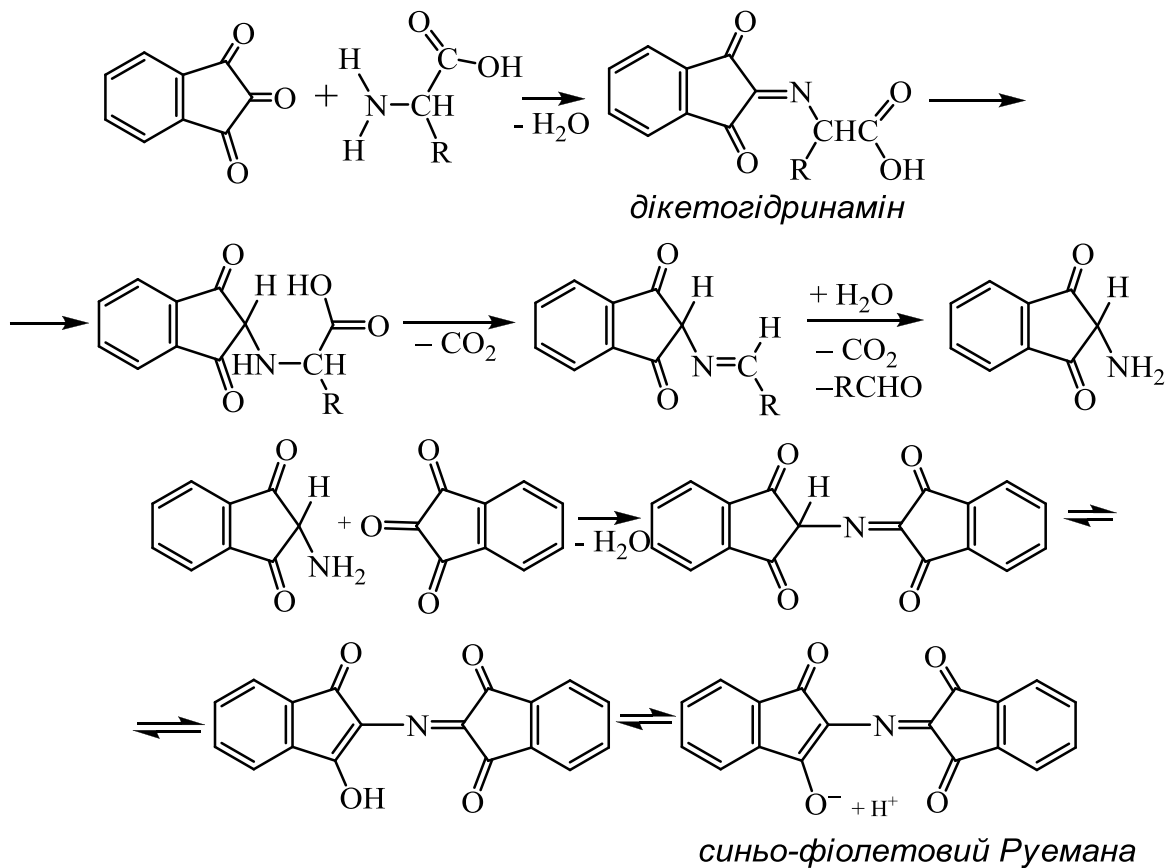
У другу пробірку наливають близько 2 см^3 розчину білка й додають 6-10 крапель концентрованої нітратної кислоти. Під впливом кислоти з'являється осад білка, що при нагріванні забарвлюється у жовтий колір. Потім пробірку охолоджують і обережно додають надлишок розчину амоніаку, або натрій гідроксиду. При цьому жовте забарвлення переходить у помаранчеве.

Дослід 4. Нінгідрінова реакція

Принцип методу. Нінгідрінова реакція – це реакція ароматичного трикетону нінгідрину з речовинами, що мають вільні аміногрупи. Амінокислоти, пептиди і білки мають такі вільні аміногрупи і при взаємодії з нінгідрином утворюють барвник Румана синьо-фіолетового кольору. Так, як і біуретова, нінгідрінова реакція не є

специфічною на амінокислоти, пептиди і білки. Будь-які речовини, що містять вільну аміногрупу, і навіть амоніак, дають позитивну реакцію. Нуклеїнові кислоти теж дають цю реакцію. Тому говорять про нінгідринпозитивні речовини.

Взаємодія нінгідрину з амінокислотою:



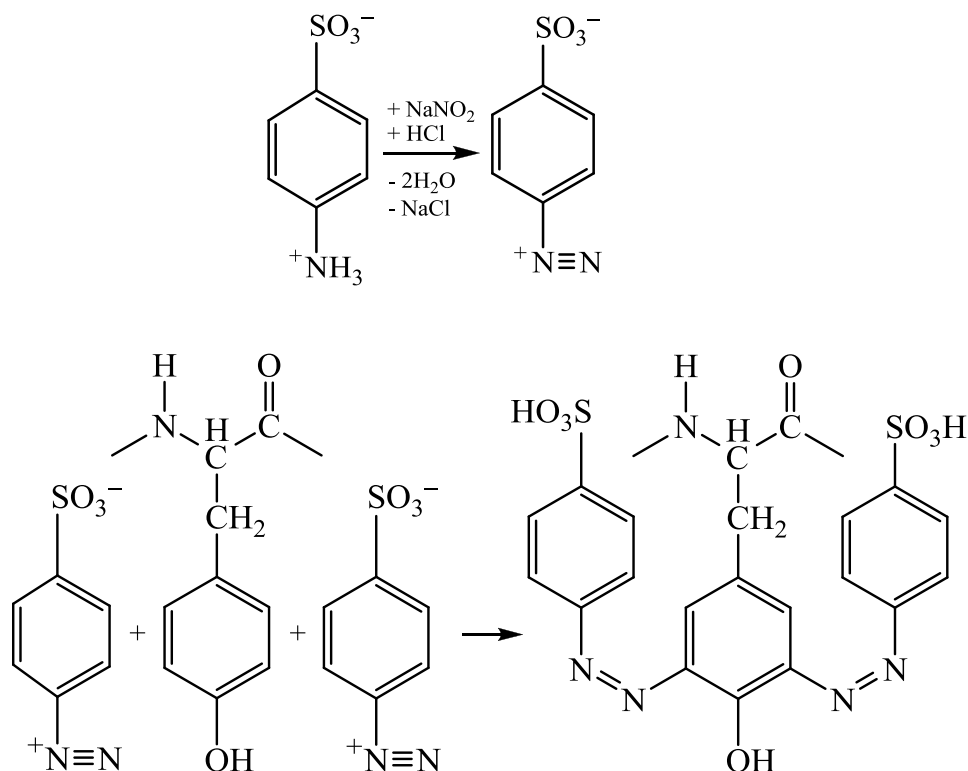
Мета роботи. Ознайомитися з реакцією ароматичного трикетону нінгідрину з речовинами, що мають вільні аміногрупи.

Обладнання та реактиви. Водяна баня. Розведений розчин білка. Розчин нінгідрину ($\omega=1\%$) в ацетоні ($\omega=95\%$).

Хід роботи. До 2-3см³ розведеного розчину білка додають розчин нінгідрину ($\omega=1\%$) в ацетоні ($\omega=95\%$). Перемішують і ставлять у водяну баню при 70°C на 15-20 хвилин. Розвивається синьо-фіолетове забарвлення.

Дослід 5. Реакція Паулі

Принцип методу. Реакція Паулі – це реакція азосполучення п-сульфофенілдіазонійхлориду з ароматичними амінокислотами як вільними, так і у складі пептидів і білків. Спочатку проводять на холоді діазотування сульфанілової кислоти, а потім реакцію азосполучення з ароматичними амінокислотами у складі білків. Розвивається оранжево-червоне забарвлення у результаті утворення азобарвника.



Мета роботи. Ознайомитися з реакцією азосполучення п-сульфофенілдіазонійхлориду з ароматичними амінокислотами як вільними, так і у складі пептидів і білків

Обладнання та реактиви. Пробірки. Сульфанілова кислота, ($\omega=1\%$) у розчині хлоридної кислоти, ($\omega=5\%$), розчин натрій нітрату (III), ($\omega=0,5\%$), розведений розчин білка, розчин натрій карбонату, ($\omega=10\%$),

Хід роботи. До 1см^3 розчину сульфанілової кислоти ($\omega=1\%$) в розчині хлоридної кислоти, ($\omega=5\%$) додають 2см^3 розчину натрій нітрату (III), ($\omega=0,5\%$), ретельно перемішують і зразу додають спочатку 2см^3 розведеного розчину білка, а потім, після перемішування

вмісту пробірки, 6см^3 розчину натрій карбонату ($\omega=10\%$), знову перемішують. Розвивається вишнево-червоне забарвлення.

Лабораторна робота 4

Кількісне визначення білка сироватки крові біуретовим методом

Принцип методу. Біуретова реакція застосовується для виявлення в пептидах і білках пептидних зв'язків $-\text{CO}-\text{NH}-$.

За наявності в молекулах речовин не менше двох пептидних зв'язків при взаємодії їх з купрум гідроксидом у лужному середовищі утворюються комплекси, які мають рожево-фіолетове забарвлення. Інтенсивність забарвлення пропорційна вмісту в розчині пептидів чи білків.

Біуретова реакція малочутлива, тому в досліджуваному розчині повинно міститися не менше декількох міліграмів білка в 1см^3 .

Мета роботи. Ознайомитися з принципом біуретової реакції та кількісно визначити вміст білка в досліджуваному розчині.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або Фотоелектроколориметр. Натрій хлорид, ($\omega=1\%$). Пробірки. Сироватка крові. Біуретовий реактив.

Хід роботи. Перед визначенням вмісту білка сироватку крові розбавляють у 10 разів розчином натрій хлориду ($\omega=1\%$).

У пробірку вносять 1см^3 розбавленої сироватки крові, додають 8см^3 біуретового реактиву, перемішують і залишають на 30хв. Далі розчин спектрофотометрують ($\lambda=540\text{нм}$) у кюветах з $l=10\text{мм}$ проти контролю на реактиви, який містить 1см^3 дистильованої води і 8см^3 біуретового реактиву. Проводять не менше трьох паралельних визначень вмісту білка в досліджуваній сироватці крові.

Вміст білка в пробі визначають за калібрувальним графіком.

Для побудови калібрувального графіка готують три серії стандартних розчинів, що містять 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10мг білка в 1см^3 . Для

цього зважують 250 мг кристалічного білка (наприклад, кристалічного сироваточного альбуміну), кількісно переносять у мірну колбу на 25см^3 , додають розчин натрій хлориду ($\omega=1\%$), розчиняють білок і доводять цим же розчином натрій хлориду до риски, добре перемішують. В отриманому розчині міститься $10\text{мг}/\text{см}^3$ білка. Шляхом розведення вихідного розчину білка розчином натрій хлориду ($\omega=1\%$) отримують розчини з різним вмістом білка в 1см^3 .

Беруть із першої серії по 1см^3 кожного стандартного розчину білка в окремі пробірки і додають у кожен з них по 8см^3 біуретового реактиву. Залишають на 30хв. при кімнатній температурі, потім спектрофотометрують за тих же умов, що і в досліді. Визначення повторюють тричі, беручи кожного разу нову серію стандартних розчинів білка. За отриманими значеннями екстинкцій будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис вміст білка в 1см^3 стандартного розчину, а на осі ординат – оптичну густину цього розчину.

Знайшовши за калібрувальним графіком вміст білка в досліджуваній пробі, розраховують з урахуванням розбавлення вміст білка в мг% в сироватці крові.

Лабораторна робота 5

Кількісне визначення білка за методом Лоурі

Принцип методу. За методом Лоурі вимірюють інтенсивність забарвлення розчину, який з'являється в результаті перебігу принаймні двох реакцій на білок: біуретової реакції і реакції Фоліна з залишками тирозину і цистеїну у складі білкових молекул. Реактив Фоліна – це суміш фосфорновольфрамової і фосфорномолібденової кислот. За участі білка відбувається відновлення цих кислот. Їх відновлені форми мають інтенсивно синє забарвлення. Вважають, що у реакції відновлення беруть участь комплексні сполуки Купруму, які виникають при взаємодії білка у лужному середовищі з купрум гідроксидом. Метод

Лоурі надзвичайно чутливий і дозволяє визначати білок у сильно розведеному розчині, де його кількість складає лише десятки мікрограмів, і, як правило, застосовується для визначення білків в елюатах із колонок при фракціонуванні на іонообмінних смолах і сефадексах. За методом Лоурі у розчині визначається не сам білок, а результат його відновної дії на фосфорновольфраміву і фосфорномолібденову кислоти.

Мета роботи. Виробити у студентів вміння кількісного експрес-визначення водорозчинних білків колориметричним методом з використанням біуретової реакції та реакції Фоліна. Ознайомити студентів з іншими методами кількісного визначення білків, підкреслити переваги і недоліки методу Лоурі у порівнянні з іншими методами. Розширити знання про суть колориметричних методів визначення концентрації речовин.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Розчин білка. Розчин А (являє собою розчин натрій карбонату ($\omega=2\%$) в розчині натрій гідроксиду ($c=0,1$ моль/дм³). Розчин В (являє собою розчин купрум сульфату ($\omega=0,5\%$) в розчині натрій цитрату ($\omega=1\%$) або натрій чи калій тартрату ($\omega=3,33\%$). Реактив Фоліна.

Хід роботи. Готують розчин для проведення біуретової реакції. Для цього перед проведенням визначення змішують 49см³ розчину А з 1см³ розчину В. До 1см³ досліджуваного білкового розчину, що містить від 10 до 100 мкг білка, додають 4см³ суміші розчинів А і В. Перемішують і залишають на 10хв. при кімнатній температурі. Потім швидко приливають з піпетки 0,4см³ реактиву Фоліна, енергійно перемішують і залишають на 30-90хв. для розвитку забарвлення. При цьому жовте забарвлення реактиву Фоліна поступово переходить в синє. Оптичну густину розчину визначають на спектрофотометрі або фотоелектроколориметрі при довжині хвилі 750нм у кюветі з $l= 10$ мм.

Вміст білка у досліджуваній пробі визначають за калібрувальним графіком, який будують за розчином будь-якого чистого білка точно відомої концентрації. Краще використовувати розчин того білка або суміші білків, які визначають за методом Лоурі. Для цього готують серію розчинів чистого білка, в 1см^3 якого міститься від 20 до 400 мкг білка. Стандартний білок для калібрувального графіка розчиняють в розчині натрій гідроксиду ($c=0,1\text{моль/дм}^3$). Серію розчинів готують шляхом розведення вихідного концентрованого розчину білка (400мкг в 1см^3) до необхідних значень. З кожним з вказаних розчинів проводять не менше 3 разів реакцію Лоурі, застосовуючи ті ж об'єми реагентів, що вказано вище ($5,4\text{см}^3$). За отриманими даними будують графік – калібрувальну криву. На ординаті відкладають значення оптичної густини, на абсцисі – вміст білка в пробі.

Визначивши оптичну густину досліджуваного розчину білка після проведення реакції Лоурі, на калібрувальному графіку проводять від певного значення оптичної густини пряму, паралельну осі абсцис до пересічення з калібрувальною кривою і опускають перпендикуляр на вісь абсцис. Таким чином визначають вміст білка в пробі досліджуваного розчину. Роблять перерахунки вмісту білка на 100см^3 досліджуваного розчину.

Перевагами визначення білка за методом Лоурі є короткий час визначення у порівнянні з іншими методами і надзвичайно велика чутливість, що дає можливість визначати слідові кількості білка. Недоліками є те, що за цим методом можна визначити лише водорозчинні білки, сине забарвлення розчину не досить стійке, що зменшує точність вимірювання.

Лабораторна робота 6

Визначення фракцій білків сироватки крові методом електрофорезу в поліакриламідному гелі

Принцип методу. Для розділення суміші кислих білків застосовують гелі з лужною системою буферів з рН 8,9, а основних білків – кислотною системою з рН 4,3. У роботі застосовується гель з рН 8,9.

Мета роботи. Освоїти методику розділення суміші білків методом електрофорезу у поліакриламідному гелі, отримати й оцінити електрофореграму білків сироватки крові.

Обладнання та реактиви. Камера для електрофорезу. Піпетка з відтягнутим кінцем. Розчини №1, 2, 3. Дистильована вода. Розчин сахарози ($\omega=40\%$), барвник бромфеноловий синій ($\omega=0,001\%$), трихлор-оцтова кислота ($\omega=5\%$), барвник амідочорний ($\omega=1\%$), оцтова кислота ($\omega=7\%$).

Будова приладу для електрофорезу у поліакриламідному гелі

Камера для електрофорезу (рис.4) складається із стакана, верхньої камери і кришки. Верхня камера являє собою стакан, в дні якого є десять отворів, через які проходять скляні трубки діаметром 6мм і довжиною 100мм. Герметичність сполучення трубок з верхньою камерою здійснюється за допомогою втулок. При заповненні трубок сумішшю для полімеризації гелів трубки знизу закриваються втулками.

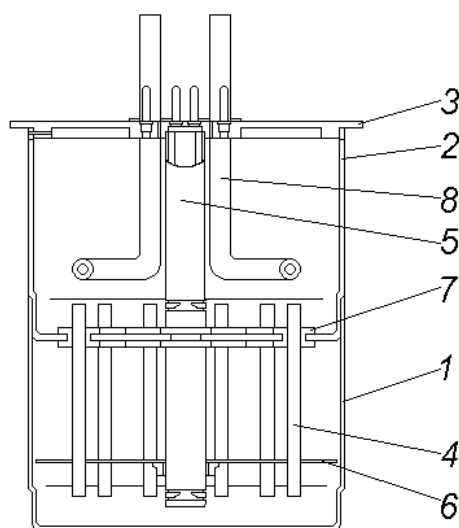


Рис.4. Камера електрофоретична (1-стакан; 2-верхня камера; 3-кришка; 4-трубка; 5-стержень; 6-диск; 7-втулка; 8-змійовик).

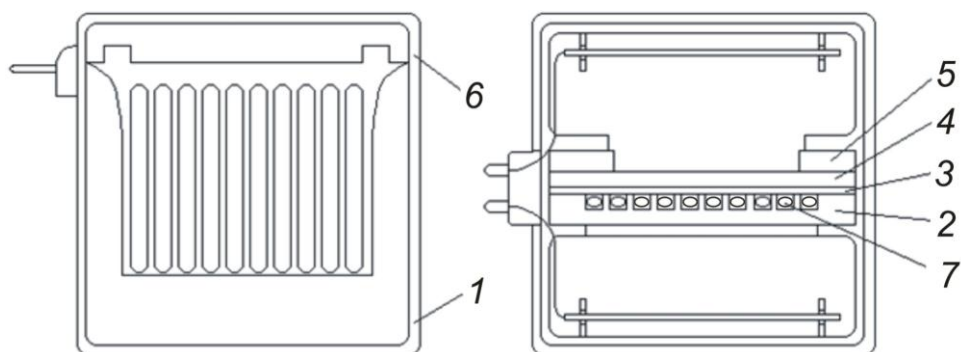


Рис.5. Камера для знебарвлювання (1-ванна; 2-касета; 3-прокладка; 4-рамка; 5-розпорка; 6-кришка; 7-стовпчик гелю).

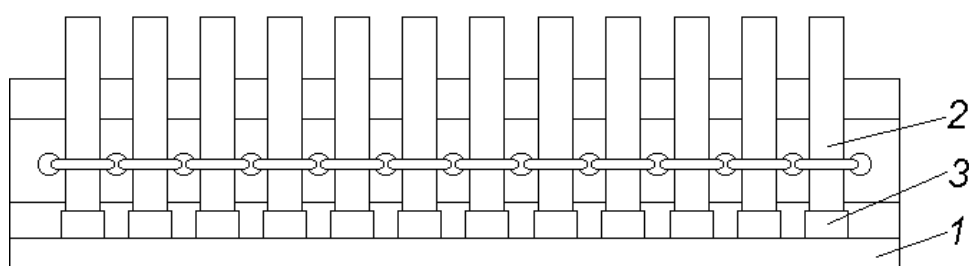


Рис.6. Штатив для полімеризації гелю (1-штатив; 2-трубка; 3-втулка).

У центрі камери розташований стержень, всередині якого знаходяться платинові електроди, сполучені з контактами камери. На стержень надітий диск, що забезпечує вертикальне розміщення трубок. Верхня камера встановлюється на стінки стакана і закривається кришкою. Кришка має два контакти, сполучених перемичкою. У кришці за допомогою гумових втулок закріплюється змійовик, який служить для охолодження електродного буферного розчину.

Гель, що застосовується для електрофорезу, полімеризується безпосередньо в трубках, які знизу закриваються гумовими втулками і встановлюються в спеціальному штативі (рис.6).

Готовий стовпчик гелю має два шари: нижній – дрібнопористий для розділення білків на фракції; верхній – крупнопористий для звуження білкової зони перед фракціонуванням. Звуження білкової зони відбувається автоматично до декількох мікрон.

Камера для знебарвлювання (рис.5) складається з ванни і кришки. В ванну вставляється касета, яка розділяє її на два відсіки. В середині ванни знаходяться два платинових електроди, які сполучені з контактами ванни. Кришка має два контакти, сполучених перемичкою.

Приготування гелів та підготовка приладу до роботи

Перед полімеризацією гелів необхідно ретельно вимити і висушити скляні трубки, закрити їх з одного кінця втулками і встановити в штатив.

Для приготування крупнопористого гелю необхідно змішати в колбочці на 50см³ 1 частину розчину № 1, 2 частини розчину № 2, 4 частини розчину № 3 і 1 частину дистильованої води.

Піпеткою з відтягнутим кінцем залити отриману суміш в трубки для нижнього гелю до мітки на штативі, слідкуючи за тим, щоб не попали бульбашки повітря.

Нашарувати обережно із піпетки з відтягнутим кінцем воду висою стовпчика 5-7мм для вирівнювання менісків, а також для того, щоб не було доступу кисню повітря до суміші, де відбувається полімеризація акриламиду.

Після цього залишають на 60-90хв. для полімеризації. Полімеризацію можна прискорити при освітленні трубок лампою денного світла, яку розташовують поблизу трубок, і легеньким підігрівом. Кінець полімеризації визначається появою чіткої межі між гелем і водою.

Для приготування крупнопористого (верхнього) гелю змішують в колбочці на 50см³ 1 частину розчину №4, 2 частини розчину №5, 1 частину розчину №6 і 4 частини води. При виконанні цієї роботи слід уникати яскравого світла.

Після полімеризації нижнього гелю ретельно видаляють воду з трубок за допомогою стрічок фільтрувального паперу. Після цього

обережно піпеткою з відтягнутим кінцем вносять суміш для верхнього гелю висотою стовпчика 5-7мм. Зверху нашаровують воду для вирівнювання менісків і вмикають яскраве світло для фотополімеризації. Закінчення полімеризації визначається появою опалесценції в цій частині гелю. За допомогою стрічок фільтрувального паперу видаляють воду з верхнього гелю.

Змішують $0,1 \text{ см}^3$ сироватки крові з антиконвекційною сумішшю, що являє собою суміш $0,25 \text{ см}^3$ розчину № 4 і 1 см^3 розчину сахарози ($\omega=40\%$).

Цю суміш переносять у кожену трубочку зверху крупнопористого гелю з розрахунку 100-200мкг білка на трубочку.

З нижніх частин трубочок знімають гумові втулки, трубочки встановлюють у верхній камері таким чином, щоб верхні кінці трубок виступали на 1-2мм або були на одному рівні з ущільнюючими втулками. При установці трубок диск, що забезпечує вертикальне розташування трубок, повинен бути у верхньому положенні. Після того, як трубочки будуть встановлені, диск опускають і фіксують за допомогою паза.

З нижніх кінців трубок за допомогою шприца з голкою, заповненого електродним буфером, видаляють бульбашки повітря. Треба, щоб при цьому кожна трубка мала краплину буферу, що звисає. Заливають буферний електродний розчин в нижню камеру до риски, встановлюють верхню камеру в нижню.

В одну трубку додають до суміші з сироваткою крові трохи барвника бромфенолового синього ($\omega=0,001\%$) для спостереження за рухом білка при електрофорезі. Бромфеноловий синій виступає у даному випадку в ролі маркера: він при електрофорезі в лужному гелі рухається попереду першої фракції преальбуміну. Заливають електродний буферний розчин у верхню камеру. Встановлюють камеру

для електрофорезу в камеру для охолодження, заповнену водою з льодом. Підключають змішувач до водопроводу.

Підключають камеру для електрофорезу до електронного блоку живлення. При підключенні враховувати полярність електродів так, щоб білки під дією електричного поля рухалися в гелі зверху вниз. Для розділення кислих білків у лужному гелі верхній електрод повинен бути приєднаний до (-) джерела струму, а нижній електрод камери – до (+) джерела струму.

Проведення електрофорезу

До входження маркера в нижній гель (приблизно 30хв.) сила струму не повинна перевищувати 2 міліампери на кожен трубочку (20 міліампер на 10 трубочок). Після цього струм збільшують до 4 міліампер на трубочку (40 міліампер на 10 трубочок) до закінчення процесу електрофорезу. Коли диск маркера буде на відстані 5-7мм від нижнього кінця гелю, процес електрофорезу припиняють.

Обробка гелевих стовпчиків після електрофорезу

Розбирають камеру, виймають трубки. Для того, щоб видалити стовпчики з трубок, трубку занурюють у посудину з водою, під водою вводять голку між стінкою трубки і стовпчиком гелю, відшаровують гель від стінок трубки, після чого гель легко виймається. Вийняті стовпчики гелю вміщують на 30хв. в розчин трихлороцтової кислоти ($\omega=5\%$) для фіксації. Після цього стовпчики відмивають декілька разів від трихлороцтової кислоти і вносять на 20хв. в розчин барвника амідочорного ($\omega=1\%$) в оцтовій кислоті ($\omega=7\%$). Барвник зливають, промивають гель водопровідною водою. Гелеві стовпчики вкладають в канавки касети камери для знебарвлювання, встановлюють касету у ванні, вносять у ванну розчин оцтової кислоти ($\omega=7\%$) так, щоб рівень розчину був на 5-7мм вище верхнього рівня гелевих стовпчиків у касеті. Підключають камеру до блоку живлення. Через 10-20хв. після очистки гелевих стовпчиків від вільного барвника їх виймають з касе-

ти. Зберігати гелеві стовпчики можна в пробірках з розчином оцтової кислоти ($\omega=7\%$) протягом тривалого часу. Проводять оцінку електрофореграми, відзначаючи виявлені фракції білків сироватки крові.

Лабораторна робота 7

Розділення суміші амінокислот хроматографічним методом

Принцип методу. Групу речовин, що мають близькі хімічні властивості, практично не можна розділити за допомогою хімічних реакцій бо для цього немає специфічних реагентів. До таких речовин відносяться і білкові амінокислоти. У такому разі для розділення речовин застосовують фізико-хімічні методи, засновані на розчинності речовин у різних розчинниках, адсорбції, йонному обміні і інші.

Хроматографія була відкрита російським ботаніком М.С. Цветом у 1903 році і використана ним для розділення суміші рослинних пігментів. М.С. Цвет впровадив у науку адсорбційний метод хроматографії. Цей метод полягає у тому, що при пропусканні будь-якого розчину крізь високу і порівняно вузьку колонку, наповнену адсорбентом, речовини поглинаються в залежності від ступеня їх адсорбуєності.

Отриману хроматограму проявляють, пропускаючи крізь неї деяку кількість розчинника, як правило того ж, у якому розчинена досліджувана речовина. Для кожного компонента суміші у цій двофазній системі характерна рівновага, завдяки чому на стовпчику адсорбенту утворюються горизонтальні зони певної висоти, які переміщуються вниз, вздовж колонки, за шляхом руху рідини, що проявляється, зі швидкістю, яка залежить від здатності даної речовини адсорбуватися адсорбентом, що міститься у колонці. Оскільки ця здатність адсорбуватися у різних речовин різна, то зони більш або менш чітко відділяються одна від іншої.

Розподільна хроматографія заснована на різниці коефіцієнтів розподілення компонентів досліджуваної суміші між двома рідкими фазами, які взаємно не змішуються, причому одна фаза є нерухомою і знаходиться у порах твердого носія, який має також адсорбційні властивості.

Розподільна хроматографія, як і екстракція, заснована на законі розподілення Нернста: Відношення концентрацій речовини у двох різних фазах, які взаємно не змішуються, є величина стала для даної речовини і даної системи рідких фаз.

$$K = \frac{C_1}{C_2}$$

Якщо взяти ділильну лійку, вмістити в неї дві рідкі фази, які взаємно не змішуються, наприклад бутанол і воду, внести у лійку якусь речовину, що може розчинятися в обох фазах, але по-різному, струшувати, то речовина розподілиться між цими двома фазами в залежності від її спорідненості до кожної з цих фаз. Обов'язковою умовою при цьому є розчинність речовини в обох фазах, бо коли речовина розчинятиметься тільки в одній фазі, то ніякого розподілення не буде.

Якщо ж у ділильну лійку внести суміш речовин, наприклад амінокислот, струшувати, то речовини розподіляться між двома фазами по-різному в залежності від їх коефіцієнтів розподілення:

$K_1 = \frac{C_1}{C_2}$, $K_2 = \frac{C_1}{C_2}$ і т.д., де C_1 і C_2 – концентрації речовини у різних фазах.

Розглянемо конкретний приклад. У ділильну лійку, у якій знаходиться бутанол і вода, що взаємно не змішуються, внесемо, наприклад, 10 білкових амінокислот. Перемішаємо вміст лійки. Після розділення фаз у кожній буде міститися по 10 амінокислот. Відкриємо кран лійки і зберемо окремо водну і бутанольну фазу. Водну фазу перенесемо у нову ділильну лійку і додамо чистого бутанолу. Після струшування

суміші відбудеться знову розподілення 10 амінокислот між двома фазами. В бутанольній фазі теж буде 10 амінокислот. Але при цьому водна фаза відносно збагатиться тими амінокислотами, які мають більшу спорідненість до води. Бутанольну фазу з першої лійки теж перенесемо у нову ділильну лійку і додамо сюди чистої води. Після струшування у добавлену водну фазу перейде теж 10 амінокислот, а бутанольна фаза при цьому відносно збагатиться тими амінокислотами, які мають кращу спорідненість до бутанолу і яких у нову водну фазу перейшла незначна кількість.

Якщо розділити фази у кожній другій лійці, то матимемо окремо водну і бутанольну фазу з одної лійки і водну і бутанольну фазу з другої лійки. Перенесемо ці розділені фази у нові ділильні лійки. Тепер їх буде вже 4. Додавши у кожен з них відповідно чисту воду чи бутанол, повторимо операцію розділення.

Якщо зробити таких перенесень дуже багато, то врешті-решт можна отримати велику кількість стаканчиків із фракціями амінокислот. Наприклад їх є вже 1000. У кожній фракції буде по 10 амінокислот. Але якщо у першому стаканчику першої амінокислоти буде 99,999%, то інших дев'ять амінокислот разом узятих буде лише 0,001%. В тисячному стаканчику десятої амінокислоти буде, наприклад, 99,999%, а 1-9 амінокислот разом узятих буде лише 0,001%. Застосовуючи при екстракції велику кількість перенесень у нові ділильні лійки, тобто зробивши велику кількість актів розподілення, можна добре розділити суміш речовин. Але апаратура для екстракції дуже громіздка і це створює певні проблеми.

Щоб уникнути цього, спростити розділення, була введена розподільна хроматографія. Принциповим у цій хроматографії є те, що одна з фаз, які взаємно не змішуються, є нерухомою. Для закріплення однієї з фаз застосовують різні носії: крохмаль, алюміній оксид, силікагель, целюлозу, спеціальний хроматографічний папір. Розподі-

льна хроматографія може бути колоночною, коли носій вноситься у колонку, зверху наноситься суміш речовин, які потрібно розділити. Проявлення хроматограми ведеться відповідним розчинником зверху вниз.

Іншою різновидністю є паперова хроматографія. Носієм у цьому випадку є спеціальний хроматографічний папір. Він являє собою особливий фільтрувальний папір, який не містить забруднюючих домішок і практично складається з чистої целюлози. Целюлозні волокна у ньому орієнтовані в одному напрямку і не перетинаються, цей папір має рівномірну товщину по всій довжині. Якщо розглядати такий папір на світло, то не повинно бути темних і світлих плям, як це має місце у звичайному фільтрувальному папері. Хроматографічний папір може мати різну щільність і у зв'язку з цим переміщення речовин на таких хроматограмах відбувається з різною швидкістю: чим щільніший папір, тим швидкість проявлення хроматограми менша. Хроматографічний папір інтенсивно адсорбує з повітря лабораторії різні речовини і тим самим забруднюється. Тому зберігати його потрібно у закритих ящиках чи коробках. Брати хроматографічний папір руками не можна, бо з рук переходять на папір жири, амінокислоти, солі і інше. Для роботи з цим папером користуються гумовими рукавичками або беруть його пінцетом. Якщо взяти папір пальцями, то на ньому залишаються відбитки пальців, які можна виявити, обробивши папір розчином нінгідрину.

Розглянемо суть хроматографії з паперовим носієм – хроматографію на папері. Зануримо кінець стрічки хроматографічного паперу у систему бутанол/вода. Целюлоза має більшу спорідненість до води, ніж до бутанолу. Вода буде підніматися по капілярах паперу, змочуючи стрічку. Вода, просочивши хроматографічний папір, стає нерухомою фазою, а крапельки бутанолу рухаються по поверхні змоченого

паперу. Нанесемо на папір в одній точці суміш амінокислот вище рівня рідини. Точка або стрічка нанесення на хроматограму речовин називається стартовою. Піднімаючись по хроматограмі вгору, крапелька бутанолу доходить до стартової точки, у якій є нерухома крапелька води і містяться ті ж 10 амінокислот. Відбувається акт розподілення речовин між водою і бутанолом у цій точці. Тобто ця точка по суті є мікроскопічною ділильною лійкою. Спочатку бутанольна крапля не містила речовин, після розподілення в неї переходить теж 10 амінокислот – 10 амінокислот в стартовій точці (водна фаза) і 10 амінокислот в бутанольній краплі. Далі бутанольна крапля переміщується вгору і відбувається акт розподілення речовин між бутанольною краплею, що містить 10 амінокислот і нерухомою краплею чистої води, у яку теж переходить 10 амінокислот. Бутанольна крапля переміщується ще вище і відбувається акт розподілення між бутанольною краплею, що несе 10 амінокислот, і новою чистою нерухомою краплиною води.

Звідси, рухаючись вздовж хроматограми (проявлення хроматограми), бутанольна крапля переносить амінокислоти, при цьому бутанольна фаза відносно збагачується тими амінокислотами, які мають більшу спорідненість до бутанолу, а ті що мають меншу спорідненість, залишаються у точках з водною фазою. Відбувається розділення речовин на хроматограмі.

Таким чином, стрічку паперу можна розглядати як систему з дуже великою кількістю точок, у яких відбувається акт розподілення. А чим більше таких актів, тим краще розділення. Але ємність цих мікроскопічних „ділильних лійок” у випадку паперової хроматографії дуже незначна і тому паперова хроматографія непридатна для препаративного розділення речовин, а застосовується практично для аналітичних цілей.

Чим більшу спорідненість речовина має до води і меншу до бутанолу, тим менший шлях пройде вона на хроматограмі від старту. І, навпаки, чим більшу спорідненість вона має до бутанолу і меншу до води, тим більший шлях вона пройде на хроматограмі. Передній край речовини на хроматограмі завжди менший, ніж фронт розчинника. Якби речовина не мала зовсім спорідненості до води (тобто розчинялась тільки в бутанолі), то на хроматограмі вона йшла б із фронтом розчинника, а якби мала спорідненість тільки до води, то залишалась би на старті. Отже, суміш речовин, які розчиняються тільки в одній фазі, розділити неможливо, бо вони будуть або на старті, коли розчиняються тільки у воді, або будуть йти з фронтом розчинника, коли розчиняються тільки в бутанолі. Тобто у такому разі ніякого розділення не буде. Розташування речовин на хроматограмі цілком залежить від спорідненості їх до одної і другої фази, тобто від значення константи розподілення:

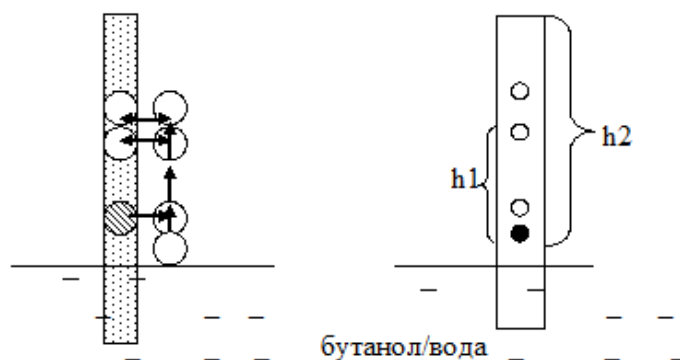


Схема хроматограми.

Отже, місце речовини на хроматограмі впливає із закону розподілення Нернста. Для графічної характеристики цього закону вводиться поняття про величину R_f :

$Rf = \frac{h_1}{h_2}$, де Rf – є відношення шляху, пройденого речовиною на хроматограмі – h_1 , до шляху, пройденого розчинником h_2 , у будь-який проміжок часу і є величиною сталою для даної речовини і даної системи рідких фаз. Величина Rf завжди менша одиниці, бо речовина на хроматограмі йти попереду розчинника не може.

Для розділення речовин підбирають емпірично найрізноманітніші системи рідких фаз, користуючись обов'язковим правилом, що речовини, які потрібно розділити, повинні мати спорідненість до обох фаз. Значення Rf для різних речовин і різних систем рідких фаз зведені у довідниках у таблиці. Наводимо значення Rf для деяких білкових амінокислот у системі н-бутанол – льодова оцтова кислота – вода у співвідношенні 4:1:5 (табл. 13).

Як видно з наведених значень Rf , у даній системі розчинників ряд амінокислот мають однакові або дуже близькі значення Rf , отже на хроматограмі вони будуть знаходитись в одній плямі або дуже близько розташованих плямах, які накладаються одна на одну. Тому для розділення таких речовин потрібно пошукати у довіднику іншу систему рідких фаз, у якій вони мали б відмінні значення Rf . Чим більше відрізняються значення Rf , тим краще розділяються речовини.

Величина Rf , хоч і є сталою (табличною) для даної речовини в даній системі рідких фаз, малоприсадна для ідентифікації речовин на хроматограмах. На положення речовин на хроматограмі впливає не тільки значення коефіцієнту розподілення її між двома рідкими фазами.

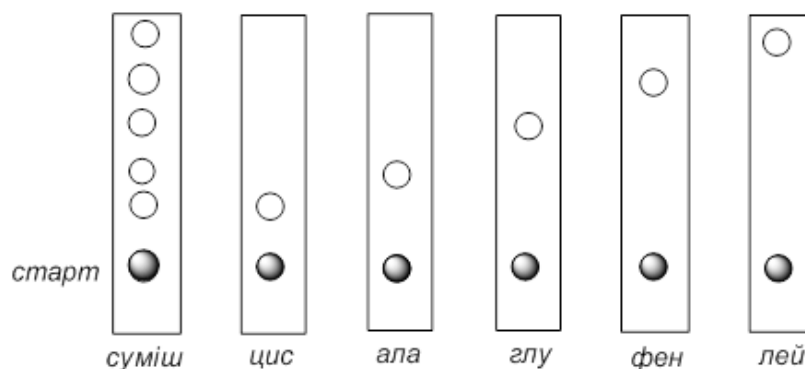
Суттєвий вплив мають інші фактори: рівновага в точках розподілення речовин між двома фазами не настає миттєво і речовини, які б мали б у більшій мірі перейти у водну фазу, не встигають цього зробити і переносяться бутанольною краплею далі; носій, зо-

крема у значній мірі целюлоза, адсорбує на своїй поверхні речовини і вони затримується носієм, не мають змоги переноситись далі бутанольною краплею згідно з їх поведінкою за законом розподілення, величина R_f буде мати занижене значення; на величину R_f впливає можлива хімічна взаємодія між рідкими фазами, між розчинником і речовинами, які розділяються, між речовинами і носієм; змінюють значення R_f і домішки, що містяться у речовинах, що розділяються, або на носії, особливо впливають на розділення речовин мінеральні солі; коефіцієнт розподілення може змінюватись в залежності від концентрації при застосуванні полярного розчинника, який сприяє дисоціації речовин, що розділяються; при малій швидкості проявлення хроматограми можлива дифузія речовин на носії і інше.

Таблиця 13. Зачення R_f для деяких білкових амінокислот

Амінокислота	R_f	Амінокислота	R_f
Аланін	0,28	Валін	0,45
Аргінін	0,10	Лейцин	0,61
Аспарагінова	0,16	Метіонін	0,44
Гістидин	0,10	Треонін	0,17
Лізін	0,08	Триптофан	0,43
Гліцин	0,17	Фенілаланін	0,53
Глутамінова	0,17	Цистеїн	0,05
Серин	0,16		

Для ідентифікації речовин на хроматограмах краще користуватись паралельним з сумішшю проявленням хроматограми з одною речовиною:



Принцип ідентифікації речовин на хроматограмі із „свідком”

При цьому на всіх хроматограмах фактори, що заважають, будуть однакові. У даному випадку визначати величину R_f не потрібно, слід прикласти хроматограму з індивідуальною речовиною до хроматограми з сумішшю і за положенням плям визначити речовину.

За технікою виконання паперова хроматографія може бути висхідною, коли проявлення хроматограми відбувається знизу вгору, і низхідною, коли розчинник рухається згори вниз. У останньому випадку не можна допускати стікання розчинника по хроматограмі, він, як і при висхідному способі проявлення, повинен рухатись по капілярах носія. При низхідному методі проявлення хроматограми розчинник наливають у човник, занурюють кінець хроматограми.

Стартову точку наносять на вертикальній ділянці хроматограми. Висхідний і низхідний варіанти проявлення мають свої переваги і недоліки. При висхідному варіанті проявлення відбуваються дуже довго, навіть місяць і більше без помітного розмивання плям. При цьому виключається небезпека перетікання розчинника з хроматограми, бо коли фронт розчинника дійде до верхнього краю паперу, проявлення автоматично припиняється. При нисхідному варіанті проявлення хроматограми відбувається швидко, декілька годин, але при цьому можливе стікання розчинника з хроматограми. Коли фронт розчинника дійде до кінця хроматограми, розчинник буде капати з неї. Речовини, які мають великі значення R_f і які йшли слідом за фронтом розчинника, будуть залишати хроматограму. Але низхідна хроматографія дуже зручна для розділення речовин, які мають низькі і близькі значення R_f .

Наприклад, одна речовина має $R_f=0,10$, інша— $0,12$. Якщо фронт розчинника 1 метр, то перша речовина пройде на хроматограмі 10см, друга —12см. Відстань між центрами плям буде 2см. Але якщо фронт

розчинника 50см, то відстань між плямами буде лише 1см, тобто одна пляма накладається на іншу. Щоб розділити такі речовини, застосовують проточну хроматографію. До кінця хроматограми пришивають вату або картон і дають розчиннику стікати з хроматограми, тобто він ніби-то проходить довгий шлях, нехай стікання було таким, якби розчинник пройшов шлях 5 метрів. Тоді відстань між речовинами з $R_f = 0,10$ і $R_f = 0,12$ буде вже 10см, тобто вони добре розділяються. Щоб речовини не зійшли з хроматограми, вводять кольоровий маркер - забарвлену речовину, яка у даній системі рідких фаз має R_f трохи більше, ніж $R_f = 0,12$ (для даного прикладу). Коли кольорова пляма маркера доходить майже до кінця хроматограми, проявлення припиняють.

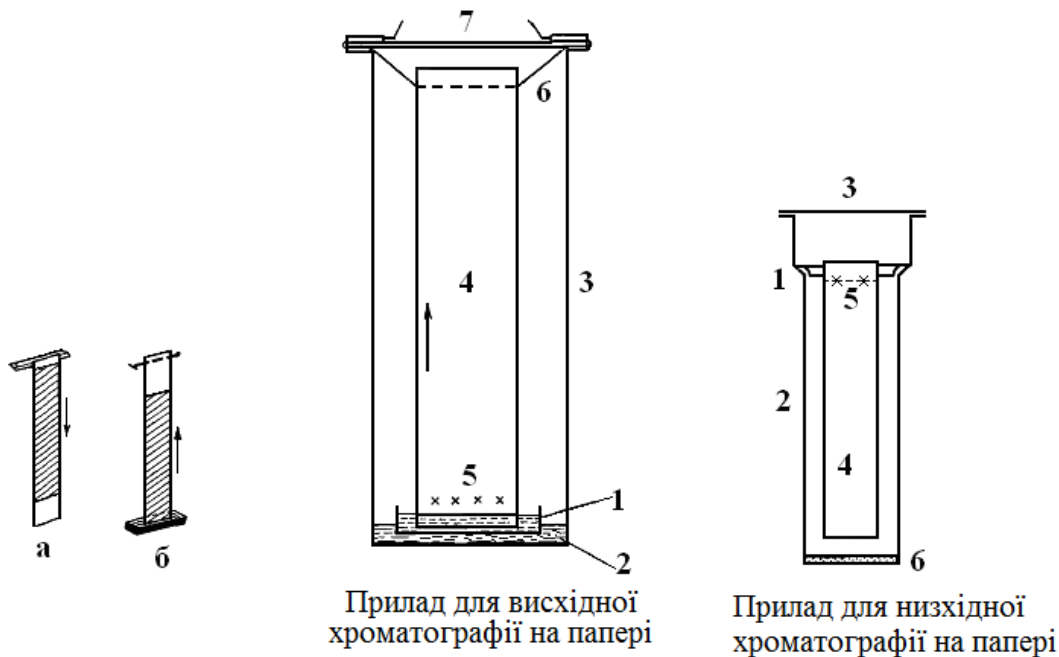


Схема хроматографії на папері (**а** – низхідна хроматографія; **б** – висхідна хроматографія). Прилад для висхідної хроматографії на папері: 1 – розчинник у чашці; 2 – водна фаза на дні циліндру; 3 – циліндр з притертою кришкою; 4 – хроматограма з нанесеними зразками 5; 5 –стартова лінія; 6 – підвіска; 7 – кришка. Прилад для низхідної хроматографії на папері: 1- човник з розчинником; 2 – циліндр; 3 – кришка; 4 – хроматограма з нанесеними зразками 5; 5 –стартова лінія; 6 – водна фаза.

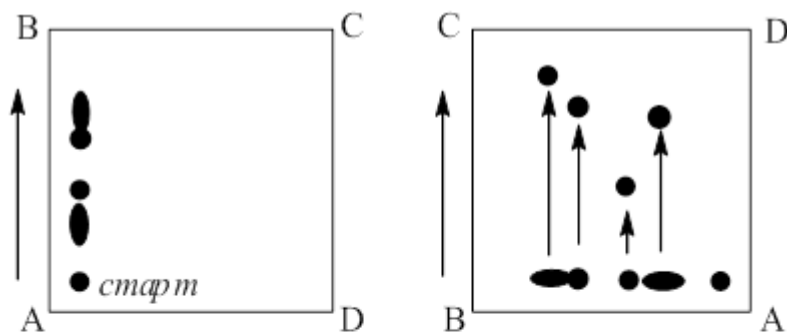
Якщо проявлення хроматограми проводять в одному напрямку (знизу вгору чи згори вниз), то така хроматографія називається одномірною. Внаслідок вищезгаданих факторів, що заважають, плями речовин на одномірних хроматограмах виявляються нечіткими, видовженими, з „хвостами”.

Щоб покращити становище, здійснюють повторне проявлення хроматограми. Після першого проявлення хроматограму виймають з камери, висушують, потім ставлять на друге проявлення. При другому проявленні речовина в „хвостах” буде переноситись до центра плями, бо розчинник раніше дійде до „хвостів”, а центр плями ще буде сухим. Можна проводити і три проявлення одномірної хроматограми.

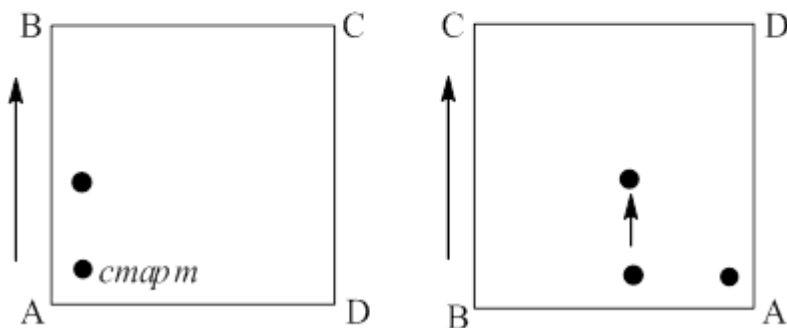
Але кращі результати дає двомірна хроматографія. Для її проведення вирізають квадрат хроматографічного паперу. У куті цього квадрата на відстані 20-25мм від країв наносять стартову точку суміші речовин. Квадрат зшивають у циліндр і ставлять у хроматографічну камеру, на дні якої міститься розчинник. Проявляють хроматограму висхідним способом. Потім хроматограму висушують, розшивають і знову зшивають, повернувши хроматограму на 90°, і проявляють другий раз в перпендикулярному напрямку, використовуючи той самий, чи інший розчинник. При цьому речовини розподіляються по всьому полю квадрата. Ідентифікацію речовин на такій хроматограмі здійснюють шляхом порівняння положення плями на хроматограмі з сумішшю і на хроматограмі з індивідуальною речовиною – „зі свідком”.

Виявлення речовин на хроматограмах не викликає труднощів, коли речовини забарвлені. Якщо вони не мають забарвлення, то проводять хімічні реакції з одержанням кольорових продуктів реакції. Так, наприклад, для виявлення на хроматограмах безбарвних амінокислот висушену хроматограму обробляють ацетоновим розчином нінгідрину і нагрівають. У місцях розташування амінокислот на хро-

матоді розвивається червоно-фіолетове забарвлення. Якщо досліджувані речовини не дають кольорових реакцій, то інколи їх можна виявити опромінюючи хроматограму ультрафіолетовими променями. Видимі в ультрафіолеті плями обводять графітовим олівцем і припиняють опромінювання. У найгіршому випадку хроматограму розрізають на стрічки і кожен стрічку аналізують, змиваючи з неї речовини у розчин, який досліджують за допомогою вже не кольорових реакцій на досліджувані речовини.



Двомірна хроматографія суміші



Двомірна хроматографія індивідуальної речовини

Схема двомірної хроматографії

Мета роботи. Виробити у студентів вміння розділяти суміш білкових амінокислот гідролізату методом розподільчої хроматографії на папері, навчити підбирати систему розчинників, тип хроматографічного паперу, виявляти амінокислоти на хроматограмах та ідентифікувати їх.

Обладнання та реактиви. Витяжна шафа. Сушильна шафа. Хроматографічний папір. Мікропіпетки. Графітовий олівець. Ножиці. Скляна паличка. Хроматографічна камера. Розчини для хроматографії. Дистильована вода. Ацетоновий розчин нінгідрину.

Хід роботи. Вирізають стрічку хроматографічного паперу довжиною 50см і шириною близько 3см. Звернути увагу на те, щоб целюлозні волокна були спрямовані вздовж стрічки. Якщо капіляри будуть розташовані поперек руху розчинника на хроматограмі, то це призведе до поганого розділення речовин. Речовини, що вже розділились, знову зійдуться в одному місці.

На відстані 7см від краю стрічки наносять графітовим олівцем стартову точку. За допомогою мікропіпетки у цю точку у декілька прийомів вносять досліджуваній розчин суміші амінокислот. Після кожного нанесення пляму підсушують. Діаметр стартової плями не повинен перевищувати 5мм. У протилежному разі під час руху по хроматограмі пляма збільшується до таких розмірів, що може не вміститися на стрічці. Щоб нанести на старт достатню кількість амінокислот і щоб при цьому діаметр нанесеної плями був незначним, слід зробити 4-5 нанесень.

Після останнього нанесення стартову пляму остаточно висушують. В кінці стрічки роблять виріз ножицями і через цей виріз нанизують хроматограму на скляну паличку. У човник хроматографічної камери наливають систему розчинників: н-бутанол-оцтова кислота - вода у співвідношенні 4:1:5. Занурюють у човник скляну паличку з нанизаною на неї хроматограмою, закривають камеру герметично кришкою. Відносна герметизація камери необхідна для того, щоб камера була насичена парою розчинника. У протилежному разі розчинник у процесі проявлення буде випаровуватись з поверхні хроматограми, його руху вздовж хроматограми не буде.

Після нанесення стартової плями на неробочій частині хроматограми (за 1-2см від кінця) роблять лабораторні записи графітовим олівцем: номер досліду, хто виконує, дата проявлення хроматограми.

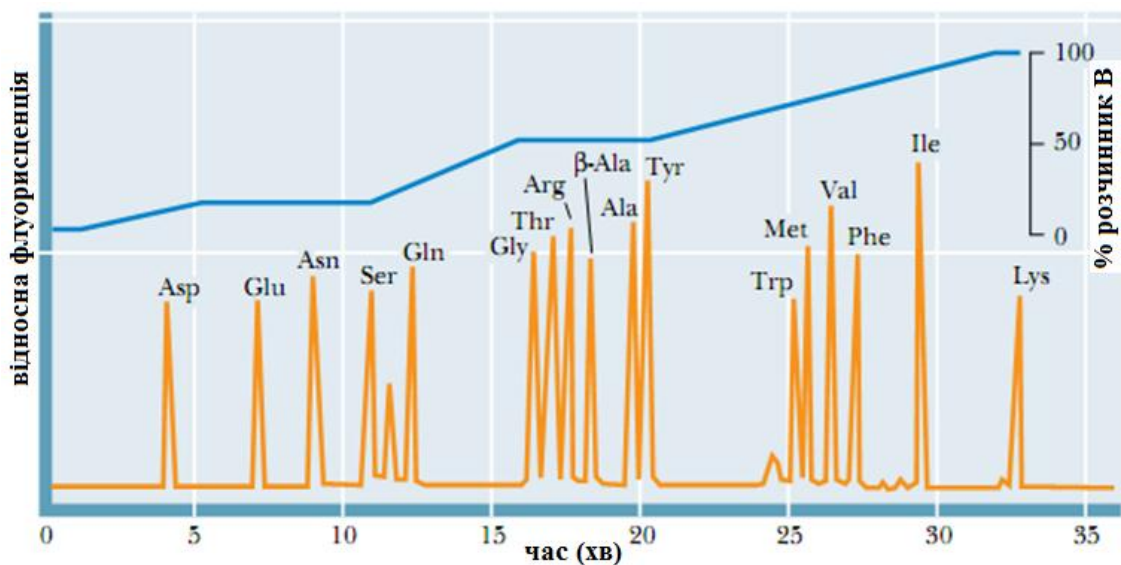
Залишають хроматограму в камері на проявлення протягом близько 10 годин. Треба слідкувати за тим, щоб розчинник не дійшов до кінця хроматограми і не стікав з неї. Коли розчинник буде на відстані 1-2см від краю хроматограми, проявлення припиняють, відмічають поки мокра хроматограма графітовим олівцем фронт розчинника і поміщають хроматограму у витяжну шафу для повітряного висушування. Після повного висушування хроматограму обробляють ацетоновим розчином нінгідрину, дають ацетону випаруватись, хроматограму нагрівають при 70-80°C у сушильній шафі. На місці розташування на хроматограмі амінокислот з'являються червоно-фіолетові плями. Розраховують величини R_f для кожної плями і роблять попередню ідентифікацію амінокислот на хроматограмах. Хроматограму вклеюють у лабораторний журнал. Узгоджують результати досліджень з викладачем.

В умовах сьогодення можна використовувати не тільки паперову, тонкошарову і газову хроматографію, але й іонообмінну, тобто хроматографічні аналізатори амінокислот. Головною частиною їх є колонка, яка заповнена іонообмінною смолою. У ній температура підтримується в межах 37 – 70°C. У верхню частину її подається розчин амінокислот. З допомогою мікропомпи прокачуються один за одним буферні розчини, що містять натрієві або літієві солі цитринової кислоти. У кожному наступному розчині збільшується іонна сила і значення рН. В окремому буферному розчині електричний заряд амінокислот є різний. Це зумовлює різні ступені їх адсорбції на смолі та подальшої десорбції. У зв'язку з наведеним у колонці відбувається розподіл амінокислот. Із колонки розчини амінокислот поступають в капілярні трубки великої довжини (20 М), до яких також надходять розчин нінгідри-

ну, що кількісно реагує з амінокислотами. Слід зазначити, що капілярні трубки знаходяться в реакторі з високою температурою (100°C). За такої температури амінокислоти взаємодіють з нінгідрином, утворюючи синьо-фіолетовий розчин. Останній спрямовується у проточну кювету фотометра, в якому зміна інтенсивності забарвлення зумовлює зміну електричної напруги на фотоелементі. Зміни напруги підсилюються і подаються до само регістратора. На паперовій діаграмі фіксується результат у вигляді графіка (амінограми), де амінокислоти розміщуються одна за одною відповідними піками.

Описана робота приладів є повністю автоматизованою, починаючи з пристрою для автоматичної подачі зразків (автодозатора) і завершуючи пристроєм для автоматичного розрахунку результатів (інтегратора). Хроматографічні аналізатори амінокислот працюють цілодобово, а тривалість аналізу для різних марок приладів займає 1 – 2 год. Важливо відзначити, що для аналізу необхідно дуже малу кількість проби, а похибка результату складає 1 – 3 %.

Демонстраційний приклад хроматографічного розділення амінокислот



Хроматограма високочастотної рідинної хроматографії амінокислот. Хроматографія амінокислот була проведена на колонці з носієм

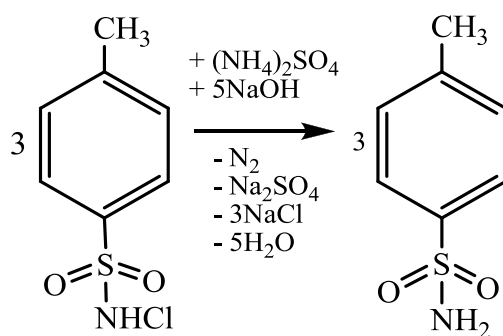
(*Ultrasphere ODS*). Елюція амінокислот в градієнті сумішей (А) тетрагідрофуран:метанол:0.05 М натрій ацетат (рН 5,9) 1:19:80 і (В) метанол:0.05 М натрій ацетат (рН 5,9) 4:1 за швидкості 1,7 мл/хв. (адаптовано за *B. N. Jones, S. Pääbo, S. Stein. Amino acid analysis and enzymic sequence determination of peptides by an improved o-phthaldialdehyde precolumn labeling procedure // Journal of Liquid Chromatography 1981. – Vol. 4. – P. 560–586*).

Лабораторна робота 8

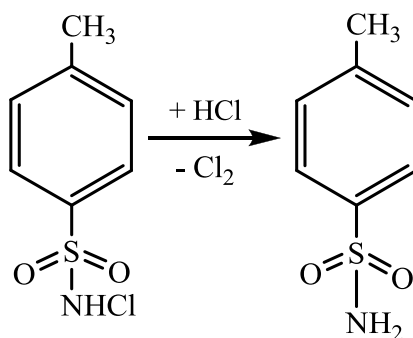
Визначення небілкового і білкового Нітрогену

Принцип методу. До небілкового Нітрогену входить Нітроген розчинних у воді речовин: амінокислот, амідів і азотистих органічних основ.

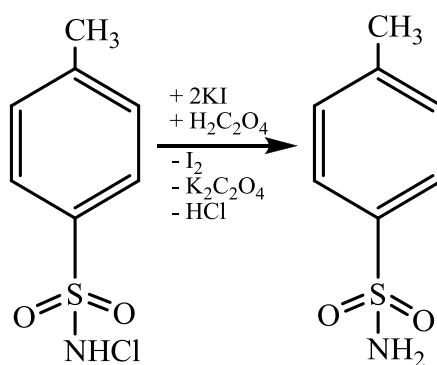
Після гомогенізації досліджуваного матеріалу (взятого, наприклад, з кормів чи водоростей) з водою білки осаджують купрум гідроксидом, відділяють центрифугуванням і промивають дистильованою водою. Розчин, що містить небілковий Нітроген, вміщують у колбу К'ельдаля, випарюють, спалюють із сульфатною кислотою і Нітроген визначають хлорамінним методом. При спалюванні органічних речовин, що містять Нітроген, з концентрованою сульфатною кислотою Нітроген буде знаходитись у формі $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Надлишок сульфатної кислоти нейтралізується натрій гідроксидом і NH_4^+ окиснюється хлораміном :



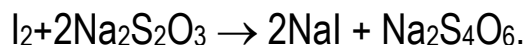
У кислому середовищі хлорамін розкладається з виділенням хлору:



Надлишок хлораміну визначають йодометричним методом:



Йод, що виділився, відтитрують натрій тіосульфатом. Так як надлишок хлораміну в багатьох випадках доводиться визначати в присутності йонів Купруму, то для підкиснення застосовують щавлеву кислоту, яка, зв'язуючи Cu²⁺, запобігає окисненню цими йонами йодид-іона I⁻ до вільного йоду. Отже, якщо не зв'язати Cu²⁺, то йони I⁻ будуть окиснюватися як хлораміном, так і Cu²⁺, що внесе суттєву похибку до результату титрування натрій тіосульфатом:



Застосування щавлевої кислоти дає можливість визначати хлорамін без відділення з середовища йонів Cu²⁺.

Для прискорення спалювання досліджуваного матеріалу застосовують натрій молібдат у присутності калій сульфату. Калій сульфат підвищує температуру кипіння сульфатної кислоти, що прискорює процес спалювання.

Мета роботи. Визначити вміст різних форм Нітрогену в різних організмів, поглибити знання про метаболізми Нітрогену в них.

Обладнання та реактиви. Висушені на повітрі корми і водорості або сирий матеріал. Фарфорова ступка. Дистильована вода. Центрифужна пробірка. Водяна баня. Скляна паличка. Колба. Фарфорова чашечка. Скляна кулька. Купрум сульфат ($\omega=3\%$). Натрій гідроксид ($c=0,2$ моль/дм³). Колба К'ельдаля. Концентрована сульфатна кислота ($d=1,84$). Натрій молібдат ($\omega=10\%$). Пергідроль. Метиловий оранжевий ($\omega=0,1\%$). Калій бромід. Розчин хлораміну ($c(1/6)=0,12$ моль/дм³). Калій йодид ($\omega=20\%$). Щавлева кислота ($\omega=8\%$). Натрій тіосульфат ($c(1/2)=0,02$ моль/дм³). Індикатор крохмаль.

1. Виділення суміші Нітрогену водоростей.

Хід роботи. Висушені на повітрі зразки масою 0,5г або сирий матеріал масою 2г, що містить не більше 10мг сумарної кількості Нітрогену, гомогенізують у фарфоровій ступці з 2см³ дистильованої води. До однорідної маси додають 3см³ розчину купрум сульфату ($\omega=3\%$), перемішують і переносять гомогенат у центрифужну пробірку, змиваючи залишок у ступці 8см³ води. Пробірку вміщують у киплячу водяну баню і витримують протягом 3 хвилин при періодичному перемішуванні вмісту пробірки скляною паличкою. Потім пробірку виймають з бані, додають 3см³ розчину натрій гідроксиду ($c=0,2$ моль/дм³), перемішують, дають постояти 10 хвилин і центрифугують. Надосадову рідину переносять у колбу К'ельдаля на 100см³, а осад двічі промивають гарячою водою по 10см³, додаючи до промивної води по 1 краплині розчину купрум сульфату ($\omega=3\%$). Промивні води переносять у колбу К'ельдаля. Осад далі використовують для визначення білкового Нітрогену.

2. Визначення небілкового Нітрогену

Хід роботи. До об'єднаних екстрактів у колбі К'ельдаля додають 2см³ концентрованої сульфатної кислоти ($d=1,84$), 0,3см³ розчину

натрій молібдату ($\omega=10\%$), 4 краплини пергідролю і випарюють до появи піни. Потім зменшують нагрівання так, щоб піна не попала в шийку колби, і продовжують слабе нагрівання до появи білого диму (розкладається сульфатна кислота). Після цього на отвір колби кладуть скляну кульку, збільшують нагрівання і спалюють до повного знебарвлення вмісту колби. До охолодженого залишку в колбі додають 10см^3 дистильованої води, розчин переносять у мірну колбу на 50см^3 , колбу К'ельдаля ополіскують водою, яку теж вносять у мірну колбу. Доводять об'єм у мірній колбі дистильованою водою до 50см^3 , перемішують.

Для визначення Нітрогену відбирають 25см^3 отриманого розчину, переносять у колбу для титрування, додають 1 краплину розчину індикатора метилового оранжевого ($\omega=0,1\%$) і охолоджуючи нейтралізують розчином натрій гідроксиду ($c=2,0$ моль/ дм^3) до переходу забарвлення індикатора в оранжево-жовте. Не слід перетитрувати розчин. Потім додають 10см^3 фосфатного буферного розчину з рН 6,7, що містить калій бромід, 5см^3 розчину хлораміну ($c(1/6)=0,12$ моль/ дм^3). Колбу накривають фарфоровою чашечкою, розчин перемішують круговими рухами і залишають на 25 хвилин. Після цього додають 2см^3 розчину калій йодиду ($\omega=20\%$), 10см^3 розчину щавлевої кислоти ($\omega=8\%$) і йод, що виділився, титрують розчином натрій тіосульфату ($c(1/2)=0,02$ моль/ дм^3) до світло-солом'яного забарвлення розчину, потім додають близько 1см^3 розчину індикатора крохмалю і закінчують титрування до знебарвлення розчину. 1см^3 розчину натрій тіосульфату ($c(1/2)=0,02$ моль/ дм^3), що витрачено на титрування, відповідає $0,09338$ мг Нітрогену.

Всі реактиви, що використовуються в аналізі, повинні бути перевірені на вміст Нітрогену. Для цього ставлять контрольний дослід зі всіма реактивами, проводячи ті ж операції, що і при визначенні Нітрогену, тільки без досліджуваної речовини.

Вміст небілкового Нітрогену розраховують за формулою:

$$X = \frac{V \cdot (a - b) \cdot T \cdot 100}{V_1 \cdot m}, \text{ де}$$

X – вміст небілкового Нітрогену в досліджуваному матеріалі, %;

V – загальний об'єм розчину, отриманого після спалювання екстракту з досліджуваного матеріалу, см³;

V₁ – аліквотний об'єм розчину, взятого для визначення Нітрогену хлорамінним методом, см³;

a – об'єм розчину натрій тіосульфату (с(1/2)=0,02 моль/дм³), витрачений при титруванні контрольного розчину на вміст у реактивах Нітрогену, см³;

b – об'єм розчину натрій тіосульфату (с(1/2)=0,02 моль/дм³) витрачений на титрування досліджуваного розчину, см³;

T – титр робочого розчину натрій тіосульфату (с(1/2)=0,02 моль/дм³) за Нітрогеном, мг/ см³ (T=0,09338 мг/см³);

m – маса взятого для дослідження матеріалу, г.

3. Визначення білкового Нітрогену

Хід роботи. До осаду, що містить білковий Нітроген, додають 5см³ дистильованої води, перемішують і вносять у колбу К'ельдаля на 100см³, змиваючи залишок невеликими порціями води. До вмісту колби додають 0,3см³ розчину концентрованої сульфатної кислоти (d=1,84) і випарюють при невеликому нагріванні до появи піни. Потім охолоджують, додають 4 краплини пергідролу, обережно нагрівають колбу, не допускаючи підняття піни в шийку колби. Як тільки зникне піна і вміст колби закипить, закривають колбу скляною кулькою і спалюють осад до повного знебарвлення вмісту колби. Після спалювання і охолодження у колбу вносять 10см³ дистильованої води. Розчин з колби К'ельдаля кількісно переносять у мірну колбу на 50см³, доводять об'єм водою до риски і перемішують.

Для визначення Нітрогену відбирають з отриманого розчину 10см^3 , вносять у колбу для титрування, додають 1 краплину розчину метилоранжу ($\omega=0,1\%$) і нейтралізують розчином натрій гідроксиду ($c=2,0\text{моль/дм}^3$) до переходу забарвлення індикатора в оранжево-жовте, уникаючи надлишку лугу. Потім додають 10см^3 фосфатного буферного розчину з рН 6,7, що містить калій бромід, 5см^3 хлораміну ($c(1/6)=0,12\text{ моль/дм}^3$) і далі поступають так, як і при визначенні небілкового Нітрогену. Одночасно ставлять контрольний дослід на вміст Нітрогену в реактивах.

Вміст білкового Нітрогену розраховують за формулою:

$$X = \frac{V \cdot (a - b) \cdot T \cdot 100}{V_1 \cdot m}, \text{ де}$$

X – вміст білкового Нітрогену, %;

V – загальний об'єм розчину, отриманого після спалювання осаду, що містить білок, см^3 ;

V_1 – аліквотний об'єм розчину, взятого для визначення Нітрогену хлорамінним методом, см^3 ;

a – об'єм розчину натрій тіосульфату ($c(1/2)=0,02\text{ моль/дм}^3$), витраченого при титруванні контрольного розчину на вміст у реактивах Нітрогену, см^3 ;

b – об'єм розчину натрій тіосульфату, витраченого при титруванні досліджуваного розчину, см^3 ;

T – титр робочого розчину натрій тіосульфату ($c(1/2)=0,02\text{ моль/дм}^3$) за Нітрогеном, мг/ см^3 ($T=0,09338\text{ мг/см}^3$);

m – маса взятого для дослідження матеріалу, г.

Лабораторна робота 9

Виявлення глікопротеїнів у сироватці крові

Принцип методу. Фракціонування білків сироватки крові проводять методом диск-електрофарезу в поліакриламідному гелі. (Дивись

роботу „Визначення фракцій білків сироватки крові методом електрофорезу в поліакриламідному гелі”).

Після проведення електрофорезу гелеві стовпчики використовують далі для виявлення загальної картини фракцій білків (контроль) і виявлення саме глікопротеїнів.

Мета роботи. Виявити у фракціях білків сироватки крові глікопротеїни, поглибити знання про будову і роль цих білків у процесах життєдіяльності.

Обладнання та реактиви. Стівпчик поліакриламідного гелю. Трихлороцтова кислота ($\omega=12,5\%$). Дистильована та проточна вода. Йодна кислота ($\omega=1\%$). Оцтова кислота ($\omega=3\%$). Водяна баня (льодяна). Фуксинсірчиста кислота. Натрій піросульфід $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ($\omega=0,5\%$). Барвник амідосварц 10 В.

Хід роботи. Стівпчик поліакриламідного гелю для виявлення глікопротеїнів фіксують протягом 30хв. у розчині трихлороцтової кислоти ($\omega=12,5\%$), а потім її відмивають спочатку протягом 2 годин проточною, далі протягом 15хв. дистильованою водою, після цього занурюють стівпчик у розчин йодної кислоти ($\omega=1\%$), в розчин оцтової кислоти ($\omega=3\%$) на одну годину. При дії йодної кислоти на вуглеводи розриваються всі зв'язки між сусідніми атомами Карбону, при яких є гідроксильні групи. При цьому утворюються вільні альдегідні групи в перетвореному вуглеводі і мурашина кислота. Цю реакцію проводять при 0°C у льодяній бані. Надлишок реактивів відмивають дистильованою водою, змінюючи її 6 разів через кожні 10хв. Утворені альдегідні групи виявляють свіжоприготованим розчином фуксинсірчистої кислоти, інкубуючи в ньому гелевий стівпчик у темряві протягом 30-40хв. Стівпчик тричі промивають свіжоприготованим розчином натрій піросульфиту $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ($\omega=0,5\%$) і декілька разів водою. Глікопротеїни виявляються у вигляді смужок цегельно-червоного кольору.

У контролі виявляють білки у гелевому стовпчику за допомогою барвника амідосварца 10 В. Оцінюють частку глікопротеїнів у загальній кількості білків сироватки крові, зіставляючи отримані два гелевих стовпчика, а також наявність глікопротеїнів у конкретних білкових фракціях.

Результати виражають у вигляді малюнка електрофореграми.

ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ

ДО РОЗДІЛУ „БІЛКИ Й АМІНОКИСЛОТИ ”

1. Лізин містить 19,17 % Нітрогену. Розрахуйте відносну молекулярну масу лізину, якщо відомо, що в молекулі лізину є два атоми Нітрогену.
2. Білок містить 0,58% триптофану. Яка мінімальна відносна молекулярна маса цього білка?
3. Розрахуйте відносну молекулярну масу білка-ферменту дигідрооротатдегідрогенази, до молекули якої входить 2 атоми Феруму при його вмісті 0,18 %.
4. У 1г білка міститься $2,5 \cdot 10^{-5}$ ммоль кінцевих α -аміногруп. Розрахуйте мінімальну відносну молекулярну масу цього білка.
5. Укажіть напрямок руху (залишаються на старті, рухаються до катода чи анода) наступних пептидів у процесі електрофорезу при рН 6,5:
 - а) ліз-глі-ала-глі; б) ліз-глі-ала-глу; в) гіс-глі-ала-глу;
 - г) глу-глі-ала-глу.
6. При яких значеннях рН найбільш ефективно можна розділити шляхом електрофорезу наступні білкові суміші:
 - а) сироваткового альбуміну і гемоглобіну;
 - б) міоглобіну і хімотрипсिनогену;
 - в) гемоглобіну й уреазі?Значення рІ цих білків наступні: сироваткового альбуміну – 4,9; гемоглобіну – 6,8; міоглобіну – 7,0; хімотрипсिनогену – 9,5; уреазі – 5,0.
7. Складіть схеми перетворень глютамінової кислоти в аспарагінову і аспарагінової кислоти в глютамінову.

8. Як встановлено за допомогою ізотопної мітки, джерелом усіх атомів Нітрогену гемоглобіну є гліцин. Визначіть масу гліцину, яка необхідна для біосинтезу простетичних груп гемоглобіну, що знаходиться у 100 см^3 крові. Вміст пігменту у крові складає 0,077 %.
9. Гемоглобін взаємодіє з киснем з утворенням комплексу, у якому на 4 моль кисню припадає 1 моль гемоглобіну. Скільки молекул гемоглобіну може зв'язати 1 см^3 кисню (н.у.)?
10. У печінці відбувається окиснювальне перетворення глютамінової кислоти, міченої ^{14}C по другому атому Карбону і ^{15}N по аміногрупі. У яких атомах названих метаболітів виявляється кожна з міток:
- а) сечовина; б) сукцинат; в) аргінін; г) цитрулін; д) орнітин; е) аспартат
11. Із запропонованих тверджень визначте правильні:
- а) при утворенні молекул гемоглобіну об'єднання протомерів у мультимер здійснюється шляхом самозбірки;
 - б) молекула гемоглобіну має одну гемінову групу;
 - в) з чотирьох поліпептидних ланцюгів гемоглобіну два абсолютно однакові;
 - г) кожна субодиниця молекули гемоглобіну за своєю третинною структурою схожа на молекулу міоглобіну.
12. Обґрунтуйте твердження:
- а) розташування амінокислот у поліпептидних ланцюгах має закономірний характер;
 - б) для білків характерна надзвичайно висока специфічність первинної структури;
 - в) усі амінокислоти, що зустрічаються у білках і пептидах, належать до L-ряду;

- г) наявність у білкових молекулах інших ковалентних зв'язків, крім пептидних, дуже рідкісне явище.
13. До 1дм^3 розчину гліцину ($c=1,0\text{моль/дм}^3$) в ізоелектричній точці додали $0,3$ моля HCl . Яке буде значення pH розчину при цьому?
14. Розчин L-аланіну об'ємом 400см^3 був доведений до pH $8,0$. Потім у цей розчин був доданий надлишок формальдегіду. Для зворотного титрування отриманого розчину до pH $8,0$ потрібно було 250см^3 розчину натрій гідроксиду ($c=0,2\text{моль/дм}^3$). Яка маса L-аланіну містилася у вихідному розчині?
15. Обґрунтуйте твердження:
- а) вуглеводні простетичні групи глікопротеїнів впливають на розчинність, в'язкість розчинів, заряд і розміри цих білків;
 - б) вуглеводні частини глікопротеїнів виконують функції маркерів у процесах біологічного розпізнавання на рівнях клітина-клітина, клітина-вірус, клітина-молекула, органела-молекула, молекула-молекула;
 - в) донором аміногрупи для аміноцукрів є глутамінова кислота;
 - г) антигени груп крові не містять вуглеводних компонентів.

6. НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ І НУКЛЕОПРОТЕЇНИ

6.1. Загальна характеристика

Усі основні процеси, що стосуються продовження існування живих організмів тваринного й рослинного походження нерозривно пов'язані з нуклеїновими кислотами (НК). НК локалізуються головним чином в ядрах клітин, передусім у хромосомах. Вони побудовані з мономерів – нуклеотидів, які складаються з азотистих основ (пуринів і піримідинів), вуглеводів (пентоз: дезоксирибози у складі ДНК і рибози – у складі РНК) та залишку фосфорної кислоти, що зв'язується п'ятим або третім атомом Карбону пентози. Нуклеотиди сполучаються між собою у полінуклеотидний ланцюг фосфодиефірними зв'язками, утвореними за рахунок гідроксилу залишку фосфорної кислоти одного нуклеотида і гідроксильної групи біля третього атома Карбону залишку дезоксирибози другого нуклеотиду ДНК. Таке чергування згаданих мономерів у ланцюзі ДНК складає її первинну структуру.

У 1953 р. Ф. Крік і Д. Уотсон довели, що молекула ДНК є подвійною спіраллю полінуклеотидних ланцюгів, які закручені навколо однієї осі. Ця спіраль нагадує гвинтові сходи, у яких поручні утворюються залишками дезоксирибози, що сполучаються між собою фосфорноестерними зв'язками за типом 3'-5', а сходинки будуються азотистими основами. При цьому аденін сполучається водневими зв'язками з тиміном, гуанін – з цитозином. Слід зазначити, що між аденіном і тиміном є два, а між гуаніном і цитозином – три водневих зв'язки. Кожен виток спіралі налічує 10 пар мономерів і цей крок дорівнює 3,4 нм (міжнуклеотидна віддаль складає 0,324 нм). Конфігурація спіралі ДНК може бути стиснута або розтягнута і, загалом, виражає вторинну структуру цього біополімеру. Третинна структура створюється орієнтацією в просторі дволанцюгових і кільцевих форм ДНК з утворенням суперспеціалізованих структур для економного ви-

користання життєвого простору. Цьому сприяє комплексація з гісто-
нами та іншими білками, а також з РНК та йонами металів. Тому дов-
жина молекул ДНК однієї з найменших хромосом людини має 3 см, а
ДНК однієї клітини – 2 м. Обсяги ДНК у різних клітинах є відносно
постійними (6,3 – 6,7 пг).

Принцип сполучення нуклеотидів у РНК такий же як і у ДНК: за-
лишок рибози одного мономеру сполучається кисневим мізком із за-
лишком фосфорної кислоти наступного нуклеотиду. Молекула РНК
здатна змінювати свою конфігурацію залежно від умов середовища
(рН, йонної сили розчинника, температури та ін.). У ядрі клітин РНК
складає ~10%, а решта (~90%) знаходиться в цитоплазмі. Різні клітини
можуть мати властиве їм співвідношення між цитоплазматичною і
ядерною РНК. У склад нуклеотидів РНК входять аденін, гуанін і цито-
зин. Її молекули не містять тиміну, а замість нього знаходиться ура-
цил. Але у складі молекул транспортних РНК присутній і тимін поряд
з іншими модифікованими азотистими основами.

Відомо декілька видів РНК. Всі вони безпосередньо залучені в
процес біосинтезу білка. Молекули цитоплазматичної РНК виконують
функції матриць білкового синтезу – матри цеві РНК (мРНК). Другий
вид цитоплазматичної РНК виконує роль структурних компонентів
рибосом – рибосомальні РНК (рРНК). Адапторні молекули транспорт-
них РНК (тРНК) беруть участь у трансляції (перекладі) інформації
мРНК у послідовність амінокислот у білках. У культивуючих клітинах
людини виявлено клас малих ядерних РНК (мяРНК), які безпосе-
редньо не приймають участь у біосинтезі білка, але здатні впливати на
процесінг РНК і загальний стан клітини.

Послідовність рибонуклеотидів у молекулі РНК є комплементар-
ною послідовності дезоксирибонуклеотидів одного із ланцюгів ДНК.

Ензими, які здатні розкладати НК (нуклеази або НКазі), мають
специфічну активність по відношенню до ДНК (дезоксирибонуклеази

або ДНКазі) і до РНК (рибонуклеази або РНКазі). Окремі нуклеази, що здатні відщеплювати нуклеотиди тільки від вільних кінців молекул, називаються екзонуклеазами. Ендонуклеази, що впізнають строго послідовності в ДНК, – це рестриктази. Вони є вагомим інструментом в руках дослідників, які займаються проблемами генної інженерії.

Метаболізм екзогенних НК у тварин і людини розпочинається з катаболізму нуклеопротеїнів їжі у шлунково-кишковому каналі, а після всмоктування окремих компонентів цих складних біополімерів продовжується внутрішньоклітинний синтез *de novo* специфічних для власного організму сполук генетичного пластичного, енергетичного, регуляторного та іншого життєвоважливого призначення.

6.2. Значення нуклеотидів, нуклеозидів, нітрогенвмісних основ у метаболічних процесах

Нуклеотиди, крім того, що є складовими компонентами НК, загалом, ще приймають участь у багатьох біохімічних процесах. Пуринові рибонуклеотиди виконують функції універсальних джерел енергії (АТФ), регуляторних сигналів (циклічних АМФ і ГМФ – цАМФ і цГМФ, відповідно), входять у склад коензимів (ФАД, НАД, НАДФ) і служать переносниками металних груп (S-аденозилметіонін). Піримідинові нуклеотиди функціонують ще також у якості макроергічних інтермедіатів у вуглеводному обміні (УДФ-глюкоза, УДФ-галактоза) і в синтезі ліпідів (ЦДФ-ацилгліцерол).

Гетероциклічні основи (пурини і піримідини) є вихідними структурними елементами молекул нуклеозидів і нуклеотидів. Останні більше поширені у природі, ніж відповідні вільні основи.

Синтетичні аналоги пуринових і піримідинових основ, нуклеозидів і нуклеотидів широко застосовуються у наукових дослідженнях і клінічній ветеринарній та гуманній медицині. Їхнє використання ґрунтується на ролі нуклеотидів як компонентів НК, що визначають такі

життєво важливі функції клітини, як її ріст, розвиток і ділення. Для ділення потрібний етап реплікації ДНК. Це означає, що попередники НК – нормальні пуринові і піримідинові дезоксирибонуклеотиди – мають бути легкодоступними. В онкології хворим вводять препарати аналогів, які викликають такі зміни у структурі гетеро циклу чи вуглеводного залишку молекули, які після влаштування сполуки у відповідні клітинні компоненти обумовлюють виразні цитотоксичні ефекти. Ці ефекти або є результатом інгібування певних ензимів, що необхідні для синтезу НК, або пов'язані зі спотворенням структури ДНК при вбудовуванні аналога.

Пуриновий аналог 4-гідроксипіразолпіримідин (аллопуринол) широко використовується як інгібітор ксантинооксидази і біосинтезу пуринів *de novo*. Він застосовується для лікування гіперурикемії та подагри. Нуклеозиди, які містять у якості вуглеводного компонента арабінозу замість рибози, наприклад цитарабін (арабінозилцитозин Ara-C), добре зарекомендував себе при лікуванні раку і вірусних інфекцій.

6.3. Нуклеопротейни

Нуклеїнові кислоти в живій клітині знаходяться у формі ще більш складніших біополімерів – нуклеопротейдів, тобто у сполучі з білками. Тільки молекули тРНК виявляються переважно вільними у цитоплазмі. Основна маса нуклеопротейнових структур знаходиться у хроматині (дезоксирибонуклеопротейні) і рибосомах (рибонуклеопротейдах).

Організація структури хроматину складна і ще зовсім не вивчена. Стан хроматину змінюється в залежності від клітинного циклу. У фазі спокою (час інтерфази) хроматин є рівномірно розміщеним по всьому об'ємі ядра і не виявляється звичайними мікроскопічними методами, а у фазі поділу клітини він утворює компактні частки (хромосоми), які

можна бачити у звичайному мікроскопі. Біля 63 % маси хроматину складають білки і 30 % - ДНК. Кількість РНК може досягати 10 %. Одну половину всіх білків гістони, а другу – негістонові білки.

Стосовно гістонів слід зазначити, що це є білки з молекулами порівняно невеликих розмірів (молекулярна маса 11000 – 22000). Головною особливістю гістонів є високий вміст лізину і(або) аргініну, що надає їм лужного характеру та здатності взаємодіяти з кислотними групами ДНК. Електронно-мікроскопічні фотографії хроматину показують утворення, які нагадують намистинки, що є нанизаними на нитку. У кожній намистині міститься 8 молекул нуклеосомних гістонів і прилегла до них ДНК довжиною біля 150 нуклеотидних пар (приблизно півтора витка витка довкола гістонів). Описану структуру називають нуклеосоною. В міжнуклеосомних (лінкерних) ділянках до ДНК приєднується молекула гістона H_1 . При такому ущільненні молекула ДНК займає у 7 разів менше місця за довжиною порівняно з витягнутою структурою. Окрім цього гістони захищають ДНК від дії нуклеаз.

Рибосоми еукаріот – це субклітинні частинки з коефіцієнтом седиментації 80S і молекулярною масою 4,5 млн. Вони складаються із двох субодиниць: великої (60S) і малої (40S). За умов зниження концентрації іонів Mg^{2+} у розчині до 0,1 мМ 80S-частка розкладається на субодиниці. Кожна із субодиниць містить РНК і білки. Субодиниці розпадаються на складові частини в розчинах із низьким значенням рН і в присутності детергентів. НК субодиниць виконують зокрема роль каркаса для об'єднання білків у певному порядку. Загалом рибосома функціонує як спеціальне внутрішньоклітинне утворення для синтезу білків.

6.4. Методологічні аспекти проведення полімеразної ланцюгової реакції у лабораторній практиці

На теперішній час найбільшого застосування в лабораторній практиці знаходить полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Для неї характерні висока специфічність, чутливість, універсальність і короткий час дослідження.

Найчастіше ПЛР застосовують для діагностики інфекційних захворювань, що викликаються агентами, які важко піддаються культивуванню, для визначення стійкості мікроорганізмів до антибіотиків, пренатальної діагностики й діагностики спадкових захворювань, тестування донорської крові на вірусні патогени, за різних видів генотипування, визначення батьківства, для виявлення мутацій тощо.

У клінічній діагностиці ПЛР використовують для: ранньої діагностики інфекційних захворювань у серонегативних пацієнтів, коли лікування найбільш ефективне; виявлення персистуючих, латентних і рецидивних форм інфекцій; контролю ефективності лікування; епідеміологічних досліджень; діагностики опортуністичних інфекцій, які часто відбуваються на тлі імунодефіциту, внаслідок чого поставити діагноз тільки за результатами серологічних досліджень важко. ПЛР застосовують санітарно-епідеміологічні органи з метою контролю мікробіологічного забруднення оточуючого середовища й харчових продуктів та для виявлення генетично модифікованих джерел харчування.

Принцип методу ґрунтується на виявленні у матеріалі специфічних фрагментів ДНК (РНК) різноманітних біооб'єктів, їхньому вибіркового синтезі до концентрації, за якої їх легко детектувати, і подальшому визначенні продуктів реакції ампліфікації – ампліконів.

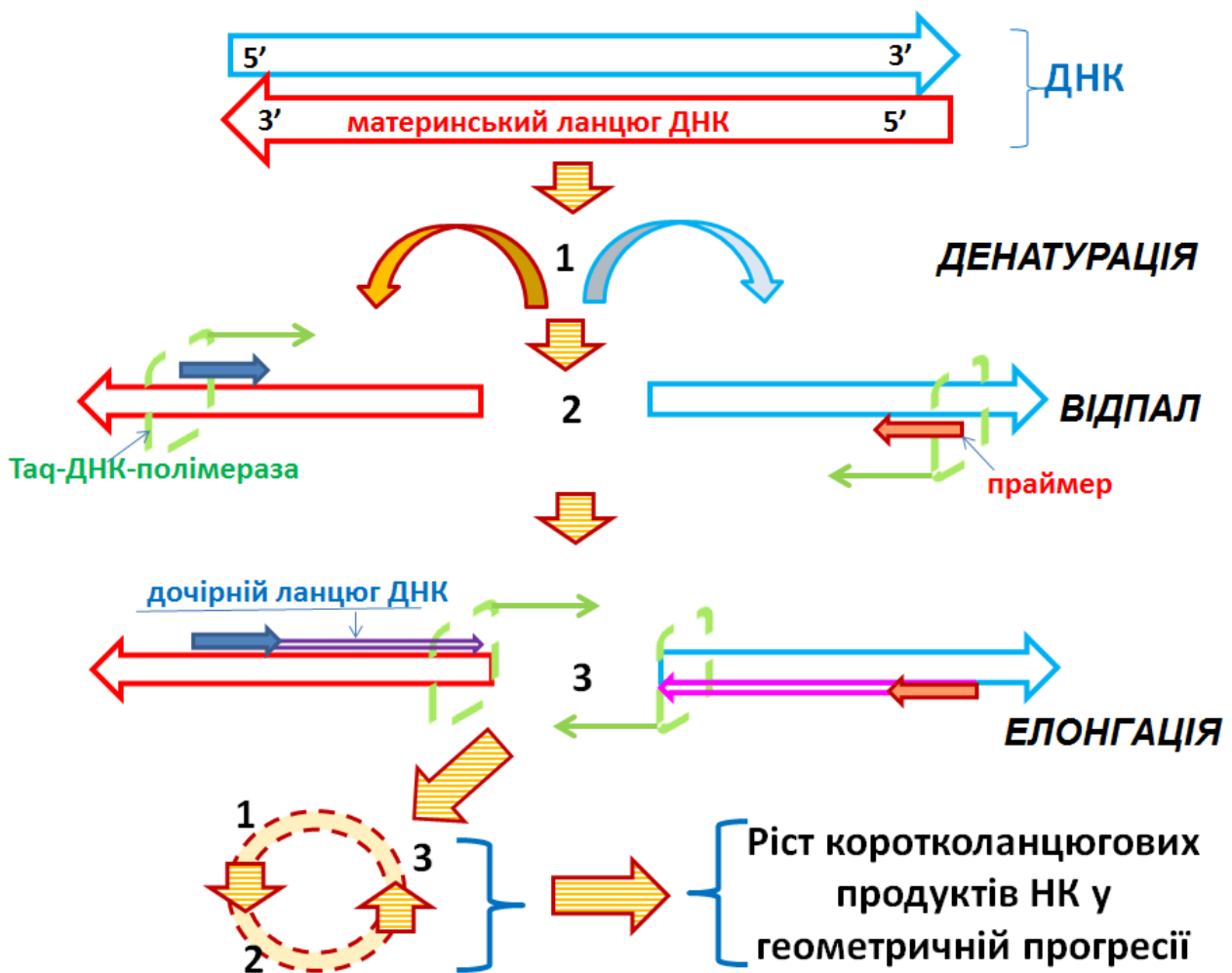
ДНК – унікальний носій генетичної інформації у всіх існуючих на Землі організмів, за винятком РНК-вмісних вірусів. Унікальна властивість ДНК знаходиться в її здатності подвоюватися після розплітання спіралі та розходження ниток ДНК. Подвоювання ДНК (реплікація) здійснюється (за принципом компліментарності) ензимом

– ДНК-полімеразою. Для того, щоб ензим розпочав свою роботу потрібна наявність початкового дволанцюгового фрагмента ДНК. Такий фрагмент утворюється за взаємодії короткого одноланцюгового фрагмента ДНК, що зветься праймером, із комплементарною ділянкою відповідного ланцюга батьківської ДНК. Реплікація відбувається на двох нитках ДНК, але нарощуються вони в протилежних напрямках. У результаті реплікації із однієї дволанцюгової молекули ДНК утворюється дві дволанцюгові, кожна з яких містить один ланцюг від материнської молекули ДНК та другий, дочірній, - новосинтезований. Звідси витікає, що цикл реплікації ДНК включає три основні стадії: 1) розплітання спіралі ДНК і розходження ланцюгів (денатурацію); 2) приєднання праймерів і 3) добудову дочірнього ланцюга ДНК. У ПЛР вказані процеси здійснюються в пробірці в циклічному режимі. Перехід від однієї стадії реакції до іншої досягається зміною температури інкубованої суміші.

Для проведення ПЛР необхідно мати: 1) два синтетичних олігонуклеотидних праймери (довжиною приблизно по 20 нуклеотидів), які комплементарні до ділянок ДНК із протилежних ланцюгів, що фланкують послідовність – мішень (праймери обмежують фрагмент ДНК, який буде мільйони разів скопійований ензимом Taq-ДНК-полімеразою, що приєднується до 3'-кінців праймерів для добудови їх заданої довжини (в декілька сотень пар основ); 2) ДНК-мішень; 3) термостабільну ДНК-полімеразу, яка не губить активності при температурі 95 °С; 4) чотири дезоксирибонуклеотиди і 5) буферну систему для ефективної роботи ДНК-полімерази, що обов'язково містить іони магнію.

З основних етапів проведення ПЛР обов'язково слід виділити три: 1) підготовка проби біоматеріалу, тобто виділення ДНК або РНК; 2) власне полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР-ампліфікація) і 3) де-

текція продукту ПЛР (ампліфікованої нуклеїнової кислоти). Детальніше це подається нижче і на рисунку.



Підготовка проб (виділення ДНК і РНК із біологічного матеріалу). Зразки біооб'єкту спеціально обробляють для перебігу лізису клітин, видалення білкових, полісахаридних і ліпідних компонентів. Для цього використовують різні методи, в тому числі сорбентний, за яким відбувається сорбція ДНК (РНК) на сорбенті після лізису клітин, багатократної відмивки нуклеїнових кислот (НК) і наступної елюції ДНК (РНК) буферним розчином та ін. У результаті такої обробки отримують розчин, який містить ДНК (РНК) досліджуваного об'єкту. Комплект для виділення ДНК (РНК) вибирається в залежності від виду біооб'єкту. Детально методики виділення ДНК (РНК) із біооб'єктів є описані в інструкціях, які додаються виробником до комплекту реа-

гентів для виділення НК. Отриманий розчин ДНК можна зберігати протягом тижня за температури 2 – 8 °С та до року (за температури – 60 °С). Не підлягає зберіганню розчин очищеної РНК. Його необхідно відразу ж використовувати у дослідженнях. Проби можна зберігати тільки у вигляді отриманих з допомогою зворотної транскрипції розчинів комплементарної ДНК (кДНК).

Типова полімеразна ланцюгова реакція. На цьому етапі багатократно повторюють наступні три реакції: денатурації, ренатурації і синтезу.

Перший етап ПЛР – це денатурація зразка ДНК шляхом витримання його при температурі 94-95 °С. Крім ДНК, у реакційній суміші мають бути в надлишку два праймери, термостабільна ДНК-полімераза *Taq* (виділена із *Thermus aquaticus*) і чотири дезоксирибонуклеотиди.

Другий етап ПЛР – ренатурація ДНК, яка відбувається за зниженої температури 50 – 60°С. За ренатурації відбувається відпал праймерів, а саме вони гібридизуються з комплементарними послідовностями ДНК (розплавленої ДНК-матриці) з утворенням коротких дволанцюгових ДНК-фрагментів, які необхідні для початку роботи ензиму полімерази. Кожен із праймерів гібридизується на одному з двох ланцюгів ДНК-матриці таким чином, щоб кінці праймерів, які здатні видовжуватися були спрямовані назустріч один одному. Приєднавшись до протилежних ланцюгів молекули ДНК, праймери обмежують собою ту її ділянку, яка в подальшому буде багатократно подвоєна (ампліфікована). Довжина такого фрагменту, що називається ампліконом, зазвичай складає декілька сотень нуклеотидів.

Третій етап ПЛР – синтез фрагмента комплементарного дочірнього ланцюга ДНК (за 70 – 72 °С, тобто оптимальної температури для активності ДНК-полімерази *Taq*). У якості будівельного матеріалу використовують чотири дезоксинуклеотидтрифосфати, що знаходяться в

суміші. Синтез фрагментів дочірніх ланцюгів ДНК відбувається одночасно на обох ланцюгах материнської ДНК. Далі цикл повторюється знову.

Утворені в першому циклі ампліфікації фрагменти ланцюгів ДНК є матрицями для другого циклу. Фрагменти, що утворилися у перших двох циклах є матрицями для третього і т.д. Таким чином, новостворені фрагменти виступають матрицями для синтезу нових ланцюгів ДНК у наступному циклі ампліфікації, тобто відбувається ланцюгова реакція. Загалом кількість копій фрагмента збільшується в геометричній прогресії і відбувається накопичення ампліконів у розчині за формулою $2 \cdot n$, де n – кількість циклів ампліфікації. Всі реакції проводять у пробірках, що знаходяться в термостаті. Розробка програмованих термостатів (термоциклерів або ампліфікаторів), які за заданою програмою здійснюють циклічну зміну температур, створила передумови для широкого впровадження методу ПЛР у практику лабораторної клінічної діагностики. Зміну температурних режимів і їх підтримку ці прилади виконують автоматично. Тривалість кожного складає кілька хвилин.

Для синтезу праймерів, які є специфічними до певної ДНК-мішені, потрібно знати нуклеотидну послідовність ДНК відповідного патогенного мікроорганізму. Основним критерієм підбору праймерів є комплементарність матриці. В цьому випадку в ході ПЛР буде ампліфікуватися тільки специфічна ділянка ДНК, довжина якої рівна сумарній довжині двох праймерів і фрагмента ДНК між ними. Підбір оптимальної температури, відпал праймерів на матриці – це важливий фактор, який впливає на ефективність і специфічність ампліфікації.

Модифікація методу ПЛР або проведення зворотної транскрипції на матриці РНК. Зворотна транскрипція – це двостадійний процес (що виконується як у двох пробірках, так і в одній без втрати чутливості). За першої стадії отримують на матриці РНК відповідний ланцюг, ком-

плементарної ДНК (кДНК). Наприклад, зворотну транскрипцію використовують для виявлення генетичного матеріалу РНК-вмісних збудників (вірус гепатиту С). Ензим, який синтезує кДНК на матриці РНК, називають зворотною транскриптазою (ревертазою). Під час другої стадії утворена ДНК-копія вірусної РНК ампліфікується.

Детекція продуктів ПЛР–ампліфікації. Існують різні способи детекції реакції ПЛР. Специфічні ПЛР-продукти (амплікони) визначають електрофоретичним розділенням ампліфікаційної суміші в зафарбованому бромистим етидієм агарозному гелі. Бромистий етидій зв'язується з фрагментами дволанцюгової ДНК, які проявляються в гелі у вигляді світлих смуг за УФ-опромінення ($\lambda=290-330$ нм). Для візуалізації таких смуг у гелі за УФ-опромінення використовують спеціальний прилад – транслюмінатор, а отримані результати документують фотографуванням. Фрагменти ДНК розділяються за молекулярною масою в агарозному гелі. Специфічність смуг ампліфікованої ДНК підтверджується їхнім розміщенням стосовно до маркерів молекулярної маси і розміщення фрагмента позитивного контролю ампліфікації. Додаткові докази специфічності амплікона можна одержати методами рестрикційного аналізу, гібридизації і прямого секвенування. До технологій, які є альтернативними способу детекції продуктів ампліфікації, відносять модифіковані системи аналізу з використанням флюорисцентних барвників. При цьому продукти реакції аналізують з допомогою флюориметрії. Пробірки із ампліфикатора надходять в детектор, де, не відкриваючи їх, реєструють флюорисценцію. Рівні флюоресценції виявляються пропорційними кількості утворених специфічних продуктів ПЛР. У таких варіантах аналізу флюоресценцію реєструють після закінчення реакції і тому метод не вважається кількісним. Важливо те, що результати ПЛР фіксують за наявністю флюоресценції в закритих пробірках. Звідси вирішується одна з важливих проблем ПЛР – контамінація ампліконами.

ПЛР в реальному часі. ПЛР у режимі реального часу – це один із сучасних варіантів методу. В основі цього варіанту лежить кількісна детекція флюорисцентного сигналу, який збільшується пропорційно кількості ПЛР продукту. Результат реакції можна реєструвати на екрані монітора комп'ютера безпосередньо в процесі ПЛР-ампліфікації. Для кількісних варіантів досліджень у режимі ПЛР необхідно мати відповідні стандарти, які використовують для побудови калібрувальних кривих після проведення полімеразної ланцюгової реакції.

Використовуючи згадані криві, можна вирахувати невідому вихідну кількість копій ДНК (РНК) у зразках. Із основних переваг ПЛР у реальному часі слід виділити наступні: 1) реєстрація інтенсивності флюоресценції вказує на кількість інфекційного агента в пробі; 2) виключається головна причина лжепозитивних результатів – розсіювання продуктів ампліфікації з аерозолями і персоналом у процесі гель-електрофоретичної детекції; 3) потрібно лише декілька годин для отримання результату (швидкість аналізу); 4) наявність додаткового специфічного зонду (який є комплементарним внутрішній ділянці фрагмента, що ампліфікується) знижує ризик отримання лжепозитивних результатів і збільшує чутливість аналізу; 5) з'являється можливість проводити множинну ПЛР, тобто реєструвати в одній пробірці наявність декількох інфекційних агентів, використовуючи різні флюорисцентні барвники і 6) з'являється можливість ідентифікувати в продукті ампліфікації поодинокі нуклеотидні заміни.

Заслуговують окремої уваги й інші нижче перелічені переваги ПЛР як методу діагностики інфекційних захворювань.

Пряме визначення наявності збудників. Виявлення специфічної ділянки ДНК – збудника методом ПЛР є прямим доказом присутності збудника інфекції. Численні традиційні діагностики, зокрема імуноензимний аналіз, детектують білки-маркери, які є продуктами жит-

тедіяльності інфекційних агентів. А це лише опосередковано свідчить про наявність інфекції.

Висока специфічність. У досліджуваному матеріалі ідентифікують унікальний і цілком характерний тільки для даного збудника фрагмент ДНК. Специфічність задається нуклеотидною послідовністю праймерів, що зводить до мінімуму ризик отримання лжерезультатів на відміну від імунологічних методів аналізу, де часто трапляються помилки у зв'язку з антигенами, що перехресно реагують.

Висока чутливість. ПЛР-аналіз дозволяє виявляти збудників інфекційних захворювань у тих випадках, коли іншими методами (імунологічними, бактеріологічними, мікроскопічними) це зробити вже неможливо. Чутливість ПЛР-аналізу наближається до 10 – 100 клітин у пробі.

Універсальність процедури виявлення різних збудників. Матеріалом для дослідження методом ПЛР є ДНК збудника. Це дозволяє діагностувати декілька збудників в одному зразку. Адже за подібністю хімічного складу всіх НК визначаються уніфіковані методи виділення ДНК/РНК. Для ПЛР-діагностики практично всіх інфекційних захворювань можуть бути використані один набір обладнання, універсальні процедури підготування проб та проведення аналізу.

Висока швидкість отримання результату. Для ПЛР-аналізу не потрібно виділяти збудника з культури. Це значно скорочує час дослідження. Уніфіковані методи виділення НК, автоматизація ампліфікації і детекції продуктів реакції дають можливість проведення повного аналізу протягом одного робочого дня.

Можливість діагностики не тільки гострих, але й латентних інфекцій. Особливе значення метод ПЛР має для діагностики важкокультивованих і персистуючих мікроорганізмів, з якими часто зустрічаються при латентних і хронічних інфекціях. ПЛР-діагностика

є також дуже ефективною по відношенню збудників з високою антигенною мінливістю (наприклад, вірусів грипу).

Обмеження методу ПЛР може бути через те, що, по-перше, ампліфікується ДНК як живих, так неживих мікроорганізмів. Це обумовлює вимоги до інтерпретації і термінів проведення досліджень при контролі ефективності лікування. Контроль необхідно здійснювати через певний проміжок часу, протягом якого відбувається повна елімінація збудника. По-друге, теоретично існує можливість перехресних реакцій (наприклад, у результаті неадекватного підбору праймерів). Це може призвести до появи лжепозитивних результатів.

Взяття клінічного матеріалу

Взяття матеріалу, його попередня обробка, зберігання і перевезення та передача в інші організації здійснюється згідно інструкційно-методичних документів, які регламентують виконання досліджень для кожного виду збудника інфекцій, інструкцій до комплектів реагентів та у відповідності з діючими Санітарними правилами.

З метою запобігання розкладу НК рекомендують використовувати спеціальні транспортні середовища, які розроблені та рекомендовані виробниками комплектів реагентів у залежності від виду матеріалу.

Перевезення і зберігання біоматеріалу необхідно здійснювати за умов холодового ланцюга із забезпеченням контролю встановленого температурного режиму з допомогою термоіндикаторів. У залежності від транспортного середовища, виду біоматеріалу і температурного режиму терміни перевезення і зберігання зразка можуть змінюватися. Зважаючи на можливість розпаду ДНК чи РНК у клінічному матеріалі, терміни зберігання і транспортування його мають бути мінімальними. За умов неможливості доставити зразки в ПЛР-лабораторію протягом необхідного часу їх заморожують (-20 °C). Допускається тільки одноразове короткочасне заморожування-розморожування біоматеріалу.

Кожен біологічний зразок може бути біоматеріалом для ПЛР. Проби крові (плазми) використовують у якісних і кількісних дослідженнях, а проби сироватки крові – тільки для якісного ПЛР-аналізу. З метою виключення контамінації клінічний матеріал необхідно відбирати з допомогою стерильних одноразових інструментів (шприців, відповідних зондів, засобів відбору проб тощо) у одноразові стерильні пластикові контейнери (наприклад, пробірки «Епендорф»). Клінічні зразки потрібно зберігати окремо від реагентів.

Організація праці у ПЛР-лабораторіях

Вимоги до організації праці в ПЛР-лабораторіях узагальнені і сформульовані у нормативних документах і методичних вказівках. У останніх визначаються принципи організації лабораторії та етапи виконання аналізу з використанням ПЛР: відбір проб, первинна обробка, зберігання, умови перевезення, знезаражування біоматеріалу, виділення НК, проведення зворотної транскрипції і/або ампліфікації, облік і реєстрація результатів дослідження біоматеріалу харчових продуктів, матеріалу з навколишнього середовища.

Методичними вказівками регламентуються дії персоналу лабораторій при виконанні досліджень з допомогою методів ампліфікації НК, що проводяться з використанням зареєстрованих у встановленому порядку комплектів реагентів та обладнання.

ПЛР-діагностика інфекцій пов'язана з проблемою (що зумовлена високою чутливістю методу) – можливістю контамінації. Правильна організація ПЛР-лабораторії має принципове значення для отримання вірогідних результатів і суттєво залежить від методу детекції продуктів ампліфікації. За умов використання методу горизонтального електрофорезу, етапу детекції необхідно приділяти особливу увагу, адже він є основним джерелом контамінації. Приміщення для електрофорезу має бути розміщене в такому місці, що виключає попадання ампліконів в інші технологічні зони лабораторії. Окрім цього потріб-

ний окремих співробітників, ретельно продумана система вентиляції, відсутність можливості переміщення пробірок, штативів та іншого обладнання із кімнати для електрофорезу в інші приміщення.

Співробітник, що займається ПЛР-діагностикою, у своїй роботі зустрічається з двома видами контамінації: 1) перехресної контамінації від проби до проби (наприклад, в процесі обробки клінічних зразків), що веде до появи спорадичних лжепозитивних результатів і 2) контамінація продуктами ампліфікації (ампліконами), яка має найбільше значення, адже в процесі ПЛР амплікони накопичуються у великих кількостях і служать ідеальними продуктами для реампліфікації.

До появи систематичних лжепозитивних результатів призводить контамінація слідовими кількостями ампліконів посуду, автоматичних піпеток, лабораторного обладнання, поверхонь лабораторних столів і навіть поверхні шкіри співробітників лабораторії.

Зазвичай визначити джерело контамінації буває дуже важко, а сам процес її ліквідації потребує значних витрат часу та засобів. Дотримання вимог, що ставляться до планування приміщень ПЛР-лабораторій і проведення самих аналізів, виключає можливість контамінації та отримання лжепозитивних результатів. У кожному приміщенні ПЛР-лабораторії має бути достатній набір реагентів, автоматичних піпеток, наконечників, пластикової і скляної посуду, лабораторного обладнання, халатів і рукавиць, що використовуються тільки в даному приміщенні і не виносяться в інші. Обладнання, матеріали та інвентар у кожній кімнаті відповідним чином маркуються.

За умов досліджень з використанням ампліфікації нуклеїнових кислот обов'язкове забезпечення потоковості руху матеріалу, проб НК, продуктів ампліфікації. Робота в лабораторії має бути організована тільки в одному напрямку від пре-ПЛР-приміщень до пост-ПЛР-приміщень.

У ПЛР-лабораторіях, що використовуються з діагностичною метою, здійснюють регулярний внутрішньолабораторний контроль якості досліджень з періодичністю, яка залежить від обсягу роботи і визначеної керівником лабораторії, але не менше одного разу на квартал.

Лабораторія має брати участь у встановленому порядку в заходах (програмах) по зовнішній оцінці якості лабораторних досліджень за конкретними нозологічними формами не менше одного разу на рік.

Внутрішньолабораторний і зовнішній контроль якості лабораторних досліджень здійснюють шляхом аналізу шифрованих атестованих контрольних панелей, які містять позитивні й негативні проби. Під час внутрішньолабораторного контролю якості використовують атестовані на наявність аналізу (його кількості) панелі виробників комерційних наборів або внутрішньолабораторні атестовані зразки, що містять і не містять НК конкретних збудників у різній концентрації, стабільні умови зберігання. Варто зазначити, що широке використання ДНК-діагностики ні в якій мірі не відмінює методи імунохімічних та інших біохімічних досліджень, а, навпаки, доповнює їх. Комплексне дослідження організму різними методами дає лікарю-клініцисту більшу інформацію як про наявність інфекційного агента, так і про імунний статус, що дозволяє точніше ставити діагноз, назначати відповідне етіотропне лікування і вести його подальший контрольний процес.

Отже, наведено всебічну методологічну оцінку умов проведення найбільш поширеного в лабораторній практиці сучасного молекулярно-біологічного методу – полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Особлива увага звертається на чітке і обов'язкове дотримання всіх вимог і правил проведення ПЛР, включаючи етапи підготовки біоматеріалу до дослідження, типової ПЛР-ампліфікації (денатурації, ренатурації і синтезу), отримання на матриці РНК комплементарної ДНК з

допомогою ревертази та остаточної детекції продуктів ПЛР-ампліфікації. У цьому аспекті серед варіантів методу полімеразної ланцюгової реакції виділяється ПЛР в реальному часі, в основі якого лежить кількісна детекція утвореного ПЛР-продукту. Всі діагностичні переваги ПЛР-аналізу (пряме визначення наявності збудників, висока специфічність, висока чутливість, універсальність та ін.) досягаються тільки за умов бездоганної чистоти обладнання і засобів у приміщеннях лабораторії, чіткої організації праці та професіоналізму співробітників.

Висновки

1. Найбільш поширений в лабораторній практиці молекулярно-біологічний метод – полімеразна ланцюгова реакція при використанні потребує обов'язкового дотримання всіх вимог і правил проведення ПЛР.
2. Для уникнення одержання лжепозитивних результатів необхідно регулярно (щоквартально) проводити внутрішньолабораторний контроль, а зовнішню оцінку якості роботи ПЛР-лабораторії – не менше одного разу на рік.
3. Широке використання методу ДНК-діагностики ні в якому разі не відмінює імунохімічні, цитологічні, біохімічні та інші методи досліджень, а, навпаки, доповнює їх.

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Нуклеїнові кислоти та нуклеопротейни

Лабораторна робота 1

Виділення нуклеопротейнів з печінки та дослідження їх хімічного складу

1. Виділення дезоксирибонуклеопротейну

Принцип методу. Характерною особливістю ядерних білків є їх здатність утворювати дуже в'язкі розчини в концентрованих розчинах солей і нерозчинність у розведених сольових розчинах.

При осадженні із сольових розчинів ядерні білки випадають у вигляді ниток.

Мета роботи. Навчитись виділяти дезоксирибонуклеопротейни з біологічного матеріалу.

Обладнання та реактиви. Центрифуга. Центрифужні пробірки. Фарфорова ступка. Печінка риби. Кварцовий пісок. Натрій хлорид ($c=2,0$ моль/дм³).

Хід роботи. Печінку риби масою 2-3г розтирають у фарфоровій ступці з рівною кількістю кварцового піску, додають спочатку 5см³ охолодженого розчину натрій хлориду ($c=2,0$ моль/дм³). Розтирання продовжують ще 10-15хв. у ступці, яку охолоджують льодом. Гомогенат переносять у центрифужні пробірки і центрифугують 15хв. при 300 об/хв. Вимірюють об'єм центрифугату, вливають його в шестикратний об'єм води тонким струменем, повільно розмішуючи рідину дерев'яною паличкою.

Якщо нитки нуклеопротейну не утворилися, а виявився пластівчастий осад, то потрібно дати відстоятися осад, обережно злити з нього всю прозору рідину, а залишок центрифугувати. Осад після цен-

трифугування досліджується на вміст складових частин нуклеопротеїну.

2. Гідроліз нуклеопротеїну

Принцип методу. При кип'ятінні нуклеопротеїнів з розведеною кислотою вони розщеплюються на білок і нуклеїнову кислоту, яка розпадається на окремі мононуклеотиди, а потім відщеплюються пуринові основи (аденін і гуанін) і фосфатна кислота. Білок при цьому частково гідролізується до низькомолекулярних пептидів і амінокислот. У гідролізаті визначають білок, пуринові основи, пентози і фосфатну кислоту. Піримідинові нуклеотиди за цих умов не гідролізуються.

Мета роботи. Навчитись проводити гідроліз нуклеопротеїну.

Обладнання та реактиви. Колбочка для гідролізу. Корок із зворотним холодильником. Фільтр. Сульфатна кислота ($\omega=5\%$).

Хід роботи. Осад нуклеопротеїну переносять у колбочку для гідролізу і додають 15см³ розчину сульфатної кислоти ($\omega=5\%$). Колбочку закривають корком із зворотним холодильником і проводять гідроліз при слабкому кипінні вмісту колбочки протягом одної години. Після охолодження гідролізат фільтрують і використовують для аналізу продуктів гідролізу.

3. Виявлення ДНК у дезоксирибонуклеопротеїні

Принцип методу. До складу нуклеотидів ДНК входить дезоксирибоза, яку можна виявити за реакцією з діфеніламіном. При взаємодії дезоксирибози з діфеніламіном утворюється продукт, який має синє забарвлення. Рибоза і РНК з діфеніламіном дають зелене забарвлення.

Мета роботи. Навчитись виявляти ДНК в дезоксирибонуклеопротеїнах.

Обладнання та реактиви. Пробірки. Водяна баня. Натрій гідроксид ($\omega=0,4\%$). Діфеніламіновий реактив.

Хід роботи. Небагато осаду дезоксирибонуклеопроїєну переносять у пробірку і розчиняють в 1см^3 натрій гідроксиду ($\omega=0,4\%$). Додають рівний об'єм діфеніламінового реактиву і ставлять у киплячу водяну баню на 15-20хв. Спостерігається синє забарвлення.

4. Виявлення пентоз

Принцип методу. Рибоза і дексирибоза є альдопентозами. Будь-які альдозы можна виявити реактивом Фелінга – лужний розчин комплексної сполуки Купруму і солі винної кислоти.

При нагріванні альдоз з реактивом Фелінга Cu^{2+} при цьому відновлюється до Cu^+ . Утворюється CuOH жовтого кольору чи Cu_2O червоного кольору.

Мета роботи. Навчитися виявляти пентози у розчині, який досліджується.

Обладнання та реактиви. Пробірки. Нагрівальні прилади. Розчин лугу. Реактив Фелінга.

Хід роботи. У пробірку вносять $0,5\text{-}1\text{см}^3$ гідролізату, нейтралізують розчином лугу, додають рівний об'єм реактиву Фелінга, перемішують і нагрівають майже до кипіння. Спостерігають зміну забарвлення вмісту пробірки з яскраво-синього у жовте або червоне.

5. Виявлення пуринових основ

Принцип методу. Сутність реакції зводиться до утворення срібних солей пуринових основ, які випадають в осад.

Мета роботи. Навчитися виявляти пуринові основи у розчині, який досліджується.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Розчин $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$ (до розчину аргентум нітрату ($\omega=1\%$) краплинами додають розчин амоніаку ($\omega=5\%$). Спочатку з'являється бурий осад. При подальшому додаванні при струшуванні розчину амоніаку осад розчиняється. Розчин абсолютно прозорий і безбарвний). Гідролізат нуклеопроїєну. Концентрований розчин амоніаку.

Хід роботи. У пробірку вносять 2см^3 гідролізату нуклеопроїїну, додають декілька крапель концентрованого розчину амоніаку до лужної реакції, потім вносять $0,5\text{см}^3$ розчину аргентум амоніаку $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{OH}$. Утворюється бурій пластинчастий осад срібних солей пуринових основ.

6. Визначення у гідролізаті фосфатної кислоти

Принцип методу. При реакції гідролізату з амоній молібдатом у сульфатній кислоті та аскорбінової кислоти розчин забарвлюється у синій колір завдяки утворенню фосфорномолібденової сині.

Мета роботи. Навчитися виявляти фосфатну кислоту у розчині, який досліджується.

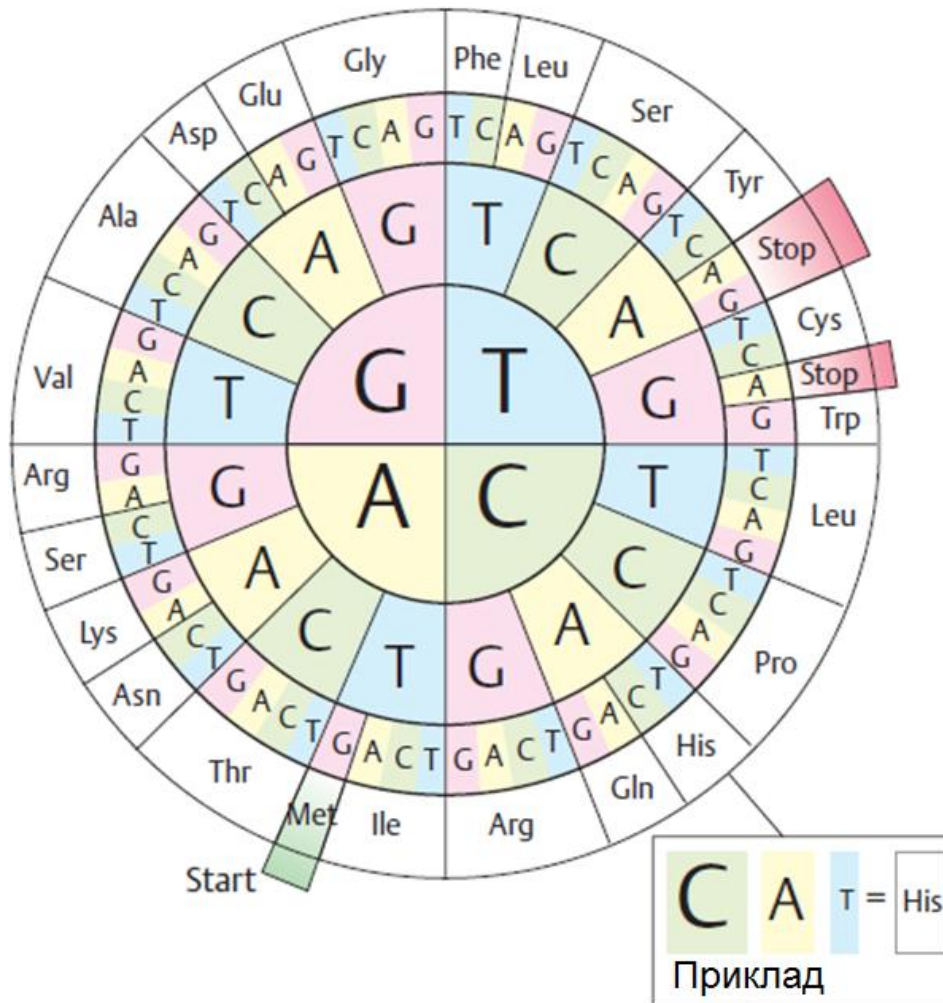
Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Гідролізат нуклеопроїїну. Розчин амоній молібдату ($\omega=2,5\%$) у сульфатній кислоті ($c=5,0\text{моль/дм}^3$). Свіжовиготовлений розчин аскорбінової кислоти ($\omega=0,4\%$).

Хід роботи. У пробірку вносять 2см^3 гідролізату нуклеопроїїну, додають 3см^3 розчину амоній молібдату ($\omega=2,5\%$) у сульфатній кислоті ($c=5,0\text{ моль/дм}^3$) і 1см^3 свіжоприготованого розчину аскорбінової кислоти ($\omega=0,4\%$). Суміш перемішують і нагрівають до $40-50^\circ\text{C}$. Розвивається забарвлення фосфорномолібденової сині.

ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ І НУКЛЕОПРОТЕЇНИ”

1. Яке біологічне значення нуклеопротеїнів у організмі тварин та людини?
2. Чим структура ДНК відрізняється від структури РНК?
3. Яке з наведених захворювань пов'язано з патологією обміну нуклеїнових кислот? а) рахіт; б) подагра; в) скорбут; г) цукровий діабет; д) остеопороз.

Генетичний код (адаптовано за Кольман Я. Наглядная биохимия. 3-е изд.: Пер. с нем. / Я. Кольман, К.-Г. Рем– Москва: Мир, 2009. – 469 с)



4. Якими гормонами стимулюється синтез нуклеїнових кислот?

5. Що відбувається з про-мРНК під час сплайсингу (“дозрівання” РНК)?
6. Ділянка ДНК 5’ААААТТТЦГЦЦАТАЗ’ транскрибується в яку послідовність мРНК?
7. Якою має бути послідовність амінокислот в олігопептиді, якщо він синтезований з ділянки РНК 5’АУГАУАЦГАЦАЦЗ’?
8. Яка амінокислота кодується триплетом ААА?
9. Який код для метіоніну (Met)?
10. Де в організмі ссавців переважно “знешкоджуються” пуринові і піримідинові основи?

7. ФЕРМЕНТИ

7.1. Загальна характеристика ферментів

Ферменти (ензими) – біологічні каталізатори білкової природи, які синтезуються у живих клітинах і здатні прискорювати хімічні процеси в організмі. За хімічною природою всі ферменти відносяться до білків. Ферменти можуть бути простими і складними білками. Ферменти–складні білки складаються з поліпептидних ланцюгів і небілкової частини – простетичної групи або коферменту. Деякі ферменти спочатку перебувають в неактивному стані і тільки після дії активаторів стають активними.

Біосинтез молекул ферментів відбувається у кожній клітині, тканині, органі і складається з тих же етапів, що і біосинтез інших білків. Біосинтез ферментів в організмі відбувається безперервно. Окремі органи синтезують значну кількість ферментів, які каталізують багато реакцій у організмі. Це, в першу чергу, залози (слинні, кишкові, шлункові, підшлункові та ін.). Для ферментів характерна певна клітинна локалізація. Так, в ядрі в основному зосереджені ферменти, що беруть участь в обміні нуклеїнових кислот; в ядерній мембрані – ферменти, що беруть участь у транспортуванні окремих сполук і енергії; ферменти клітинного дихання розміщені переважно у мітохондріях; лізосоми містять ферменти, що каталізують, в основному, розщеплення багатьох речовин; ферменти біосинтезу білка локалізуються в рибосомах.

Ферменти мають відносну молекулярну масу від десятків до декількох тисяч кДа. Більш ніж 400 ферментів отримано у кристалічному стані. Всі вони амфотерні і мають високу хімічну активність. Температурний оптимум дії більшості ферментів знаходиться у межах 37-40°C. При деякому підвищенні температури середовища відбувається прискорення реакції внаслідок підвищення енергії активації молекул субстрату. Разом з тим навіть невелике підвищення темпера-

тури викликає послаблення зв'язків, які підтримують конформацію молекули ферменту, що необхідна для проявлення його каталітичної активності. Поступово починається денатурація ферменту, яка різко прогресує при температурі, що перевищує 50°C. Інактивація ферменту при підвищенні температури є необоротною. Зі зниженням температури швидкість ферментативних реакцій поступово зменшується і при 0°C завмирає. Але денатурації ферменту при цьому не відбувається і при поступовому підвищенні температури до оптимальних значень їх активність відновлюється. Особлива чутливість ферментів до температури є однією з властивостей, що якісно відрізняють ці біокаталізатори від неорганічних каталізаторів.

Активність ферменту змінюється у залежності від величини рН. Для дії різних ферментів рН-оптимум різний. Зазвичай ферментативну дію має не вся поверхня молекули, а її невелика ділянка. Просторове розташування цієї ділянки є дуже важливим для дії ферменту. Зміна електричного заряду молекули ферменту-білка, яке відбувається під впливом рН і пов'язане зі зміною ступеня дисоціації дисоціюючих груп білка, призводить до зміни структури просторового розташування поліпептидного ланцюга. Зі зміною дисоціації деякі групи ланцюга наближаються одне до одного, а деякі віддаляються. Ці зміни просторового розташування активних ділянок молекули ферменту під впливом рН призводять до зміни швидкості ферментативної дії. При дуже високих і дуже низьких значеннях рН ферменти денатурують.

Кожен фермент діє на певний субстрат або групу речовин схожих за своєю будовою. Специфічність дії ферментів пояснюється збігом просторових конфігурацій активного центру ферменту і субстрату, їх хімічною спорідненістю, що забезпечує утворення фермент-субстратного комплексу і здійснення каталітичного процесу. Без специфічності ферментів був би неможливий впорядкований ланцюг реакцій обміну речовин.

Розрізняють групову (абсолютну і відносну) і індивідуальну (абсолютну і стереохімічну) специфічність ферментів. Дія пепсину на білки тваринного, рослинного, мікробного походження є прикладом абсолютної групової специфічності. Абсолютну специфічність проявляє уреаза, яка каталізує гідроліз сечовини до амоніаку і вуглекислого газу. Прикладом стереохімічної специфічності може бути фермент фумаратгідратаза, яка каталізує приєднання води до фумарової кислоти (транс-ізомер), але не впливає на малеїнову кислоту (цис-ізомер).

Речовини, які підвищують активність ферментів, називаються активаторами, а ті, що пригнічують – інгібіторами або паралізаторами. Активатори, приєднуючись до молекули неактивного ферменту, здатні змінювати її конформацію з утворенням сполуки, що має каталітичну активність. Пригнічувальна дія інгібіторів реалізується шляхом зміни нативної конформації ферменту. Місце прикріплення активатора або інгібітора до молекули ферменту називається алостеричним центром. Нерідко одні і ті ж речовини для одних ферментів є активаторами, а для інших-паралізаторами. Активність ферменту зменшується по мірі збільшення концентрації продуктів, що утворюються у результаті хімічних реакцій, які каталізуються даним ферментом.

Розрізняють специфічні та неспецифічні активатори й інгібітори. Типовими специфічними активаторами є, наприклад, жовчні кислоти, які активують ліпази. Багато лікарських речовин є специфічними інгібіторами. Вони з'єднуються з ферментами мікроорганізмів і блокують їх.

До неспецифічних активаторів відносяться різні неорганічні катіони, у меншій мірі – аніони: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- та ін. Деякі йони для одних ферментів є активаторами, а для інших – інгібіторами. В активації або інгібуванні ферменту можуть брати участь один бо декілька видів йонів.

До неспецифічних інгібіторів відносяться ферментні отрути (ціаніди), йони важких металів, алкалоїдні речовини, азиди, сульфідні і ін. Інгібітори взаємодіють з активними центрами молекули ферменту, інактивуючи функціональні групи білків. Високі концентрації інгібіторів руйнують четвертинну і третинну структуру молекули ферменту, викликають його денатурацію.

Ефективність ферментативної реакції залежить не тільки від вказаних вище чинників, але й від активності самого ензиму, яку найчастіше визначають за допомогою відносної швидкості перетворення: субстрат \rightarrow продукт

Серед одиниць активності фермента розрізняють:

1 одиниця активності фермента – це кількість ензиму білкової природи, яка перетворює 1 мкмоль субстрату за 1 хв при 25°C і оптимальному рН

1 одиниця специфічної активності фермента – число одиниць активності фермента на мг даного протеїну (наприклад, 37 мкмоль/хв/мг протеїну)

1 одиниця молекулярної активності фермента – число одиниць на мкмоль очищеного ензиму (наприклад, 12 одиниць/мкмоль ензиму)

В ензимології поряд з одиницями активності фермента використовуються такі терміни, як катал і міжнародна одиниця активності.

Катал (кат) відповідає кількості каталізатора, який може перетворити 1 моль субстрату в продукт за 1 секунду (с^{-1}).

Міжнародна одиниця активності фермента (МО) = (Кількість фермента, який каталізує перетворення 1 мкмоль субстрату) / хв

Міжнародну одиницю езимної активності фермента (МО або англ. – IU – international unit) можна перетворювати у катал за допомогою таких рівнянь, як:

$$1 \text{ кат} = 1 \text{ моль субстрату} \cdot \text{с}^{-1} = 60 \text{ моль} \cdot \text{хв}^{-1} = 60 \cdot 10^6 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ МО}$$

$$1 \text{ МО} = 1 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} = (1/60) \text{ мкмоль} \cdot \text{с}^{-1} = (1/60) \text{ мккат} = 16,67 \text{ нкат}$$

У біохімічних дослідженнях поряд із вказаними вище активностями ензимів часто використовують питому і молярну активність ферментів та число обертів, які означають:

$$\text{Питома активність} = (\text{Число каталів}) / (\text{кількість активного білка, мг})$$

$$\text{Молярна активність} = (\text{Число каталів}) / (\text{число моль фермента})$$

$$\text{Число обертів} = (\text{Число моль перетвореного субстрату}) / \text{хв}$$

7.2. Класифікація ферментів та характеристика окремих ензимів

Міжнародною спільною біохімії і молекулярної біології (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) розроблена номенклатура для ензимів (класифікація ферментів або КФ, або “ЕС” – англійською від “*Enzyme Classification*”). Оскільки кожен клас містить підкласи і підпідкласи відповідно, то фермент описується сукупністю чотирьох чисел, розділених крапками. Наприклад, алкоголь-дегідрогеназа має КФ 1.1.1.27.

Перше число представляє клас ензиму, який базується на механізмі реакції. Розрізняють шість класів ензимів:

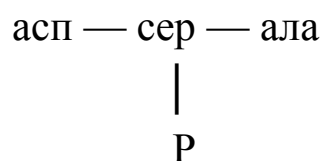
- Оксидоредуктази (каталізують реакції окиснення/відновлення)
- Трансферази (переносять функціональні групи, наприклад, метильну чи фосфатну групу)
- Гідролази (каталізують гідроліз різних зв'язків у присутності молекул води)
- Ліази (розрізають різні зв'язки, відмінні від таких як при гідролізі та окисненні; або ж ензими задіяні в реакціях сполук, за яких подвійні зв'язки утворюються чи навпаки)
- Ізомерази (каталізують ізомеризацію в межах однієї молекули)
- Лігази (об'єднують дві молекули з ковалентними зв'язками за рахунок енергії АТФ чи інших НТФ).

Одними з найпоширеніших гідролітичних ензимів є фосфатази. Фосфатази – ферменти, що каталізують гідроліз естерів фосфатної кислоти. Залежно від рН, при якому проявляється їх найбільша активність, розрізняють кислу та лужну фосфатази. Вони надходять у кров з кісткової тканини, печінки, нирок, селезінки. Лужна фосфатаза проявляє максимальну активність при рН 9,5; кисла – при рН 4,8.

Кислі і лужні фосфатази являють собою неспецифічні ферменти, які здатні розщеплювати велику кількість естерів фосфатної кислоти. Інші ж фосфатази, наприклад глюкозо-6-фосфатаза і фруктозо-1,6-дифосфатаза, проявляють вибіркову специфічність за відношенням до якогось одного субстрату. Функція неспецифічних фосфатаз не зовсім зрозуміла. Фосфатази, які беруть участь у біосинтетичних реакціях, характеризуються високим ступенем субстратної специфічності, чим суттєво відрізняються від неспецифічних фосфатаз, які беруть участь у перетравлюванні їжі.

Лужні фосфатази знайдені в бактеріях, грибах та тканинах тварин, але не у вищих рослин. Лужна фосфатаза виявлена в епітелії ниркових каналців, в клітинах кишкового епітелію, в печінці, в остеоцитах і остеобластах. Цей фермент майже повністю відсутній в еритроцитах, в м'язах і інших тканинах, які не беруть активної участі в транспорті поживних речовин. Існує теорія, згідно якої цей фермент забезпечує утворення неорганічного фосфату там, де в ньому виникає потреба.

У лужних фосфатазах тварин фосфат приєднується до залишку серину в поліпептидному ланцюзі ферменту у такій послідовності амінокислот:



Для діяльності ферменту потрібні йони Zn^{2+} і йони Mg^{2+} , які є алостеричними активаторами.

Кислі фосфатази інгібуються фторид-іоном. Вони зустрічаються в тканинах як рослин, так і тварин.

Фосфатази беруть участь у синтезі глікогену в печінці. При високих концентраціях глюкоза зв'язує фосфорилазу а і активує фосфатазу фосфорилази а, що призводить до утворення фосфорилази б і зупинки глікогенолізу. Коли рівні фосфорилази а знижуються, знімається інгібування фосфатази глікогенсинтетази і синтез глікогену з глюкози зростає завдяки підвищенню вмісту глікогенсинтетази-І.

Активність фосфатази глікогенсинтетази-Д, що каталізує перетворення синтетази-Д в синтетазу-І, стимулюється інсуліном. В результаті цього забезпечується утворення глікогену в умовах підвищеної внутрішньоклітинної концентрації глюкозо-6-фосфату.

Кишкові фосфатази беруть участь у гідролітичному відщепленні фосфату від нуклеотидів. Їх ще називають нуклеотидазами. Специфічна кишкова фосфатаза розщеплює аденозин-5'-фосфат на аденозин і неорганічний фосфат, але не діє на ізомерні аденозин-3'-фосфат і аденозин-2'-фосфат.

Активність фосфатаз у плазмі крові може бути показником деяких патологічних станів організму. При багатьох захворюваннях кісткової тканини помітно збільшується активність лужної фосфатази. Рівень цього ферменту сильно підвищується тоді, коли відбувається швидка регенерація кісток. Високий рівень лужної фосфатази спостерігається при закупорці протоків печінки.

Оскільки лужна фосфатаза є й у жовчі і надходить у плазму крові, як і ферменти з остеобластів, підвищення активності цього ферменту в плазмі крові може свідчити про підвищену активність остеобластів або клітин паренхіми печінки. Захворювання печінки супроводжуються надлишковим синтезом лужної фосфатази в ній.

Дослідження, проведені на *Salmo gairdnerii* показали, що активність лужної фосфатази в різних органах риби під час голодування змінюється. В нирках і тонкому кишечнику спостерігається різке зниження активності на початку голодування. Активність лужної фосфатази у всіх органах підвищується при відновленні харчування.

Холінестерази. Є два типи холінестераз: істинна холінестераза і псевдохолінестераза.

Істинна холінестераза за систематичною номенклатурою має назву ацетилхолінгідролаза (КФ 3.1.1.7) і тривіальну назву ацетилхолінестераза (АХЕ). Ацетилхолінестераза специфічна за відношенням до ацетилхоліну. Каталізує реакцію гідролітичного розщеплення естерного зв'язку в ацетилхоліні:

Псевдохолінестераза має більш широку субстратну специфічність, каталізує гідроліз не тільки ацетилхоліну, але й інших субстратів, зокрема бутирилхоліну. За систематичною номенклатурою цей фермент має назву ацетилхолін-ацилгідролаза (КФ 3.1.1.8) і робочу назву – холінестераза (ХЕ). АХЕ і ХЕ відрізняються одна від іншої за багатьма властивостями.

Під дією АХЕ швидкість розщеплення естерів холіну різко зменшується із збільшенням довжини ацильного ланцюга. Так, АХЕ каталізує гідроліз бутирилхоліну із швидкістю, що складає тільки 1-2% швидкості гідролізу ацетилхоліну. Навпаки, ХЕ каталізує гідроліз бутирилхоліну вдвічі швидше, ніж ацетилхоліну.

АХЕ зустрічається переважно в мозку, еритроцитах, м'язах, нервах. ХЕ в основному міститься в печінці, підшлунковій залозі і сироватці крові. Можливо, що постійна наявність надзвичайно активної ХЕ у плазмі крові є захисним пристосуванням і попереджає поширення в тканинах токсичного у великих кількостях ацетилхоліну при його попаданні в кров'яне русло. Разом з тим відомо, що повне пригнічення активності ХЕ плазми крові сумісне з життям. В невеликих кількостях

ХЕ міститься і в центральній нервовій системі. Вважають, що роль ХЕ нервової системи полягає у захисті АХЕ від негативної дії таких естерів холіну, які практично не розщеплюються АХЕ, але можуть утворюватися в організмі (пропіонілхолін, бутирилхолін, валерілхолін і ін.), а ХЕ їх руйнує. Можливо також, що в окремих частинах мозку можуть виникати ненормально високі концентрації ацетилхоліну, надлишок якого гальмує АХЕ, але не впливає на активність ХЕ.

Активність холінестерази у різних організмів має широкі межі. При патологічних станах активність ХЕ знижується. Чітке зниження активності цього ферменту відмічається при захворюваннях печінки, гіпотиреозі, ураженнях міокарду, травматичному шоку.

Трансферази. Креатинкіназа (КФ 2.7.3.2.) відноситься до другого класу ферментів -трансфераз, підклас фосфотрансфераз. Каталізує реакцію:



У скелетних м'язах хребетних тварин є високоенергетична речовина фосфокреатин, вміст якого в 4-5 разів перевищує вміст АТФ.

Високоенергетична фосфорильна група фосфокреатину під дією креатинкінази легко передається АДФ. При рН 6,0, що має місце в саркоплазмі, рівновага реакції зміщена в бік утворення АТФ. Вміст фосфокреатину зменшується, а АТФ збільшується. При одноразовому скороченні м'язу вміст АТФ в ньому не зменшується. Кінцева фосфорильна група АТФ, яка відщеплюється при скороченні м'язу, негайно знову приєднується до АДФ від фосфокреатину. Якщо стимулювати м'яз протягом значного часу при відсутності гліколізу чи дихання, які забезпечують поповнення АТФ, то запас фосфокреатину буде зменшуватися і тільки після цього повинно спостерігатися зниження вмісту АТФ, м'яз припиняє роботу, впадаючи у стан контрактури. Хоча всі м'язи хребетних характеризуються як гліколітичною, так і дихальною активністю, відносні частки гліколізу і дихання в різних м'язах неод-

накові. У високоактивних, або червоних, м'язах, колір яких зумовлений високим вмістом міоглобіну і цитохромів, головним джерелом енергії для фосфорилування АДФ в АТФ є дихання - через окиснювальне фосфорилування в мітохондріях. До таких м'язів належать літальні м'язи птахів і м'язи кінцівок ссавців. У відносно малоактивних, або білих, скелетних м'язах, які містять мало міоглобіну і цитохромів, головним джерелом енергії для фосфорилування АДФ в АТФ є гліколіз навіть тоді, коли такі м'язи добре забезпечені киснем. У залежності від активності м'язів субстратами окиснення у процесах окиснювального фосфорилування можуть бути різні речовини. У ссавців в м'язах, що перебувають у стані спокою, енергія для активації фосфату звільняється при окисненні головним чином жирних кислот і ацетоацетату (печінка); при цьому мало використовується глюкоза з крові. Але при максимальній активності джерелом стає глюкоза.

Швидкість дихання і, як наслідок, швидкість утворення АТФ стає відповідною до швидкості використання АТФ в м'язах за допомогою серії регуляторних механізмів, що діють за принципом зворотного зв'язку. Якщо при стимуляції м'язу досягається максимальна активність, то витрати як глюкози, так і кисню сильно зростають. При переході від спокою до повної активності споживання кисню може збільшитися в 20 разів і більше. Таке різке збільшення споживання кисню і глюкози є наслідком швидкого гідролізу АТФ при скороченні м'язу. В результаті сильно зростає вміст АДФ.

У м'язовій тканині креатинкіназа виконує подвійну роль: у саркоплазмі фермент переносить фосфорильну групу від АТФ до креатину; фосфокреатин, що при цьому утворюється, використовується для фосфорилування АДФ, зв'язаного в міофібрилах із міозином.

Креатинкіназа міститься в найбільших кількостях в м'язовій і нервовій тканинах. Роль цього ферменту особливо велика в тканинах, в

яких може виникнути потреба в значних кількостях енергії за відносно короткі інтервали часу.

Вважається, що роль фосфокреатин–креатинкіназної системи у нервовій тканині полягає, можливо, в тому, що ця система разом з Na^+ , K^+ -АТФ-азою бере участь у енергетичному забезпеченні активного транспорту йонів через клітинні мембрани. Основна маса креатинкінази, як правило, зосереджена в гіалоплазмі клітини. Лише в мітохондріях м'язової і нервової тканини, а також у міофібрилах знайдена суттєва креатинкіназна активність. У нормі у сироватці крові визначаються лише сліди креатинкінази, в еритроцитах цей фермент практично не міститься. Значне підвищення (в 50 разів вище норми) активності креатинкінази в сироватці крові спостерігається при пошкодженні скелетної мускулатури, при різних порушеннях нервової системи.

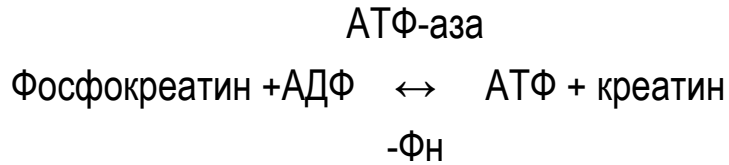
На думку деяких дослідників, підвищення активності креатинкінази при захворюваннях нервової системи зв'язано із збільшенням проникності мембран скелетних м'язів і міокарду, а також зниженням швидкості інактивації і видалення ферменту з кровотоку.

При захворюваннях скелетних м'язів змінюється не тільки активність креатинкінази, але і ізоферментний склад сироватки крові.

Відомі три ізоферменти креатинкінази: ВВ – ізофермент мозкової тканини, який електрофоретично найбільш рухливий; ВМ – проміжна форма; ММ–ізофермент, електрофоретично найменш рухливий. В скелетній мускулатурі дорослих тварин функціонує ізофермент ММ, в деяких м'язах є ізофермент ВМ, а в серцевому м'язі виявлено всі три ізоферменти.

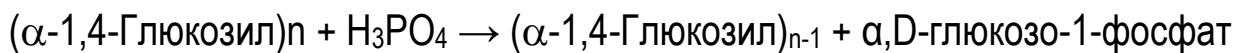
Розподілення ізоферментів креатинкінази є специфічним для кожного виду тварин, але є і загальні закономірності. Важливо, що на ранніх стадіях онтогенезу креатинкіназа представлена виключно ВВ – формою.

Структурний зв'язок креатинкінази з міозиною АТФ-азою утворює спряжену систему ферментів, що здійснюють гідроліз фосфокреатину за такою схемою:



Дія ферменту активується йонами Mg^{2+} .

Фермент фосфорилаза (α -1,4 - Глюкан: ортофосфатглюкозилтрансфераза; КФ 2.4.1.1) відноситься до ферментів другого класу, підкласу глюкозилтрансфераз. Каталізує реакцію перенесення залишку глюкози з невідновлюючого кінця глікогену на ортофосфат з утворенням глюкозо-1-фосфату:



Під дією цього ферменту відбувається розщеплення кінцевого 1-4-глікозидного зв'язку в молекулі глікогену з його невідновлюючого кінця за участі неорганічного ортофосфату. Цей процес називається фосфоролізом глікозидного зв'язку. При цьому полісахаридний ланцюг глікогену вкорочується на один залишок глюкози.

Фермент продовжує атакувати невідновлюючий кінець ланцюга до тих пір, доки не дійде до точки розгалуження полісахаридного ланцюга, тобто до α -1,6-зв'язку, який він атакувати і розщеплювати не може. Кінцевим продуктом дії глікогенфосфорилази є остаточний декстрин.

У місцях розгалуження α -1,6-зв'язки розщеплюються гідролітичним ферментом – α -1,6-глюкозидазою. Після цього відкриваються нові ділянки полісахаридного ланцюга для дії глікогенфосфорилази.

Фосфорилаза функціонує на дуже важливому етапі використання глікогену як енергетичного матеріалу клітини. Від інтенсивності звільнення глюкози з глікогену у вигляді глюкозо-1-фосфату залежить

подальше використання глюкози – її окиснення в анаеробному чи аеробному процесах.

Активність фосфорилази і в м'язах, і в печінці строго контролюється. Фермент скелетних м'язів і печінки існує у двох формах – активній (фосфорилаза *a*) і значно менш активній (фосфорилаза *b*). Коферментом фосфорилази є піридоксальфосфат, який ковалентно зв'язаний із залишком лізину в поліпептидному ланцюзі ферменту.

Активна форма ферменту – фосфорилаза *a* – розщеплюється на димери під дією ферменту фосфатази фосфорилази, який каталізує гідроліз зв'язку між фосфатом і залишком серину в молекулі фосфорилази. Димерна форма – це фосфорилаза *b*. Фосфорилаза *b* перетворюється знову в активну форму – фосфорилазу *a* – під дією ферменту кінази фосфорилази. Для такої активації на дві молекули фосфорилази *b* використовується чотири молекули АТФ. У м'язах, які знаходяться у стані спокою, фосфорилаза знаходиться в неактивній формі – у формі фосфорилази *b*. У звичайних умовах неактивна фосфорилаза *b* алостерично активується АМФ. Раптовий вибух м'язової активності може призвести до появи АТФ у таких кількостях, які достатні для включення фосфоролізу глікогену.

В активації фосфорилази ще більшу роль відіграють гормони: адреналін і глюкагон. Коли концентрація адреналіну в крові підвищується, то цей гормон починає зв'язуватись з рецепторами на поверхні клітинних мембран, активуючи утворення цАМФ. У печінці рецептори глюкагону зв'язують цей гормон, який стимулює утворення цАМФ. Циклічний АМФ у свою чергу активує протеїнкінази, які модифікують кіназу фосфорилази. У м'язі, який знаходиться у стані спокою, кіназа фосфорилази неактивна, а фосфорильовання протеїнкіназою переводить її в активну форму і тоді вона каталізує фосфорильовання за рахунок АТФ певного залишку серину у фосфорилазі *b*. Фосфорильований фермент – фосфорилаза *a* – здатний розщеплювати

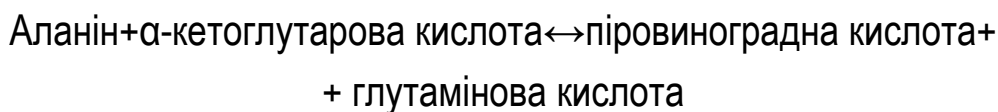
глікоген. Такі регуляторні механізми забезпечують необхідну швидкість перетворення глікогену в глюкозо-1-фосфат. Глюкозо-1-фосфат – кінцевий продукт фосфорилазної реакції при розщепленні глікогену чи крохмалю – перетворюється у глюкозо-6-фосфат під дією ферменту фосфоглюкомутази. Далі глюкозо-6-фосфат вступає у різноманітні процеси метаболізму.

Визначення активності фосфорилази дає уявлення про інтенсивність глікогенолізу в тканинах тварин.

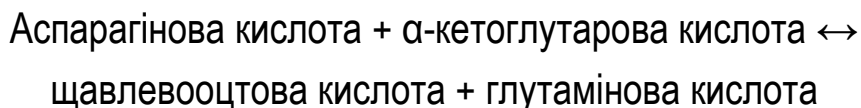
Амінотрансферази. Ферменти, що каталізують міжмолекулярне перенесення аміногрупи між амінокислотами і карбонільними сполуками, перш за все кетокислотами, – амінотрансферази – відкрили у 1937 році О.Є. Браунштейн і М.Г. Кріцман.

У результаті ферментативної реакції переамінування α -аміногрупа амінокислот переноситься до атома Карбону в α -положенні α -кетокислот – піровиноградної, α -кетоглутарової чи щавлевооцтової, в результаті чого утворюється α -кетоаналог вихідної амінокислоти, а α -кето-кислота перетворюється у відповідну α -амінокислоту.

Найбільш важливими амінотрансферазами є аланінамінотрансфераза, яка каталізує реакцію:



і аспаратамінотрансфераза, що каталізує реакцію:



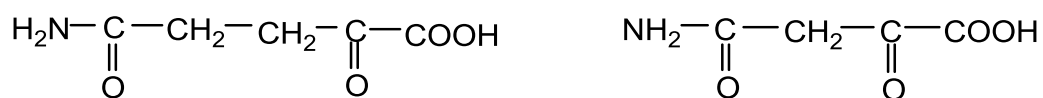
Реакції, що каталізуються амінотрансферазами, легко оборотні і їх константи рівноваги близькі до одиниці. У реакціях переамінування втрат амінного Нітрогену не відбувається, оскільки дезамінування α -амінокислоти супроводжується амінуванням α -кетокислоти, яка виступає в ролі акцептора аміногруп. Наслідком реакції переамінування

різних амінокислот є те, що всі їх аміногрупи збираються у вигляді одної амінокислоти, найчастіше глутамінової кислоти, хоч в деяких організмах це може бути також аспарагінова кислота чи аланін. Кінцевим акцептором аміногруп більшості амінокислот є α -кетоглутарова кислота, яка перетворюється в глутамінову кислоту і є, таким чином, механізмом передачі аміногруп у заключну серію реакцій, що ведуть до утворення кінцевих продуктів азотистого обміну.

Амінотрансферази містяться як в мітохондріях, так і в розчинній фракції цитоплазми клітин еукаріотів. Між мітохондріями і цитоплазмою у процесі дезамінування амінокислот є тісна взаємодія. Накопичення аміногруп у формі глутамінової кислоти відбувається в цитоплазмі, після чого ця глутамінова кислота за допомогою особливої системи мембранного перенесення попадає всередину мітохондрії. В матриксі мітохондрії є специфічна аспартатамінотрансфераза.

Усі амінотрансферази мають один і той же кофермент – піридоксальфосфат – похідне вітаміну В₆.

У переамінуванні можуть брати участь всі амінокислоти за винятком лізину і треоніну. В цих реакціях беруть участь також амідні амінокислоти – аспарагін і глутамін. У результаті переамінування цих амідів з кетокислотами утворюються відповідно α -кетосукцинамова і α -кетоглутарома кислота:



Оскільки константа рівноваги реакцій переамінування близька до одиниці, ці реакції не можуть визначити напрямок метаболічних процесів. Ферменти переамінування функціонують постійно. Зміщення напрямку процесу переамінування може відбутися тільки при видаленні із системи одного чи більше продуктів реакції.

Швидкість кожної з амінотрансферазних реакцій у клітині визначається тільки концентраціями субстратів і кількістю відповідного фе-

рменту. На активність специфічних амінотрансфераз у печінці можуть впливати деякі гормони. Процес переамінування забезпечує перерозподілення амінного Нітрогену. Це дуже важливо, оскільки їжа, яку отримують тварини, може бути джерелом такої суміші амінокислот, яка суттєво відрізняється від оптимальної для метаболізму.

Аспартатамінотрансфераза у найбільшій кількості міститься в серцевому м'язі, в дещо менших кількостях у печінці, скелетній мускулатурі, мозку, нирках, статевих залозах. Активність АсАТ у серцевому м'язі майже в 10 тисяч разів вища, ніж у сироватці крові. В еритроцитах АсАТ міститься в 10 разів більше, ніж у сироватці крові. Тому при визначенні активності цієї амінотрансферази в сироватці крові остання не повинна мати навіть слідів гемолізу еритроцитів.

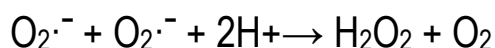
Найбільша активність аланінамінотрансферази виявляється в печінці, підшлунковій залозі, серці і скелетній мускулатурі. У печінці активність АлАТ у декілька тисяч разів вища, ніж у сироватці крові.

Підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові відбувається при ураженні органів і тканин, у яких багато цих ферментів. Найбільш різкі зміни активності АсАТ мають місце при ураженні серцевого м'язу. При захворюваннях печінки в першу чергу і в найбільшій мірі в порівнянні з АсАТ змінюється активність АлАТ. Пошкодження лише однієї печінкової клітини з 750 достатньо для значного збільшення активності АлАТ у сироватці крові.

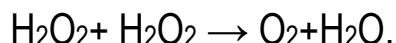
Каталаза. Реакція відновлення Оксигену може відбуватися шляхом послідовних одноелектронних стадій. У цьому разі як проміжний продукт є супероксид-аніон $O_2^{\cdot-}$, гідроген пероксид, гідроксильний радикал $\cdot OH$. Такі частинки з високою реакційною здатністю потенційно отруйні для живих систем, особливо радикали $O_2^{\cdot-}$ та $\cdot OH$, які, як вважають, входять у групу мутагенних радикалів, що виникають при іонізуючій радіації.

Тому, згідно основним механізмам біологічного відновлення Оксигену, такі процеси проходять через стадії з утворенням H_2O_2 або H_2O .

Організми, що використовують кисень, мають загрозу внутрішньоклітинного утворення $\text{O}_2\cdot^-$ та H_2O_2 . Для захисту від таких частинок існують ферментативні захисні механізми. За участі супероксиддисмутази супероксидний радикал-іон перетворюється в гідроген пероксид згідно реакції:



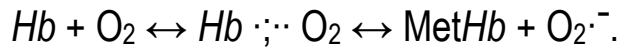
Гідроген пероксид у свою чергу видаляється за допомогою каталази, яка каталізує реакцію:



Організми, які не виробили такі механізми захисту від токсичності кисню, можуть існувати тільки в анаеробних умовах.

Каталазна активність спостерігається майже у всіх клітинах і органах. Печінка, еритроцити і нирки містять значні кількості каталаз. Ця активність також виявлена у всіх рослинах і у більшості мікроорганізмів, крім облигатних анаеробів. У кожному випадку каталаза, ймовірно, попереджає акумуляцію шкідливого H_2O_2 , що утворюється при анаеробному окисненні відновлених флавопротеїнів та з $\text{O}_2\cdot^-$. Каталаза еритроцитів має виключно важливе значення для захисту гемоглобіну від окиснення його у *MetHb*.

Еритроцити знаходяться в середовищі з більш високою концентрацією O_2 , ніж більшість клітин, і потенційно можуть зазнавати більшої руйнівної дії окисників, ніж інші клітини. Близько 0,5% гемоглобіну постійно перетворюється в метгемоглобін. Гемвісна метгемоглобінредуктаза каталізує відновлення метгемоглобіну. Автоокиснення *Hb* у *MetHb* призводить до утворення супероксидного йона $\text{O}_2\cdot^-$:

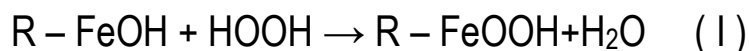


Супероксиддисмутаза в цитоплазмі еритроциту забезпечує видалення цього руйнуючого йона. Гідроген пероксид, що при цьому утворюється, розщеплюється потім каталазою еритроцитів.

Каталаза печінки бика (M=248кДа) містить чотири гемових групи на молекулу ферменту. Її субодиниці не мають ферментативної активності окремо. Каталаза відноситься до ферментів з найбільшою молекулярною активністю. Одна молекула каталази може розкласти 44000 молекул H_2O_2 за секунду. Фактично фермент не потребує майже ніякої енергії активації. Каталаза реагує з H_2O_2 з утворенням відносно стабільного фермент-субстратного комплексу, структура якого не в'ясна.

Молекулярна маса кристалічної каталази, її активність і деякі інші властивості, хоч і в незначній мірі, але відрізняються в залежності від джерела одержання ферменту. У зв'язку з цим слід говорити про різні каталази. Ці відмінності обумовленні головним чином різницею у складі або структурі білкового компонента. Каталаза рослинного походження містить тільки одну групу прогематину. Про різницю властивостей рослинної і тваринної каталази можна було б говорити тільки при порівнянні кристалічних препаратів ферменту, вільних від домішок, проте такі препарати поки що не отриманні.

На основі робіт Чанса, Теорелла, Кейліна механізм каталазної реакції такий:



У цій реакції відбувається взаємодія гідроксид гематину з гідроген пероксидом в результаті чого утворюється проміжний нестійкий пероксидний комплекс. По мірі його утворення він далі відновлюється другою молекулою пероксиду:



Крім сполук, що блокують Ферум гематинової групи і таким чином інактивують всі гемпротеїнові ферменти (сульфіди, ціаніди, гідроксиламін), каталаза пригнічується сполуками, які не є специфічними отрутами – нітратами, хлорид-іонами, ацетат-іонами, фосфат-іонами, сульфат-іонами. Найбільш сильно гальмується активність каталази нітрат-іонами у порівнянні з іншими аніонами. Гальмівний вплив аніонів на активність каталази, можливо, полягає в тому, що вищезгадані аніони витискують йон гідроксила гематину і стають на його місце.

Кейлін і Хартрі показали, що каталаза може окиснювати етиловий і метиловий спирти, а також формальдегід у присутності гідроген пероксиду, який утворюється в результаті дії флавопротеїнових оксидаз. Але при цьому концентрація гідроген пероксиду повинна бути дуже низькою у порівнянні з концентрацією ферменту ($c(\text{H}_2\text{O}_2) < 1 \cdot 10^{-9} \text{ моль/дм}^3$). При більш концентрованому H_2O_2 донором Гідрогену для відновлення комплексу R-FeOOH стає сам гідроген пероксид (див. реакцію II), а не спирти. На основі досліджень Кейліна і Хартрі ряд дослідників приписують каталазі пероксидазну функцію. Все ж каталаза проявляє пероксидазну функцію тільки до обмеженого числа сполук: етиловий і метиловий спирти, формальдегід і нітрати.

Суттєвою є роль каталази у забезпеченні молекулярним киснем тих тканин, куди доступ його з тих чи інших причин обмежений.

Крім того, біологічна роль каталази тісно пов'язана з нормально функціонуючою цитохромною системою. При комбінованій дії цитохрому *c* з каталазою мітохондрії більш активно синтезують АТФ при незначному підвищенні поглинання кисню. Каталазна активність мітохондрій пов'язана із забрудненням їх пероксисомами.

Цитохром *aa₃* (цитохром *c*-оксидаза, КФ 1.9.3.1.) каталізує окиснення відновленого цитохрому *c* молекулярним киснем. Цитохром *aa₃* є термінальною оксидазою головного дихального ланцюга мітохон-

дрій. Цей фермент локалізований у внутрішній мембрані мітохондрій, з якою відносно міцно зв'язаний. Молекула цитохромоксидази містить два атома Cu і дві групи гему типу *a*. Але виділити вдається тільки один тип гему.

Гемові групи дещо відрізняються за швидкістю реакцій окиснення і відновлення, взаємодією з інгібіторами і за спектральними характеристиками. Ці геми отримали назви: „гем *a*” і „гем *a₃*”, звідси і назва „цитохром *aa₃*”.

Гем *a₃* знаходиться на внутрішній стороні внутрішньої мітохондріальної мембрани, а гем *a* – на зовнішній стороні цієї ж мембрани і першим взаємодіє з цитохромом *c*. Гем *a₃* може зв'язувати дихальні інгібітори – CO або HCN; гем *a* інгібітори не зв'язує. Блокування *a₃* – групи інгібіторами перешкоджає окисненню як *a*-, так і *a₃* – групи, але не перешкоджає їх відновленню. Відновлений цитохром *c* реагує переважно з гемом *a*; це дозволяє допустити, що геми *a* і *a₃* в дихальному ланцюгу функціонують не паралельно, а послідовно. Цитохром *a₃* розглядається як істинна оксидаза.

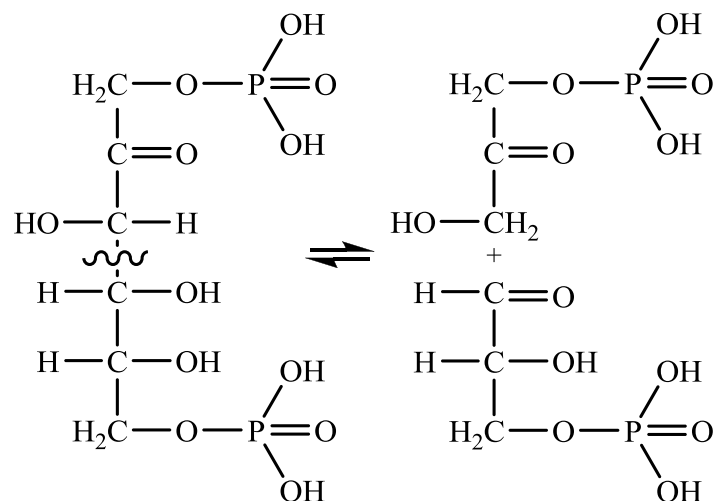
Цитохромоксидаза каталізує чотириелектронне відновлення молекули Оксигену до води:



Перенесення електронів у напрямку цитохром *c* → цитохром *aa₃* → O₂ спряжене із запасанням енергії у формі АТФ.

Альдолази – група ферментів, які оборотно каталізують реакції альдольного розщеплення і альдольної конденсації різних субстратів.

Найбільш вивчена альдолаза, що бере участь у гліколітичному (анаеробному і аеробному) процесі окиснення глюкози. Ця альдолаза за систематичною номенклатурою має назву кетозо–1–фосфатальдегід–ліаза; КФ 4.1.2.7. Каталізує реакцію альдольного розщеплення фруктозо–1,6–дифосфату з утворенням діоксиацетонфосфату і D–гліцеральдегід–3–фосфату:



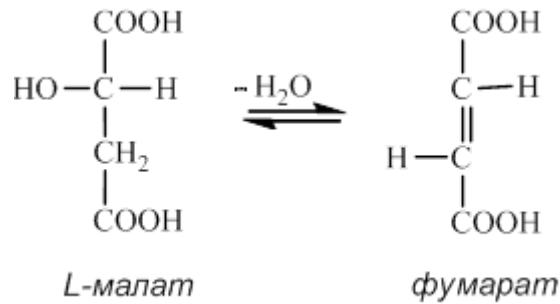
Рівновага реакції значно зміщена у зворотному напрямку, тобто утворення фруктозо–1,6–дифосфату з двох тріозофосфатів. Цей фермент присутній у всіх рослинних і тваринних тканинах, але відсутній в деяких бактеріях.

Альдолаза із м'язів тварин має відносну молекулярну масу близько 160 кДа. Молекула складається з чотирьох субодиниць. У кислому середовищі фермент дисоціює на неактивні субодиниці. При нейтралізації середовища субодиниці легко і самодовільно з'єднуються, утворюючи активний фермент. Альдолаза містить вільні SH–групи, які відіграють важливу роль у її каталітичній активності. Фермент із м'язів розщеплює не тільки фруктозо–1,6–дифосфат, але також і ряд інших кетозо–1–фосфатів.

У зворотній реакції альдолаза проявляє строгу специфічність до діоксоацетонфосфату, але замість гліцеральдегід–3–фосфату може каталізувати реакцію з іншими альдегідами. У стані рівноваги частка діоксоацетонфосфату становить більше 90% у суміші обох тріозофосфатів.

Ліази. Фумаратгідратаза (КФ 4.2.1.2) є ферментом четвертого класу – ліаз, підкласу С–О–ліаз. За систематичною номенклатурою фермент називається L–малатгідроліазою.

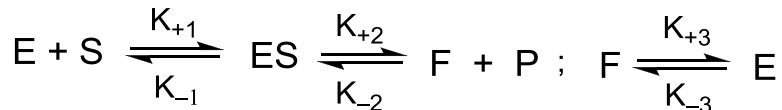
Фумаратгідратаза каталізує реакцію:



Зміна стандартної вільної енергії реакції порівняно невелика і тому вона легко оборотна. Кофермент для реакції не потрібен.

Молекула ферменту складається з чотирьох субодиниць, кожна з яких має відносну молекулярну масу 48,5 кДа. Окремо субодиниці каталітичної активності не мають.

Серед інших ферментативних реакцій кінетика і механізм фумаратгідратазної реакції найбільш вивчені. Фумаратгідратаза ссавців присутня в матриксі мітохондрій і в цитоплазмі клітин. Цитоплазматична і мітохондріальні форми відрізняються електрофоретичною рухливістю. При функціонуванні фумаратгідратази фермент звільняється після утворення продукту реакції у такій формі, яка відмінна від форми, що зв'язує субстрат:



Фермент-фумаратний комплекс характеризується рК близько 5,7 і 7,7, а для фермент-малатного комплексу ці величини дорівнюють близько 7 і можливо 9. Молекули субстратів зв'язуються з фумаразою не тільки в активному центрі, а й в інших місцях. Фермент активується тільки двозарядними і тризарядними аніонами: сульфатом, цитратом, фосфатом, арсенатом.

У лужних розчинах більш високим значенням температури відповідають більш високі значення енергії активації. У кислому середовищі залежність інша. Із зміною рН критична температура змінюється з 22°C до 32°C. Вважають, що при підвищенні температури

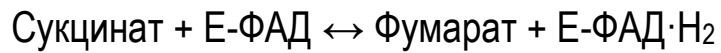
ри відбувається дисоціація ферменту на субодиниці. Дисоціація на субодиниці, як і денатурація, може характеризуватися високим температурним коефіцієнтом. Оптимум рН дії ферменту (фумарат) – 6,5; для малату – 8,0.

Фумаратгідратаза проявляє абсолютну специфічність: діє тільки на L-малат (пряма реакція) або на фумарат (зворотна реакція). Фермент проявляє стереоспецифічність двох типів: у прямій реакції діє тільки на одну оптичну форму і не діє на іншу; у зворотній реакції діє тільки на один геометричний ізомер (транс-форму – фумарат) і не діє на інший геометричний ізомер (цис-форму – малеїнат). Конкурентними інгібіторами фумаратгідратази в реакції дегідратації L-малату є D-малат; у реакції гідратації фумарату – цитрат, D-тартрат, малеїнат, транс-аконітат, сукцинат, малонат, адіпат, глутарат, гліцин.

Для сполучення з ферментом молекула речовини повинна мати дві кислотні групи. Споріднені монокарбонові кислоти, а також естери малату і фумарату не сполучаються з ферментом. При заміщенні однієї карбоксильної групи сульфогрупою речовина може сполучатися з ферментом, хоч вона і не є його субстратом. Аналогічне спостерігається при заміщенні атома Гідрогену в α -положенні метилом (2-метилфумарат), а також CH_2COOH -групою (цитрат і транс-аконітат) або введенні обох атомів Гідрогену в α -положенні (сукцинат). Стереоізомери обох субстратів (D-малат і малеїнова кислота) хоч і не перетворюються, все ж досить міцно з'єднуються з активним центром ферменту і внаслідок цього діють як конкурентні інгібітори. АТФ зменшує спорідненість фумарази до фумарату і таким чином пригнічує реакцію коли зменшується до критичної концентрація фумарату.

Хоча молекула фумарату симетрична, ОН-група може приєднуватися тільки з одного боку подвійного зв'язку з утворенням тільки L-стереоізомеру малату. Сукцинатдегідрогеназа (КФ1.3.99.1.)

належить до ферментів першого класу – оксидоредуктаз. Каталізує реакцію окиснення сукцинату в фумарат. Коферментом є ФАД, який ковалентно зв'язаний із оалоксазиною частиною з білком через залишок гістидину. ФАД діє як акцептор Гідрогену в реакції:



Відновлений фермент може віддавати атоми Гідрогену різним неприродним акцепторам, наприклад барвникам, які здатні відновлюватись. Сукцинатдегідрогеназа відіграє важливу роль в циклі лимонної кислоти; вона має номер 1.3.99.1., оскільки невідомий акцептор в реакціях, які вона каталізує.

Фермент виявлено тільки в мітохондріях, де він міцно зв'язаний з внутрішньою мітохондріальною мембраною. Сукцинатдегідрогеназа має відносну молекулярну масу близько 175 кДа (з серця бика). Молекула містить один залишок ФАД, який можна відщепити, обробивши фермент трипсином. З молекулою ферменту зв'язано чотири атома негемінового Феруму. Крім того, фермент містить також чотири атоми Сульфуру у невідомій хімічній формі, які в кислому середовищі утворюють H_2S . Можливо, що атоми Феруму, що входять до складу ферменту, в сукцинатдегідрогеназній реакції здатні до переходу $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$.

Негеміновий Ферум і лабільні атоми Сульфуру локалізуються в певних субодинацях ферменту, які внаслідок цього називаються білками, що містять негеміновий Ферум.

Було встановлено, що сукцинатдегідрогеназа відщеплює атоми Гідрогену метиленових груп сукцинату в транс-положенні з утворенням транс-ізомеру – фумарату.

Сукцинатдегідрогеназа інгібується малонатом і іншими дикарбоновими кислотами. Малонат нагадує сукцинат тим, що при рН 7,0 він також має дві йонізовані карбоксильні групи. Але від малонату сукцинатдегідрогеназа не може відщеплювати атоми Гідрогену. Інгібування

сукцинатдегідрогенази малонатом є конкурентним тому, що сукцинат і малонат конкурують за один і той же центр зв'язування в молекулі ферменту. При конкурентному інгібуванні ступінь інгібування ферменту залежить не від абсолютної концентрації інгібітора, а від співвідношення концентрацій сукцинату і малонату. Крім малонату, конкурентними інгібіторами сукцинатдегідрогенази можуть бути і інші дикарбонові кислоти, які мають приблизно такі ж відстані між аніонними групами. Звідси випливає, що каталітичний центр в молекулі сукцинатдегідрогенази має дві певним чином розташовані позитивно заряджені групи, які здатні притягувати дві від'ємно заряджені карбоксильні групи субстрату.

Сукцинатдегідрогеназа активується фосфатом, сукцинатом і фумаратом і конкурентно інгібується слідами оксалоацетату. Тому при накопиченні оксалоацетату в циклі Кребса утворення його із сукцинату пригнічується. Щавлевооцтова кислота в значно більшій мірі є конкурентним інгібітором сукцинатдегідрогенази, ніж малонова кислота.

Сукцинатдегідрогеназа не може розрізняти дві карбоксильні групи сукцинату можливо тому, що просторово вони абсолютно еквівалентні. Якщо в сукцинаті помітити тільки одну карбоксильну групу, то в малаті і оксалоацетаті, які утворюються з сукцинату, мітка виявляється в обох карбоксильних групах. Найвищу активність фермент має в нирках, серцевому м'язі, печінці, скелетних м'язах. Окиснення сукцинату за участі сукцинатдегідрогенази є важливою ланкою окиснювального метаболізму м'язу. Про це свідчить те, що конкурентний інгібітор сукцинатдегідрогенази – малонова кислота – майже повністю пригнічує дихання в м'язовому гомогенаті.

Ліпази – ферменти третього класу гідролаз, підкласу естераз. Найбільше значення має панкреатична ліпаза (КФ 3.1.1.3), яка каталізує гідроліз триацилгліцеролів. Цей фермент діє тільки на граничній поверхні вода – естер. Ліпаза, або карбоксилестераза, каталізує

гідроліз переважно α -естерних зв'язків у молекулах триацилгліцеролів. Так звана ліпопротеїнліпаза діє на емульсії триацилгліцеролів. Ліпаза проявляє специфічність дії не тільки за відношенням до положення естерного зв'язку, але і в залежності від довжини і форми карбонового ланцюга по обидва боки від естерного зв'язку. Оптимум дії ферменту проявляється при $\text{pH} \approx 8,0$.

Наприклад, було виявлено, що в організмі риб (*Rasterelliger kanagurta*) вміст ліпази вищий у червоних м'язах, ніж у білих. Оскільки активність ліпази вища в червоних м'язах, можна вважати, що в цій тканині має місце аеробний метаболізм з використанням ліпідів як основного енергетичного матеріалу. У червоних м'язах і жирні кислоти окиснюються у значно більшій мірі, ніж у білих м'язах. У деяких видів прісноводних риб активність ліпази виявляється максимальною під час інтенсивного харчування.

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Ферменти

Лабораторна робота 1

Фізико-хімічні властивості ферментів

Дослід 1. Термолабільність ферментів

Принцип методу. Ферменти є термолабільними сполуками. Температурний оптимум дії більшості ферментів знаходиться у межах 37-40°C. При деякому підвищенні температури середовища відбувається прискорення реакції внаслідок підвищення енергії активації молекул субстрату. Денатурація ферменту різко прогресує при температурі, що перевищує 50°C. Інактивація ферменту при підвищенні температури є необоротною. Зі зниженням температури швидкість ферментативних реакцій поступово зменшується і при 0°C завмирає. Але денатурації ферменту при цьому не відбувається і при поступовому підвищенні температури до оптимальних значень їх активність відновлюється.

Мета роботи. Дослідити активність ферменту амілази слини при різних температурних умовах. Показати оборотність гальмуючої дії низької температури на активність ферменту.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Стакан з льодом. Водяна баня з термометром. Нагрівальні прилади. Розведена слина. Крохмаль, ($\omega=1\%$) у розчині натрій хлориду ($\omega=0,9\%$). Реактив Люголя.

Хід роботи. У чотири пробірки наливають по 5см^3 розчину крохмалю, у пробірки № 1,2,3 додають по $2-3\text{см}^3$ розведеної слини, у пробірку № 4 додають $2-3\text{см}^3$ заздалегідь прокип'яченої слини. Перемішують вміст кожної пробірки і ставлять пробірку №1 у стакан з льодом (0°C), пробірку №2 залишають при кімнатній температурі, пробірки № 3 і 4 поміщають у водяну баню при температурі 38-40°C. Через 10 хвилин пробірки з водяної бані охолоджують та в усі

пробірки додають 1-2 краплі реактиву Люголя. З пробірки №1 для реакції з реактивом Люголя відлити трохи розчину. У першій пробірці розчин повинен бути забарвлений у синій колір, у другій – у фіолетовий або червоно-бурий, у третій – у жовтий і у четвертій – у синій. Потім помістити пробірку №1 у водяну баню при температурі 38-40°C на 10 хвилин. Відбудеться гідроліз крохмалю, що відобразить реакція з реактивом Люголя. У пробірці, де буде найменше синього забарвлення, була найбільш сприятлива температура для дії ферменту. Результати дослідів записують у таблицю термолабільності ферментів (табл. 14) і роблять висновки.

Таблиця 14. Результати дослідів

№ пробірки	Фермент	Умови дослідів	Субстрат	Інкубація	Забарвлення з йодом
1	Амілаза	Фермент нативний	Крохмаль	10 хв., t=0°C	
2	Амілаза	Фермент нативний	Крохмаль	10 хв., t=18°C	
3	Амілаза	Фермент нативний	Крохмаль	10 хв., t=38°C	
4	Амілаза	Фермент денатурований	Крохмаль	10 хв., t=100°C	

Дослід 2. Вплив рН на дію ферментів

Принцип методу. Активність ферменту змінюється у залежності від величини рН. Зміна електричного заряду молекули ферменту – білка, яке відбувається під впливом рН і пов'язане зі зміною ступеня дисоціації дисоціуючих груп білка, призводить до зміни просторового розташування поліпептидного ланцюга, наслідком чого є зміна швидкості ферментативної дії. При дуже високих і дуже низьких значеннях рН ферменти денатують.

Мета роботи. Дослідити активність ферменту амілази слини при різних значеннях рН.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки. Водяна баня з термометром. Розчин Na_2HPO_4 (с=0,2 моль/дм³) (розчин

(А). Розчин лимонної кислоти ($C_6H_8O_7$) ($c=0,1$ моль/дм³) (розчин(Б). Розчин крохмалю ($\omega=1\%$). Розведена слина. Реактив Люголя.

Хід роботи. У три пробірки вносять по 2-3см³ буферних розчинів з різними рН (5,0; 6,8; 8,0). У всі пробірки додають по 2-3см³ розведеної слини (амілаза) і по 4-5см³ крохмалю, перемішують і інкубують 10 хвилин при $t=37^\circ C$. Потім у кожен пробірку додають по 1 краплі реактиву Люголя. Результати спостережень заносять у таблицю, що показує вплив рН на активність амілази слини (табл. 15). У пробірці, де буде найменш синє забарвлення вмісту, найбільш глибоко відбулося розщеплення крохмалю за участю амілази. Роблять висновок про оптимальне значення рН для дії амілази слини.

Таблиця 15. Результати дослідження

№ пробірки	Фермент	рН середовища	Субстрат	Інкубація.	Забарвлення з йодом
1	Амілаза	5,0	Крохмаль	10 хв, $t=37^\circ C$	
2	Амілаза	6,8	Крохмаль	10 хв., $t=37^\circ C$	
3	Амілаза	8,0	Крохмаль	10 хв., $t=37^\circ C$	

Дослід 3. Специфічність дії ферментів

Принцип методу. Специфічність дії ферментів пояснюється збігом просторових конфігурацій активного центру ферменту і субстрату, їх хімічною спорідненістю, що забезпечує утворення фермент-субстратного комплексу і здійснення каталітичного процесу. Розрізняють групову (абсолютну і відносну) і індивідуальну (абсолютну і стереохімічну) специфічність ферментів.

Мета роботи. Ознайомитись із специфічністю дії ферментів, дослідивши вплив ферменту амілази і сахарози на різні субстрати – крохмаль і сахарозу.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками. Піпетки. Водяна баня з термометром, або термостат. Розведена слина. Крохмаль,

($\omega=1\%$) розчин. Розчин NaCl ($\omega=1\%$). Реактив Люголя. Реактив Фелінга. Препарат сахарози.

Хід роботи. У пробірки № 1 і 2 вносять по 4-5см³ розчину крохмалю, у пробірки № 3 і 4 – по 4-5см³ розчину сахарози. В пробірки № 1 і 3 додають по 2-3см³ розведеної слини (амілаза), а у пробірки 2 і 4 – по 2-3см³ розчину сахарози. Вміст пробірок перемішують і інкубують 10 хвилин при температурі 37°C. Далі визначають ступінь перетворення субстратів у присутності досліджуваних ферментів. У 1 і 2 пробірках субстратом є крохмаль, отже тут треба визначити, чи відбулося розщеплення крохмалю. Для цього у ці пробірки після закінчення інкубації вносять по 1 краплі реактиву Люголя. Якщо відбулося глибоке розщеплення крохмалю до мальтози чи глюкози, то забарвлення у пробірках буде жовтуватим; якщо відбувся частковий гідроліз крохмалю до декстринів, то з реактивом Люголя буде червоно-фіолетове забарвлення; якщо фермент не подіяв на цей субстрат, то забарвлення буде синє. У 3 і 4 пробірках субстратом є сахароза. При гідролізі сахарози утворюється глюкоза і фруктоза. Якщо фермент гідролізує сахарозу, то у розчині можна виявити глюкозу за допомогою реактиву Фелінга. При нагріванні відбувається відновлення глюкозою Cu^{2+} до CuOH жовтого кольору чи Cu_2O червоного кольору. Тому у пробірки № 3 і 4 додають по 1-2см³ реактиву Фелінга і нагрівають. Спостереження записують у таблицю специфічності ферментів амілази і сахарози (табл. 16).

Таблиця 16. Результати досліджу

№ пробірки	Субстрат	Фермент	Інкубація.	Забарвлення з йодом	Забарвлення реактивом Фелінга	3 Специфічність
1	Крохмаль	Амілаза	10 хв., t=37°C			
2	Крохмаль	Сахароза	10 хв., t=37°C			
3	Сахароза	Амілаза	10 хв., t=37°C			
4	Сахароза	Сахароза	10 хв., t=37°C			

Дослід 4. Специфічність дії уреаз

Принцип методу. Розрізняють групову (абсолютну і відносну) і індивідуальну (абсолютну і стереохімічну) специфічність ферментів. Дія пепсину на білки тваринного, рослинного, мікробного походження є прикладом абсолютної групової специфічності. Абсолютну специфічність проявляє уреаз, яка каталізує гідроліз сечовини до амоніаку і вуглекислого газу.

Мета роботи. Ознайомитись із специфічністю дії ферменту уреаз на сечовину і ацетамід.

Обладнання та реактиви. Пробірки. Універсальний індикатор. Розчин сечовини ($\omega=5\%$). Розчин ацетаміду. Препарат уреаз.

Хід роботи. В одну пробірку вносять розчин сечовини ($\omega=5\%$), а в іншу – розчин ацетаміду. Додають у кожен пробірку препарат уреаз (біля 1г соєвого борошна), перемішують. В отвір кожної пробірки поміщають змочену водою стрічку універсального індикатора. Через деякий час стрічка в одній з пробірок синіє внаслідок виділення амоніаку, який утворюється при гідролізі сечовини. Роблять висновок про дію уреаз на сечовину і ацетамід.

Дослід 5. Вплив активаторів та інгібіторів

Принцип методу. Речовини, які підвищують активність ферментів, називаються активаторами, а ті, що пригнічують – інгібіторами або паралізаторами. Активатори, приєднуючись до молекули неактивного ферменту, здатні змінювати її конформацію з утворенням комплексу, що має каталітичну активність. Пригнічувальна дія інгібіторів реалізується шляхом зміни нативної конформації ферменту. Розрізняють специфічні та неспецифічні активатори й інгібітори.

Мета роботи. Дослідити активність амілази слини у присутності речовин, які відіграють роль активаторів і інгібіторів (позитивних і негативних ефекторів).

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками. Піпетки. Водяна баня з термометром, або термостат. Розведена слина. Крохмаль, ($\omega=1\%$). Розчини натрій хлориду ($\omega=1\%$), купрум сульфату, ($\omega=1\%$). Реактив Люголя.

Хід роботи. У три пробірки вносять по 4-5 крапель розчину крохмалю, у пробірку № 1 додають 1-2см³ розчину натрій хлориду, у пробірку № 2 – 1-2см³ розчину купрум сульфату. В пробірку № 3 ефектор не вносять. У всі пробірки приливають по 1-2см³ розведеної слини, вміст пробірок перемішують і пробірки інкубують при температурі 37°C. Потім у всі пробірки додають по 1 краплі реактиву Люголя. Спостереження заносять у таблицю, що показує вплив натрій хлориду і купрум сульфату на активність амілази (табл. 17).

Таблиця 17. **Результати дослідів**

№ пробірки	Фермент	Субстрат	Ефектор	Інкубація.	Забарвлення з йодом
1	Амілаза	Крохмаль	NaCl	10 хв, t=37°C	
2	Амілаза	Крохмаль	CuSO4	10 хв., t=37°C	
3	Амілаза	Крохмаль	–	10 хв., t=37°C	

Лабораторна робота 2

Визначення активності лужної фосфатази у сироватці крові

Принцип методу Під дією ферменту відбувається гідроліз β -гліцерофосфату, який застосовують як субстрат лужної фосфатази. Неорганічний фосфат, що при цьому вивільняється, визначають за методом Фіске-Суббароу. За приростом фосфату в мг на 100см³ сироватки крові за 1 годину оцінюють активність ферменту.

Мета роботи. Визначити активність лужної фосфатази у сироватці крові тварин або риб, з'ясувати роль ферменту у процесах метаболізму в різних організмів.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Пробірки. Фільтри. Мірні пробірки ємністю 10см³. Сиро-

ватка крові. Субстратно - буферний розчин β -гліцерофосфату (рН 9,0). Трихлороцтова кислота ($\omega=10\%$). Молібденовий реактив. Аскорбінова кислота ($\omega=0,5\%$). Вода дистильована.

Хід роботи. У дві пробірки (контрольна та дослідна) вносять по $0,5\text{см}^3$ сироватки крові і по 1см^3 субстратно-буферного розчину β -гліцерофосфату (рН 9,0). У контрольну пробу зразу ж додають $0,9\text{см}^3$ розчину трихлороцтової кислоти ($\omega=10\%$) для осадження білків та інактивації ферменту. Обидві пробірки інкубують протягом однієї години при кімнатній температурі. Охолоджують, потім у дослідну пробу додають $0,9\text{см}^3$ трихлороцтової кислоти ($\omega=10\%$) для припинення дії ферменту і осадження білків. Вміст кожної пробірки фільтрують у мірні пробірки ємністю 10см^3 . Осади на фільтрах промивають 1см^3 води. Додають у кожну пробірку по 1см^3 молібденового реактиву, по $0,5\text{см}^3$ розчину аскорбінової кислоти ($\omega=0,5\%$), доводять об'єми водою до 10см^3 , перемішують і через 15 хвилин спектрофотометрують у кюветах ($l=5\text{мм}$) при $\lambda=750\text{нм}$ проти води.

Для визначення вмісту неорганічного фосфату в розчині будують калібрувальний графік. Готують стандартні розчини KN_2PO_4 , які містять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 мкг Фосфору в $0,1\text{см}^3$. Проводять з ними реакцію з молібденовим реактивом так, як і з дослідними чи контрольними пробами, спектрофотометрують. На осі ординат відкладають оптичну густину стандартів, а на осі абсцис відповідний вміст Фосфору. За калібрувальним графіком знаходять вміст Фосфору у формі фосфату в дослідній і контрольній пробі. Активність ферменту розраховують за формулою:

$$E = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{V}, \text{ де}$$

E – активність лужної фосфатази в міліграмах приросту Фосфору на 100см^3 сироватки крові за одну годину;

m_1 – вміст Фосфору в дослідній пробі, мкг;

m_2 – вміст Фосфору в контрольній пробі, мкг;

V – об'єм сироватки, взятий для аналізу, см^3 ;

100 – перерахунок на 100см^3 сироватки крові.

Лабораторна робота 3

Визначення активності холінестерази сироватки крові

Принцип методу. Холінестераза каталізує реакцію гідролізу ацетилхоліну на холін і оцтову кислоту. Накопичення оцтової кислоти призводить до зниження рН інкубаційного середовища. Величина зміни рН середовища є мірою активності ферменту.

Мета роботи. Визначити холінестеразну активність сироватки крові, з'ясувати роль ферменту в процесах метаболізму.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Пробірки. Веронал-медіналовий буферний розчин (рН 8,4). Розчин ацетилхоліну ($\omega=3,5\%$). Сироватка крові свіжовиготовлена без ознак гемолізу. Дистильована вода. Індикатор феноловий червоний ($\omega=0,02\%$).

Хід роботи. В одну пробірку вносять 1см^3 веронал-медіналового буферного розчину (рН 8,4), $0,5\text{см}^3$ розчину ацетилхоліну ($\omega=3,5\%$) і $0,1\text{см}^3$ сироватки крові свіжоприготованої без ознак гемолізу. У другу пробірку вносять 1см^3 того ж буферного розчину, $0,5\text{см}^3$ дистильованої води і $0,1\text{см}^3$ сироватки крові. Обидві проби інкубують протягом 60 хвилин. За 2-3 хвилини до закінчення інкубації в кожену пробірку додають по $3,5\text{см}^3$ води і по $0,1\text{см}^3$ розчину індикатора фенолового червоного ($\omega=0,02\%$). Цей індикатор має зону зміни забарвлення при рН 6,4-8,0. У кислому середовищі забарвлення індикатора жовте, а в лужному – червоне.

Проби спектрофотометрують при довжині хвилі 540 нм у кюветах з $l=10$ мм проти води.

Для визначення зміни рН середовища у процесі ферментативної реакції будують калібрувальний графік. Для цього готують серію буферних розчинів з певним значенням рН згідно таблиці 18.

Таблиця 18. Таблиця для приготування буферних розчинів

Склад суміші	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Основний мединаловий розчин, см ³	5,36	5,54	5,81	6,15	6,62	7,16	7,69	8,23	8,71
Розчин хлоридної кислоти (с=0,1моль/дм ³), см ³	4,64	4,46	4,19	3,85	3,38	2,84	2,31	1,77	1,29
Значення рН	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,0	8,2	8,4	8,6

До 10см³ кожного буферного розчину додають 0,1см³ розчину фенолового червоного ($\omega=0,02\%$) і спектрофотометрують у тих же умовах, що й дослідні проби.

На осі абсцис відкладають відповідні значення рН розчинів, а на осі ординат – величини оптичної густини розчинів. Активність холінестерази оцінюють за зміною рН дослідної проби відносно контрольної.

Лабораторна робота 4

Визначення активності креатинкінази в м'язах

Принцип методу. Під дією креатинкінази з екстракту м'язової тканини відбувається реакція між фосфокреатином і АДФ з утворенням креатину. Останній визначається колориметрично за кольоровою реакцією з α -нафтолом і 2,3-бутандіоном. Активність ферменту визначають за кількістю утвореного креатину.

Мета роботи. Визначити активність креатинкінази в м'язовій тканині. З'ясувати участь ферменту в енергетичному забезпеченні м'язового скорочення.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Центрифуга на 3000об/хв. Свіжа м'язова тканина. Фізіологічний розчин. Скляний гомогенізатор. Пробірки. Тріс-НСІ-буферний розчин (рН 7,2). Розчин фосфокреатину ($c=0,006$ моль/дм³). Розчин АДФ ($c=0,001$ моль/дм³). Розчин барій гідроксиду ($c(1/2)=0,16$ моль/дм³). Розчин цинк сульфату ($c(1/2)=0,31$ моль/дм³). Розчин α -нафтолу ($c=0,07$ моль/дм³). Розчин 2,3-бутандіону ($c=0,05$ моль/дм³). Дистильована вода.

Хід роботи. Свіжу м'язову тканину масою 500мг з 2,5см³ фізіологічного розчину гомогенізують у скляному гомогенізаторі. Гомогенат центрифугують при 3000об/хв. протягом 10хв. У надосадовій рідині визначають вміст білка за методом Лоурі.

У пробірку вносять 0,25см³ тріс-НСІ-буферного розчину (рН 7,2), 0,25см³ дистильованої води, 0,1см³ розчину фосфокреатину ($c=0,006$ моль/дм³), додають 0,1см³ надосадової рідини. У контрольну пробу замість екстракту ферменту додають дистильовану воду. Вносять 0,2см³ розчину АДФ ($c=0,001$ моль/дм³) та інкубують протягом 30хв. Реакцію зупиняють, додаючи 0,2см³ розчину барій гідроксиду ($c(1/2)=0,16$ моль/дм³) і 0,2см³ розчину цинк сульфату ($c(1/2)=0,31$ моль/дм³). При цьому осаджуються білки. Через 15-20хв. проби центрифугують при 3000об/хв. протягом 10хв. Відбирають 1см³ цієї надосадової рідини, додають свіжовиготовленого розчину α -нафтолу ($c=0,07$ моль/дм³) і 0,25см³ свіжовиготовленого розчину 2,3-бутандіону ($c=0,05$ моль/дм³). При цьому слід строго дотримуватися послідовності додавання реактивів. Пробу ставлять у темряву на 20 хв. для розвитку забарвлення, після чого спектрофотометрують при $\lambda=540$ нм у кюветах з $\ell=5$ мм.

Для визначення активності креатинкінази будують калібрувальний графік. Готують стандартні розчини креатину, що містять від 1,31 до 13,1мкг речовини в 1см³. На осі ординат відкладають значення ек-

стинкцій, а на осі абсцис – вміст креатину в пробі. Стандартні розчини обробляють так, як і дослідні проби. Активність ферменту виражають в мкг креатину на 1 мг білка у ферментному екстракті.

Лабораторна робота 5

Визначення активності амілази в сироватці крові

Принцип методу. Активність α -амілази визначають за масою крохмалю в мг, яка гідролізується ферментом, що міститься в 1 см³ сироватки крові, за 1 годину. Зменшення вмісту крохмалю в інкубаційному середовищі визначають спектрофотометричним методом після проведення кольорової реакції на крохмаль з йодом.

Мета роботи. Визначити активність α -амілази. З'ясувати роль ферменту в обмінних процесах.

Обладнання та реактиви. Центрифуга. Центрифужні пробірки. Крохмальний субстрат. Фосфатний буферний розчин, рН 7,2. Свіжа сироватка крові без ознак гемолізу. Дистильована вода. Хлоридна кислота ($c=1,0$ моль/дм³). Реактив Люголя.

Хід роботи. У дві центрифужні пробірки (дослід і контроль) вносять по 0,5 см³ розчину крохмального субстрату і по 0,3 см³ фосфатного буферного розчину, рН 7,2. У дослідну пробірку вносять 0,1 см³ свіжої сироватки крові без ознак гемолізу, а в контроль - 0,1 см³ дистильованої води. Обидві пробірки інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хв. Потім у обидві пробірки додають по 0,1 см³ розчину хлоридної кислоти ($c=1,0$ моль/дм³) для припинення ферментативної реакції і центрифугують протягом 10 хв. при 1500 об./хв. У дві мірні колби на 50 см³ вносять по 30-40 см³ дистильованої води, додають у кожную по 0,2 см³ центрифугату відповідно, по 0,1 см³ реактиву Люголя, доводять об'єм водою до 50 см³, перемішують і через 5 хв. спектрофотометрують при $\lambda=690$ нм у кюветах з $l=10$ мм проти води. Для визначення вмісту крохмалю в дослідній і контрольній пробах будують

калібрувальний графік. Для цього у п'ять мірних колб на 50см³ вносять по 30-40см³ дистильованої води, додають відповідно 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0см³ розчину крохмального субстрату, по 0,5см³ розчину хлоридної кислоти, по 0,1см³ реактиву Люголя, доводять дистильованою водою до риски, добре перемішують і через 5хв. спектрофотометрують при $\lambda=690$ нм у кюветах з $l=10$ мм проти води. На осі абсцис відкладають вміст крохмалю в пробі, а на осі ординат – оптичну густину розчину. Активність амілази сироватки крові розраховують за формулою:

$$E = \frac{(a-b) \cdot 60}{V \cdot V_1 \cdot t}, \text{ де}$$

E – активність амілази сироватки крові, мг крохмалю/1см³/1год;

a – вміст крохмалю в контрольній пробі, знайдений за калібрувальним графіком, мг;

b – вміст крохмалю в дослідній пробі, знайдений за калібрувальним графіком, мг;

t – час інкубації, хвилин;

V – об'єм сироватки крові, взятий для аналізу, см³;

V_1 – об'єм центрифугату, взятий для проведення кольорової реакції на крохмаль, см³;

60 – перерахунок на 1 годину інкубації.

Лабораторна робота 6

Визначення активності ліпази у сироватці крові

Принцип методу. Ліпази – ферменти третього класу гідролаз, підкласу естераз. Найбільше значення має панкреатична ліпаза (ЕС 3.1.1.3), яка каталізує гідроліз триацилгліцеролів. Цей фермент діє тільки на граничній поверхні вода – естер. Ліпаза, або карбоксилестераза, каталізує гідроліз переважно α -естерних зв'язків у молекулах

триацилгліцеролів. Так звана ліпопротеїнліпаза діє на емульсії триацилгліцеролів.

Мета роботи. Визначити активність ліпази у сироватці крові.

Обладнання та реактиви. Колбочки. Емульсія оливкової олії. Буферний розчин, рН 8,0. Сироватка крові. Етиловий спирт ($\omega=95\%$). Натрій гідроксид ($c=0,05$ моль/дм³).

Хід роботи. У дві колбочки вносять по 1см³ води, 1,2см³ емульсії оливкової олії і 0,4см³ буферного розчину, рН 8,0. У колбу 1 (дослідну) вносять 0,2см³ сироватки крові. Вміст колб ретельно перемішують і залишають на 6 годин. Після інкубації у обидві колби додають по 1см³ етилового спирту ($\omega=95\%$) для припинення дії ферменту, а потім у колбу 2 (контроль) ще 0,2 см³ сироватки крові. У обидві колби вносять по 3 краплини індикатора тимолфталейну і титрують розчином натрій гідроксиду ($c=0,05$ моль/дм³) до світло-блакитного забарвлення. Активність ліпази виражають в умовних одиницях по різниці в об'ємах розчинів лугу, які затрачено на титрування дослідної і контрольної проб.

Лабораторна робота 7

Визначення активності фосфорилази печінки

Принцип методу. Активність фосфорилази визначають за зменшенням вмісту в інкубаційній суміші неорганічного фосфату, який у процесі фосфоролізу включається в глюкозо-1-фосфат. Неорганічний ортофосфат визначають за методом Фіксе – Суббароу.

Мета роботи. Освоїти методику визначення активності фосфорилази за приростом глюкозо-1-фосфату, з'ясувати роль ферменту у процесах глікогенолізу.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Мірні пробірки на 20см³. Фільтри. Дистильована вода. Свіжа печінка тварин або риби. Реактив А (змішують 60 см³ фосфат-

ного буферного розчину ($c=1/15$ моль/дм³; рН 7,2), 100 см³ розчину натрій хлориду ($\omega=0,9\%$) і 1 см³ розчину магній сульфату ($\omega=0,8\%$). Трихлороцтова кислота ($\omega=20\%$). Натрій фторид ($\omega=0,9\%$). Розчин глікогену ($\omega=1\%$). Аскорбінова кислота ($\omega=0,4\%$). Амоній молібдат ($\omega=2,5\%$) у сульфатній кислоті ($c(1/2)=5,0$ моль/дм³). Стандартний розчин фосфату (КН₂РО₄ чи Na₂НРО₄), який містить 25 мкг Фосфору в 1 см³.

Хід роботи. Свіжу тканину печінки масою 100 мг гомогенізують з 5 см³ реактиву А, утвореного змішуванням 60 см³ фосфатного буферного розчину ($c=1/15$ моль/дм³; рН 7,2), 100 см³ розчину натрій хлориду ($\omega=0,9\%$) і 1 см³ розчину магній сульфату ($\omega=0,8\%$).

У дві мірні колби на 20 см³ вносять по 2 см³ отриманого гомогенату. У пробірку 1 (контроль) зразу ж додають 1 см³ розчину трихлороцтової кислоти ($\omega=20\%$). Пробірка 2 – дослідна. У обидві пробірки вносять по 1 см³ розчину натрій фториду ($\omega=0,9\%$) і по 1 см³ розчину глікогену ($\omega=1\%$). Глікоген розчиняють у гарячій воді. Обидві пробірки інкубують протягом 30 хвилин. Після закінчення інкубації у пробірку 2 додають 1 см³ розчину трихлороцтової кислоти ($\omega=20\%$) для зупинки ферментативної реакції і осадження білків. Вміст обох пробірок доводять дистильованою водою до об'єму 20 см³, перемішують і фільтрують. У мірні пробірки на 20 см³ вносять по 1 см³ отриманих фільтратів, додають у кожен по 2 см³ розчину амоній молібдату ($\omega=2,5\%$) у сульфатній кислоті ($c(1/2) = 5,0$ моль/дм³) і по 1 см³ розчину аскорбінової кислоти ($\omega=0,4\%$), доводять водою до об'ємів 20 см³, перемішують. Через 30 хвилин спектрофотометрують при $\lambda = 590$ нм у кюветах $l = 10$ мм проти контролю на реактиви. Контроль містить у 20 см³ розчину амоній молібдат і аскорбінову кислоту.

Для визначення неорганічного ортофосфату в пробах будують калібрувальний графік. Для цього у ряд пронумерованих пробірок на 20 см³ вносять відповідно 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0 см³

стандартного розчину фосфату (KH_2PO_4 чи Na_2HPO_4), який містить 25мкг Фосфору в 1см^3 . А далі проводять кольорові реакції на Фосфор так, як і в дослідній і контрольній пробах. На осі абсцис відкладають вміст Фосфору у пробах, а на осі ординат – оптичну густину розчинів. Активність фосфорилази виражають у мікромолях глюкозо-1-фосфату, який утворюється за 1хв. під дією ферменту, що міститься у 1г тканини. Розраховують за формулою:

$$E = \frac{(b - a) \cdot V \cdot V_1}{V_2 \cdot m \cdot t \cdot \mu\text{M}(\text{P})}, \text{ де}$$

E – активність фосфорилази, мкмоль глюкозо-1-фосфату/ 1 хв./1 г;

a – вміст Фосфору в контрольній пробі, знайдений за калібрувальним графіком, мкг;

b – вміст Фосфору в дослідній пробі, знайдений за калібрувальним графіком, мкг;

V – загальний об'єм фільтрату, одержаного після інкубування дослідної проби, см^3 ;

V_1 – загальний об'єм гомогенату тканини, см^3 ;

V_2 – аліквотний об'єм гомогенату, взятий для проведення ферментативної реакції, см^3 ;

m – маса тканини, взятої для дослідження, г;

$\mu\text{M}(\text{P})$ – мікромолярна маса Фосфору, мкг/моль;

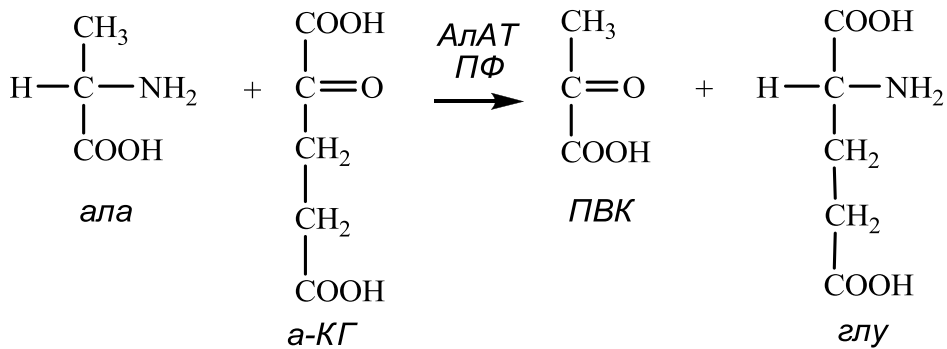
t – час проведення ферментативної реакції, хвилин.

Лабораторна робота 8

Визначення активності аланінамінотрансферази

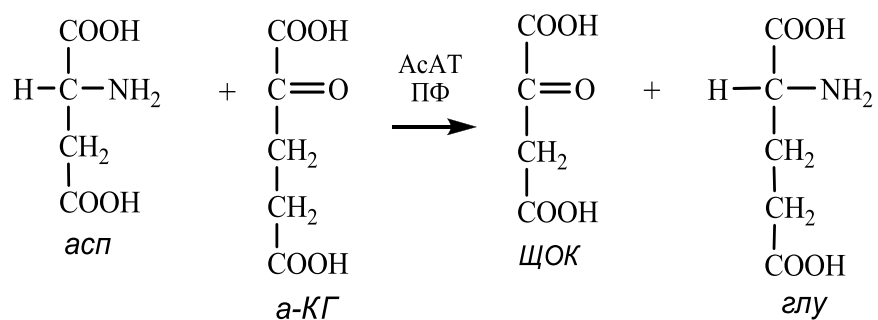
і аспаратамінотрансферази в сироватці крові

Принцип методу. Аланінамінотрансфераза (КФ 2.6.1.2.) каталізує реакцію переамінування між аланіном і α -кетоглутаровою кислотою:

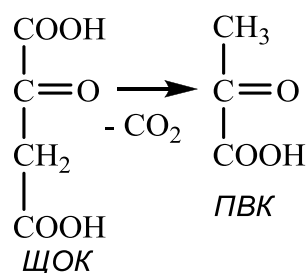


У рівноважній системі знаходяться аланін, α -кетоглутарова кислота, піровиноградна і глутамінова кислоти. Активність ферменту можна виразити кількісно за зменшенням (порівняно з початковим) рівня реагуючих речовин – аланіну або α -кетоглутарової кислоти – чи за приростом продуктів реакції – піровиноградної або глутамінової кислоти. При взаємодії кетокислот з 2,4-дінітрофенілгідразином утворюються гідразони відповідних кетокислот.

У лужному середовищі гідразони кетокислот мають коричнево-червоне забарвлення, інтенсивність якого визначають за допомогою спектрофотометра або фотоелектроколориметра. Аспаратаміно-трансфераза (КФ 2.6.1.1) каталізує реакцію переамінування між аспарагіною і α -кетоглутаровою кислотою:



В умовах даного методу утворювана в результаті реакції щавлевоцтова кислота декарбоксилюється у піровиноградну:



А далі при взаємодії з 2,4-дінітрофенілгідразиним утворюються відповідні гідрозони піровиноградної і α -кетоглутарової кислот, як і в попередньому випадку. Отже, активність обох ферментів можна виразити за приростом піровиноградної кислоти, хоча вона і не є безпосереднім продуктом реакції за участі АсАТ, але з одного моля щавлево-оцтової кислоти при декарбоксілюванні її утворюється один моль піровиноградної кислоти.

Оптична густина 2,4-дінітрофенілгідрозону α -кетоглутарової кислоти вираховується із сумарної екстинкції гідрозонів піровиноградної і α -кетоглутарової кислоти, оскільки колориметрування проводиться проти холостої проби, що містить α -кетоглутарову кислоту, і яка проходить ту ж процедуру, що і дослідні проби.

Мета роботи. Визначити активність АлАТ і АсАТ у сироватці крові тварин чи риб, поглибити знання про роль реакцій переамінування у процесах метаболізму Нітрогену в організмах.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр чи фотоелектроколориметр. Субстратно-буферний розчин для визначення АсАТ. (Це розчин, що містить аспарагінову кислоту (2,66г); α -кетоглутарову кислоту (0,04г) в 100см^3 , рН 7,4 (фосфатний буфер). Субстратно-буферний розчин для визначення АлАТ. (Це розчин, що містить аланін (1,78г) і α -кетоглутарову кислоту (0,04г) в 100см^3 , рН 7,4 (фосфатний буфер). Сироватка крові. Розчин 2,4-дінітрофенілгідразину (0,1г в 500см^3 води). Розчин натрій гідроксиду ($c=0,4$ моль/дм³).

1. Визначення активності АсАТ

Хід роботи. У пробірку вносять $0,5\text{см}^3$ субстратно-буферного розчину для визначення АсАТ. Додають $0,1\text{см}^3$ сироватки крові і інкубують 60хв. при кімнатній температурі. Після закінчення інкубації додають $0,5\text{см}^3$ розчину 2,4-дінітрофенілгідразину ($0,1\text{г}$ в 500см^3 води) і витримують 20хв. Додають 5см^3 розчину натрій гідроксиду ($c=0,4\text{моль/дм}^3$), ретельно перемішують і залишають для розвитку забарвлення на 10хв. при кімнатній температурі. Оптичну густину досліджуваних проб вимірюють на спектрофотометрі (фотоелектроколориметрі) при довжині хвилі 500-560 нм (зелений світлофільтр) у кюветі з товщиною шару 10мм проти холостої проби. Холосту пробу обробляють так само, як і дослідну, тільки сироватку крові додають після інкубації.

2. Визначення активності АлАТ

Хід роботи. У пробірку вносять $0,5\text{см}^3$ субстратно-буферного розчину для визначення АлАТ. Додають $0,1\text{см}^3$ сироватки крові і інкубують 30хв. при кімнатній температурі. Подальший хід аналізу здійснюється за тією ж схемою, що й при визначенні активності АсАТ. Розрахунок активності ферментів у сироватці крові виконують за калібрувальним графіком. Побудова калібрувального графіка. З калібрувального розчину готують ряд розведень (табл. 19).

Таблиця 19. Розведення калібрувального розчину

№ п/п	Фізіологічний розчин, см^3	Калібрувальний розчин натрій пірувагу, см^3	Субстратно-буферна суміш для АсАТ або АлАТ, см^3	Вміст піровиноградної кислоти в калібрувальній пробі		Активність (в мкмоль ПВК на 1см^3 сироватки крові за 1 годину інкубації)		Екстинкція
				мкг	мкмоль	АсАТ	АлАТ	
1	0,1	0,05	0,45	4,4	0,05	0,5	1	
2	0,1	0,1	0,4	8,8	0,1	1	2	
3	0,1	0,15	0,35	13,2	0,15	1,5	3	
4	0,1	0,2	0,3	17,6	0,2	2	4	
5	0,1	0,25	0,25	22	0,25	2,5	5	

У пробірки вносять по $0,5\text{см}^3$ розчину 2,4-дінітрофенігідразину. Далі калібрувальні проби проводять так само, як і дослідні. Прямолинійна залежність між концентрацією піровиноградної кислоти і оптичною густиною зберігається, як правило, до величини екстинкції 0,35. Холоста проба ставиться як калібрувальна, але замість калібрувального розчину додають дистильовану воду.

При побудові калібрувального графіка на осі ординат відкладають величину оптичної густини, а на осі абсцис – вміст піровиноградної кислоти калібрувальної проби (у мікромолях).

Розрахунок активності ферментів у мікромолях піровиноградної кислоти, що утворилася при інкубації 1см^3 сироватки крові протягом 1 години виконують за такими формулами:

$C \cdot 10$ – для аспартатамінотрансферази;

$C \cdot 2 \cdot 10$ – для аланінамінотрансферази, де

C – піровиноградна кислота в мкмолях, знайдена за калібрувальним графіком;

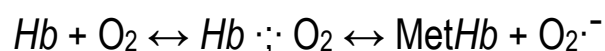
10 – коефіцієнт перерахунку на 1см^3 сироватки крові;

2 – коефіцієнт перерахунку на 1 годину інкубації.

Лабораторна робота 9

Визначення активності каталази крові

Принцип методу. Еритроцити знаходяться в середовищі з більш високою концентрацією O_2 , ніж більшість клітин, і потенційно можуть зазнавати більш руйнівної дії окисників, ніж інші клітини. Близько 0,5% гемоглобіну постійно перетворюється в метгемоглобін. Гемвмісна метгемоглобінредуктаза каталізує відновлення метгемоглобіну. Автоокиснення Hb у MetHb призводить до утворення супероксидного радикал-іона O_2^- :

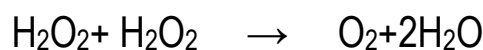


Супероксиддисмутаза в цитоплазмі еритроциту забезпечує видалення цього руйнуючого йона. Гідроген пероксид, що при цьому утворюється, розщеплюється потім каталазою еритроцитів.

Мета роботи: Визначити активність каталази еритроцитів крові перманганатометричним методом, поглибити знання про роль каталази в процесах метаболізму.

Обладнання та реактиви. Мірні колби на 100см³. Конічні колби на 100см³ Сульфатна кислота (ω=10%). Кров. Дистильована вода. Гідроген пероксид (с(1/2)=0,1моль/дм³). Калій перманганат (с(1/5)=0,1 моль/дм³).

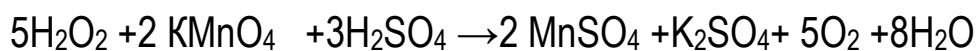
Хід роботи. Кров розводять у 1000 разів. Для цього в мірну колбу на 100см³ вносять 20-30см³ дистильованої води, додають 0,1см³ крові, перемішують. Відбувається гемоліз еритроцитів. Доводять дистильованою водою об'єм колби до риски, перемішують. У дві конічні колби на 100см³ вносять 10см³ розчину гідроген пероксиду (с(1/2)=0,1 моль/дм³). У першу колбу вносять близько 5см³ розчину сульфатної кислоти (ω=10%) для того, щоб інактивувати каталазу. У кислому середовищі каталаза не діє. Отже у першій колбі внесений гідроген пероксид розкладатися не буде. В обидві колби вносять по 1см³ розведеної гемолізованої крові. У другій колбі проводять інкубацію протягом 30 хвилин при кімнатній температурі, перемішуючи вміст колби. За участі каталази в другій колбі відбувається реакція:



каталаза

Через 30 хвилин у другу колбу додають близько 5см³ розчину сульфатної кислоти (ω=10%) для припинення ферментативної реакції. Вміст обох колб титрують розчином калій перманганату (с(1/5)=0,1моль/дм³) протягом декількох хвилин до стійкого слабо рожевого забарвлення. Відмічають об'єми робочого розчину КМnО₄, що пішли

на титрування в кожній колбі. Взаємодія H_2O_2 з KMnO_4 відбувається за рівнянням:



Активність каталази розраховується за формулою:

$$E = \frac{(V_1 - V_2) \cdot T \cdot V_4}{V_3 \cdot V_5 \cdot t \cdot \mu\text{M}}, \text{ де}$$

E – активність каталази в мкмоль H_2O_2 /1хв./1см³ крові;

V_1 – об'єм розчину KMnO_4 , $c(1/5)=0,1$ моль/дм³, що пішов на титрування гідроген пероксиду в першій колбі, см³;

V_2 – об'єм розчину KMnO_4 , $c(1/5)=0,1$ моль/дм³, що пішов на титрування гідроген пероксиду в другій колбі, см³;

V_3 – аліквотний об'єм ферментного препарату, взятий для ферментативної реакції, см³;

V_4 – загальний об'єм розведеної крові, см³;

V_5 – об'єм нерозведеної крові, взятої для дослідження, см³;

T – титр розчину KMnO_4 , $c(1/5)=0,1$ моль/дм³, за гідроген пероксидом, мг/см³;

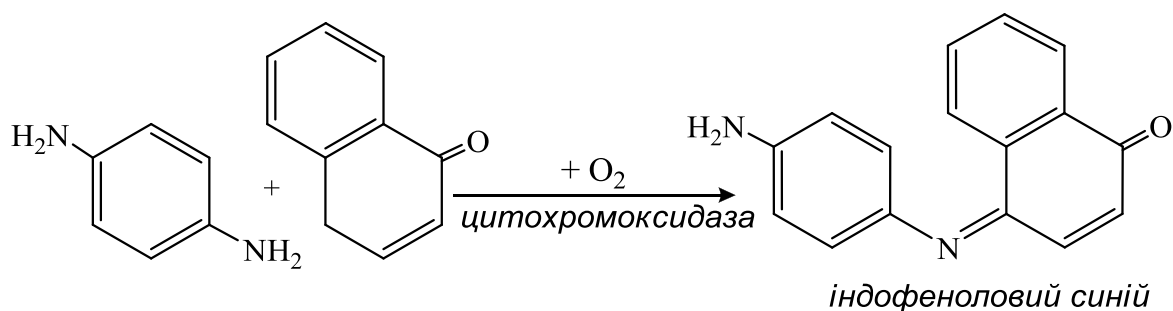
t – час інкубації, хв;

μM – мікромолярна маса еквівалента гідроген пероксиду, мкг/моль.

Лабораторна робота 10

Дослідження цитохромоксидази м'язів

Принцип методу. Цитохромоксидаза каталізує окиснення молекулярним Оксигеном не тільки цитохромів, але і деяких органічних речовин. Для виявлення цитохромоксидази використовують реактив „Наді”, що являє собою суміш спиртових розчинів α – нафтолу, p –фенілендіаміну і розчину натрій карбонату. При окисненні молекулярним Оксигеном p –фенілендіаміну і α –нафтолу за участі цитохромоксидази утворюється індофеноловий синій:



Мета роботи. Визначити наявність цитохромоксидази за допомогою реактиву „Наді”. Поглибити знання про дію цього ферменту.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Ножиці. Марля. Ступка. Гомогенізатор. Нагрівальні прилади. Фільтрувальний папір. Свіжа м'язова тканина. Дистильована вода. Реактив „Наді”.

Хід роботи. Беруть 0,5-0,7г свіжої м'язової тканини риби, подрібнюють ножицями, вміщують у ступку, гомогенізують, додаючи порціями близько 20см³ дистильованої води. Після цього воду обережно зливають. М'язову кашку переносять на фільтр з двох шарів марлі, промивають дистильованою водою до тих пір, доки промивні води не будуть не забарвленими.

Відмитий від редукуючих і водорозчинних ферментів гомогенат із м'язової тканини ділять на дві частини. Одну частину вміщують на фільтрувальний папір, а другу – в пробірку, куди додають 1см³ дистильованої води і кип'ятять протягом 1хв. Після охолодження рідину обережно зливають з пробірки, м'язову кашку переносять на фільтрувальний папір.

На обидві частини м'язового гомогенату наносять по 1-2 краплини реактиву „Наді”. Через 5-10хв. на тій частині м'язової кашки, яку не кип'ятили, з'являється синьо-фіолетове забарвлення в результаті дії цитохромоксидази м'язів на реактив „Наді”. На прокип'яченому шматочку м'язів реакція негативна внаслідок термічної денатурації ферменту.

Лабораторна робота 11

Визначення активності альдолази сироватки крові

Принцип методу. Активність альдолази визначають за приростом тріозофосфатів, які утворюються в результаті розщеплення фруктозо–1,6–дифосфату. При взаємодії тріозофосфатів з 2,4-динітрофенілгідразином у лужному середовищі утворюються відповідні гідразони, які мають червоно–коричневе забарвлення. Оптична густина розчинів пропорційна активності ферменту.

Мета роботи. Визначити активність ферменту альдолази в сироватці крові, поглибити знання про гліколітичний шлях окиснення глюкози в організмі.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Штатив із пробірками. Сироватка крові. Розчин фруктозо–1,6–дифосфату ($c=0,005$ моль/дм³) в гідразині. Хлоридна кислота ($c=2,0$ моль/дм³). Розчин 2,4–динітрофенілгідразину ($\omega=0,1\%$). Розчин натрій гідроксиду ($c=0,6$ моль/дм³).

Хід роботи. У дві пробірки вносять по $0,1$ см³ сироватки крові і в одну з них (дослідна проба) ще $0,5$ см³ розчину фруктозо–1,6–дифосфату ($c=0,005$ моль/дм³) в гідразині. Обидві проби інкубують протягом 30 хвилин. Потім в обидві пробірки додають по $0,1$ см³ хлоридної кислоти ($c=2,0$ моль/дм³) для припинення ферментативної реакції, а в пробірку з контрольною пробою ще $0,5$ см³ розчину фруктозо–1,6–дифосфату ($c=0,005$ моль/дм³) в гідразині. В обидві пробірки вносять по $0,5$ см³ розчину 2,4–динітрофенілгідразину ($\omega=0,1\%$), перемішують і залишають на 30 хвилин при кімнатній температурі, після чого додають по $4,5$ см³ розчину натрій гідроксиду ($c=0,6$ моль/дм³) і після витримування протягом 20 хвилин у темряві спектрофотометрують при $\lambda = 540$ нм у кюветі з $l = 10$ мм проти води.

Активність альдолази виражають в умовних одиницях:

$$E = (E_1 - E_2) \cdot 100, \text{ де}$$

- E – активність альдолази;
E₁ – екстинкція дослідної проби;
E₂ – екстинкція контрольної проби.

Лабораторна робота 12

Визначення активності фумаратгідратази у сироватці крові флуорометричним методом

Принцип методу. Метод ґрунтується на визначенні активності ферменту шляхом флуорометричного вимірювання кількості яблучної кислоти, яка утворюється при гідратації фумарату.

При нагріванні яблучної кислоти з β-нафтолом в концентрованій сульфатній кислоті з'являється синя флуоресценція.

Мета роботи. Освоїти методику визначення активності фумаратгідратази (фумарази) в біологічних об'єктах флуорометричним методом. Поглибити знання про цей фермент.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Мікропіпетки, дозатори. Пробірки з корками, обгорнутими алюмінієвою фольгою. Водяна баня. Розчин субстрату (субстрат складається з розчину фумарової кислоти (с=0,02 моль/дм³) в розчині Na₂HPO₄ (с=0,04 моль/дм³). рН розчину субстрату – 6,8. Сироватка крові. Льодяна вода. Реактив для флуоресценції. Розчин яблучної кислоти у розчині субстрату з вмістом в 30мкл розчину субстрату 1ммоля яблучної кислоти.

Хід роботи. В одну пробірку вносять 4,5см³ розчину субстрату і 0,5см³ сироватки крові. У другу пробірку вносять 4,5см³ розчину субстрату і 0,5см³ води (контроль). Пробірки інкубують рівно 1 годину. Після інкубації пробірки зразу вміщують у льодяну воду. У флуорометричну пробірку (входить до комплекту приладу) вносять 10см³ реактиву для флуоресценції, додають з мікропіпетки 30мкл аліквоти проби.

У другу пробірку вносять такий же об'єм 10см^3 розчину для флуоресценції і 30мкл аліквоти контролю. Ретельно перемішують вміст пробірок, закривають пробірки корками, обгорнутими алюмінієвою фольгою, нагрівають протягом 30хв. на киплячій водяній бані. Після охолодження до кімнатної температури корки знімають, знову перемішують проби, флуориметрують, використовуючи первинний світлофільтр з довжиною хвилі збудження 365нм і вторинні світлофільтри з $\lambda=465$ нм.

Флуоресценцію дослідної проби порівнюють з флуоресценцією стандартної проби. Попередньо від значення флуоресценції дослідної проби треба відняти значення флуоресценції контролю.

Для приготування стандартної проби готують розчин яблучної кислоти у розчині субстрату з вмістом в 30мкл розчину субстрату 1ммоля яблучної кислоти.

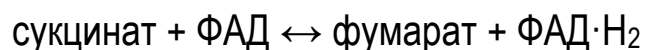
Стандартну пробу обробляють так, як дослідну і контроль. Після 30хв. нагрівання 30мкл стандартного розчину в 10см^3 розчину для флуоресценції на киплячій водяній бані 1ммоль виявиться еквівалентним $2 \cdot 10^{-8}$ молям яблучної кислоти, що утвориться протягом 1 години.

Лінійна залежність між інтенсивністю флуоресценції і кінцевою концентрацією малату спостерігається до концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³.

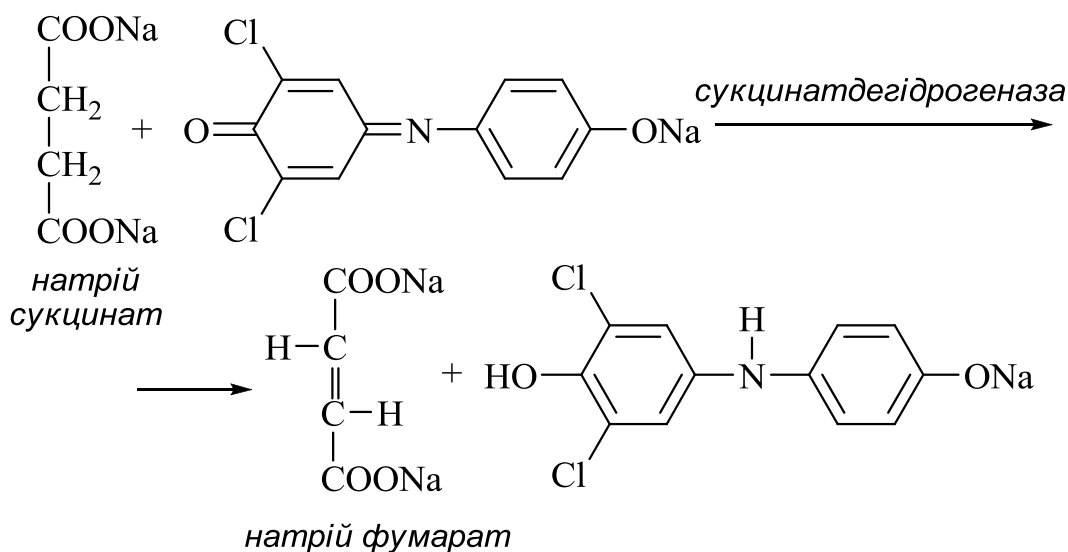
Лабораторна робота 13

Визначення активності сукцинатдегідрогенази у м'язах

Принцип методу. Сукцинатдегідрогеназа каталізує окиснення сукцинату в фумарат. Коферментом є ФАД:



Акцептором гідрогену може бути 2,6-дихлорфеноліндофенол:



Відновлена форма 2,6-дихлорфеноліндофенолу безбарвна.

Активність сукцинатдегідрогенази можна визначити за зменшенням інтенсивності забарвлення розчину, обумовленого окисленою формою 2,6-дихлорфеноліндофенолу (синє забарвлення) внаслідок відновлення частини барвника за рахунок атомів Гідрогену сукцинату.

Активність ферменту доцільно виражати в мкмоль субстрату, окисненого за 1хв. ферментом, що міститься в 1г тканини. Оскільки кількість окисненого сукцинату і кількість відновленого барвника еквівалентні (моль на моль), то за калібрувальним графіком, який відображає зв'язок екстинкції розчину з концентрацією (моль/дм³) 2,6-дихлорфеноліндофенолу, можна розрахувати кількість перетвореного субстрату.

Мета роботи. Визначити активність сукцинатдегідрогенази в гомогенаті м'язової тканини. З'ясувати участь ферменту в тканинному диханні.

Обладнання та реактиви. Фотоелектроколориметр. Ножиці. Ступка. Марля. Лійка. Фільтрувальний папір. Штатив із пробірками. Свіжа м'язова тканина. Фосфатний буфер (рН 7,4). Сукцинат (ω=5%). Натрій гідроксид (с=0,1моль/дм³). Дистильована вода. Розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу (с(1/2)=0,001моль/дм³).

Хід роботи. Свіжу м'язову тканину масою 1г подрібнюють ножицями і розтирають у ступці з невеликою кількістю води (2-3см³) протягом 1хв. Одержаний гомогенат переносять на подвійний шар марлі, розміщеної на лійці, промивають водою, переносять м'язову кашку на фільтрувальний папір і висушують. У дві пробірки вносять по 3см³ фосфатного буферу (рН 7,4). В одну з них (дослідну) додають 0,5см³ розчину сукцинату (ω=5%) і 0,5см³ розчину натрій гідроксиду (с=0,1моль/дм³). В другу пробірку (контрольну) вносять 1см³ дистильованої води.

В обидві пробірки додають по 1см³ розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу (с(1/2)=0,001 моль/дм³) і вносять по 100мг гомогенізованої м'язової тканини. Інкують протягом 20хв. Після інкубації вміст пробірок фільтрують, доводять об'єм фільтрату дистильованою водою до 5см³ і спектрофотометрують (колориметрують з червоним світлофільтром) у кюветах з l=10мм при λ=590 нм, проти контролю на реактиви (3см³ фосфатного буферу, 1см³ розчину сукцинату і 1см³ дистильованої води).

Для визначення ступеня перетворення сукцинату в ферментативній реакції будують калібрувальний графік. На осі ординат відкладають значення оптичної густини розчинів 2,6-дихлорфеноліндофенолу, а на осі абсцис – концентрації цих розчинів. Шляхом розведення вихідного розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу (1,0 ммоль/дм³) готують розчини барвника з концентраціями 0,75; 0,50; 0,25; 0,125 ммоль/дм³.

За калібрувальним графіком визначають кінцеву концентрацію розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу після ферментативної реакції.

Розрахунки активності ферменту проводять за формулою:

$$E = \frac{C_1 \cdot V_1 - C_2 \cdot V_2}{t \cdot a} \text{ мкмоль / 1хв / 1г}$$

, де

E – активність сукцинатдегідрогенази в мкмоль субстрату, що перетворився за 1хв. під дією ферменту з 1г тканини, мкмоль/1хв./1г;

C_1 – кінцева молярна концентрація еквівалента розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу після 20хв. інкубації контрольної проби, знайдена за калібрувальним графіком, мкмоль/дм³;

C_2 – кінцева молярна концентрація еквівалента розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу після 20хв. інкубації дослідної проби, знайдена за калібрувальним графіком, мкмоль/дм³;

V_1 – загальний об'єм контрольної проби, дм³;

V_2 – загальний об'єм дослідної проби, дм³;

a – маса досліджуваного м'язового гомогенату, взятого для аналізу, г;

t – час інкубації, хв.

Примітка: В залежності від очікуваної активності ферменту концентрацію 2,6-дихлорфеноліндофенолу (що вноситься до інкубаційного середовища) або час інкубації можна змінювати.

ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ФЕРМЕНТИ”

1. Наведіть відмінності між ферментами:
 - а) гідролазами і гідратазами; б) фосфатазами і фосфорилазами;
 - в) екзопептидазами і ендопептидазами; г) пепсином і катепсином;
 - д) трипсином і хімотрипсином; е) трипсином і трипсиногеном.
2. Із запропонованих тверджень виберіть правильні:
 - а) коферментом фосфорилази є піридоксальфосфат;
 - б) відносна молекулярна маса фосфорилази b дорівнює половині відносної молекулярної маси фосфорилази a ;
 - в) активація фосфорилази b у фізіологічних умовах здійснюється за допомогою ферменту кінази фосфорилази b .
3. До розчину чистого ферменту, у якому міститься 1,0 мг білка, додали 0,342 мкмоль аргентум нітрату, чого було достатньо для повної інактивації ферменту. Розрахуйте мінімальну відносну молекулярну масу ферменту.
4. Існує ряд важливих динуклеотидів, що містять у своєму складі аденілову кислоту. Назвіть ці динуклеотиди і вкажіть на функції кожного з них.
5. АТФ є субстратом для ряду трансфераз, поставляючи для відповідних реакцій: а) ортофосфат; б) пірофосфат; в) аденозин; г) аденілову кислоту.
6. Складіть рівняння цих реакцій, використовуючи наступні сполуки: глюкозу, рибозо-5-фосфат, метіонін, ФМН. Назвіть трансферази, які каталізують вказані реакції.
7. Обґрунтуйте твердження:
 - а) α -глікозидаза прискорює реакції гідролізу α -глікозидів, у тому числі мальтози;
 - б) усі відомі амілази діють тільки на α -1,4-глікозидні зв'язки;

в) сахараза каталізує гідроліз сахарози, що супроводжується зміною кута обертання площини поляризації поляризованого світла з правого на лівий (явище інверсії обертання);

г) аміло-1,6-глікозидаза виявлена тільки в тваринних тканинах.

8. У молекулі каталази є чотири атоми Феруму. Молекулярна активність каталази становить 5млн. Скільки молекул гідроген пероксиду розкладається за участі одного атома Феруму у складі ферменту за 1 хвилину?

9. Складіть схему перетворень:

Аспарагін → аспарагінова кислота → фумарова кислота → яблучна кислота.

10. Вкажіть ферменти, що каталізують відповідні стадії процесу.

11. Обґрунтуйте твердження:

а) аскорбатоксидаза і каталаза є геміновими ферментами;

б) оксидази каталізують перенесення атомів Оксигену в молекулу органічної речовини;

в) пероксидаза є флавіновим ферментом.

12. Активність аланінамінотрансфери визначають спектрофотометричним (колориметричним) методом за кількістю дінитрофенілгідразону піровиноградної кислоти. Піровиноградна кислота утворюється в реакції переамінування α -кетоглутарової кислоти й аланіну. Розрахуйте активність аланінамінотрансфери у вихідній витяжці, якщо відомо, що інкубацію проводили протягом 30хв. з 1см³ розведеної в 50 разів витяжки ферменту, причому отримали кількість дінитрофенілгідразону, що відповідає 44мг піровиноградної кислоти.

8. ВІТАМІНИ

Вітаміни представляють групу різноманітних за будовою хімічних речовин, які беруть участь у багатьох реакціях клітинного метаболізму. Вони не є структурними компонентами живої матерії і не використовуються у якості джерел енергії. За класифікацією розрізняють жиророзчинні (А, D, Е, К) та водорозчинні (Н, С, Р, U, група В) вітаміни.

У ряді випадків до організму надходять попередники вітамінів – провітаміни, які потім у організмі перетворюються в активні форми вітамінів.

8.1. Жиророзчинні вітаміни

Вітамін А необхідний для росту і розмноження клітин, нормальної діяльності органу зору, сприяє нормальному обміну речовин. При А-авітамінозі у першу чергу уражується орган зору. Зменшується опір інфекційним хворобам. Зоровий пігмент у деяких ссавців, птахів та рептилій, має рожеве забарвлення і називається родопсином. До складу зорових пігментів входить альдегід вітаміну А – ретиналь, зв'язаний з білком. Вітамін А₁ входить до складу родопсину.

Вітамін А – один з небагатьох вітамінів, який може накопичуватися в організмі.

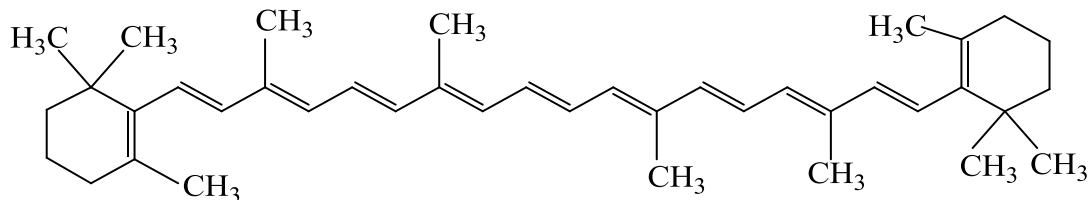
Будова, властивості, біологічна роль каротиноїдів та вітамінів групи А

Каротиноїди – жовті й червоні пігменти рослин і тварин. За хімічною будовою вони є поліізопреноїдами, що містять залишки ізопрену. Всі каротиноїди мають від 7 до 13 подвійних зв'язків. Спряженість подвійних зв'язків обумовлює забарвлення каротиноїдів.

Найбільш поширеними в природі пігментами є каротини, серед яких найбільше значення мають α - , β - і γ - каротини. Деякі водорості і мікроорганізми у невеликих кількостях містять δ - і ϵ -каротини.

За наявності в молекулах подвійних зв'язків каротини можуть бути *цис*- і *транс*-ізомерами. Природним каротиноїдам більш властива *транс*-конфігурація.

Природний β -каротин має таку будову:



Каротиноїди мають довгі поліізопренові ланцюги, що мають систему спряжених подвійних зв'язків; на кожному з кінців цих молекул знаходяться заміщені циклогексенові кільця. Серед каротиноїдів, які виявлені у фотосинтезуючих клітинах, є β -каротин, спірилоксантин, лютеїн.

Лютеїн і ксантофіли є діоксипохідними β -каротину. Обидві їх гідроксильні групи з'єднані з Карбоном циклогексенових кілець. Ці сполуки вітамінну активність не виявляють. Ксантофіли містяться в хлоропластах листків. Лютеїн також міститься в хлоропластах і бере участь у процесі фотосинтезу.

Лікопен не має циклогексенових кілець на кінцях поліізопреноїдного ланцюга. Він є попередником β -каротину. Лікопен має жовтогаряче або червоне забарвлення. Забарвлення багатьох рослин обумовлене присутністю саме цього пігменту. А-вітамінну активність лікопен також не виявляє.

Ксантофіл, зеаксантин – оксипохідне β -каротину. Міститься в насінні кукурудзи і обумовлює його жовте забарвлення. Похідні зеаксантину знаходяться в багатьох інших плодах і квітках. Зеаксантин має лише одну гідроксильну групу, приєднану до циклогексенового кільця.

Бурий пігмент діатомових водоростей – фукоксантин. На одному кінці молекули він містить епоксид, що утворився під дією кисню, а на іншому – аленове угруповання $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_3) \text{CH}_2\text{OH}$. Каротиноїди з водоростей – віолаксантин – має епоксидні групи в циклічних структурах на обох кінцях молекули, та алоксантин – має на обох кінцях симетричної молекули ацетиленові потрійні зв'язки.

Каротиноїди містяться практично у всіх органах і тканинах рослин і виконують важливі біохімічні функції. Вони беруть участь у процесі фотосинтезу, забезпечуючи поглинання рослиною світлової енергії у синій області видимого спектру. Крім того, вони відіграють певну роль у процесах розмноження рослин, попереджують розпад хлорофілу під дією молекулярного кисню, виконують антиоксидантні функції.

Каротини легко руйнуються під дією сонячного світла, тому у висушених на сонці водоростях їх значно менше, ніж у зеленій масі.

В організмах тварин під дією ферменту каротинази молекула β -каротину легко розщеплюється за місцем центрального подвійного зв'язку на дві молекули вітаміну A_1 .

Наявність великої кількості подвійних зв'язків надає каротиноїдам високої біологічної активності, яка проявляється у гальмуванні процесів пероксидного окиснення ліпідів і визначає такі їх біологічні функції, як попередження передракових і вікових пошкоджень, радіаційних уражень, серцево-судинних захворювань, тощо.

Регуляторні ефекти каротиноїдів обумовлені їх здатністю проникати в мембранні фосфоліпідно – білкові структури.

По мірі збільшення довжини полієнового ланцюга зростає ступінь його стабілізації і збільшується антиоксидантна активність. На рівень антиоксидантної активності каротиноїдів впливає також просторова орієнтація кільцевих груп. Так, каротиноїд лікопін, який має 11 подвійних зв'язків у вигляді планарної структури, проявляє майже

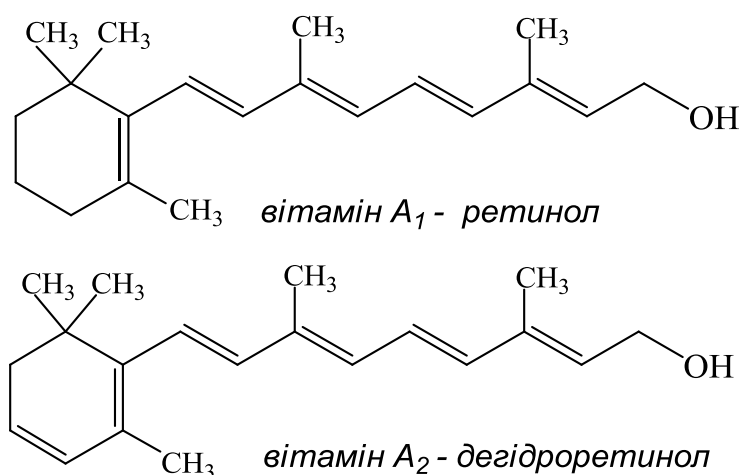
вдвічі більшу антиоксидантну активність, ніж β -каротин. При модифікації кільцевих структур кето- і гідроксигрупами (лютеїн, кантаксантин, зеаксантин і астаксантин) відбувається немов би збільшення жорсткої полієнової структури і зниження кількості каротиноїдів, необхідних для гальмування пероксидного окиснення ліпідів. Антиоксидантна активність каротиноїдів збільшується у присутності інших жиророзчинних антиоксидантів – α -токоферолу, убіхінону.

У комплексі з триацилгліцеридами забезпечується рівномірне розподілення каротиноїдів у кровотоку і більша доступність до засвоєння.

Гідробіонти морських і прісноводних акваторій, особливо такі безхребетні як ракоподібні, моллюски, голкошкірі (морські огірки, морські їжаки) мають значний вміст каротиноїдів. З гонад морського огірка *Cucumaria fondosa* виділяють концентрат каротиноїдів, який являє собою композицію каротиноїдів, триацилгліцеролів, вітаміну Е, поліненасичених жирних кислот.

У синьо-зелених водоростях виявлено близько 30 різних внутрішньоклітинних пігментів, які відносяться до хлорофілів, фікобілінів, каротиноїдів. Різновиди пігментних систем забезпечують цим водоростям стійкість до екстремальних впливів, до тривалого затінення і аеробіозу. Основними каротиноїдами водоростей є α - і β -каротини, лютеїн, зеаксантин, фукоксантин, віолаксантин та ін.

Біологічна активність β -каротину в два рази вища, ніж активність α - і γ -каротинів. Це пояснюється тим, що з одної молекули β -каротину в організмі може утворитися дві молекули вітаміну А, в той час як із молекул двох інших каротинів (α і γ), які мають у своїй структурі не по два, а по одному β -іононовому кільцю, утворюється тільки одна молекула вітаміну А.



У природних джерелах найбільш розповсюдженим є вітамін A₁ – ретинол. Він міститься в організмі всіх тварин і головним чином морських і прісноводних риб. Хоча вітамін А міститься у всіх органах, тканинах і в крові різних видів риб (морського окуня, тріски, акули, палтуса, камбали), а також морських тварин (кити, моржі, тюлені, нерпа), але найбільш багато його в жирах печінки і внутрішніх органів. Оскільки вітамін А концентрується в печінці, риби-хижаки мають його в надлишку, що і було доведено при порівнянні вмісту вітаміну А в м'ясі хижаків, рослиноїдних і коралових риб Червоного моря і водоймищ Європи.

Прісноводні риби мають значний вміст вітаміну A₂ (дегідроретинолу), тоді як морські риби містять більше вітаміну A₁ (ретинолу).

Вміст вітаміну A₂ у печінці щуки складає у середньому 4180МО/г, в печінці окуня – 22000 МО/г. Вміст вітаміну A₂ у прісноводного вугра знаходиться у межах від 9000 до 27000 МО/г; у печінці оселедця – від 2700 до 12880 МО/г; палтуса – від 1510 до 22700 МО/г; скумбрії – 1030 до 56340 МО/г. Найбільше вітаміну А міститься у м'язах тунця – 9000 мг % і японського вугра – 744 мг % (МО – міжнародна одиниця – відповідає 0,3мкг ретинолу).

Найбільш великі печінки мають тріскові риби (12–14 %), акули (28–29 %), скати (8–9 %) від маси цілої риби.

Вміст вітамінів у рибах великою мірою залежить від їх вмісту в кормах. Риби здатні перетворювати каротини їжі у вітамін А. Похідні каротину, що містять Оксиген, наприклад астаксантин, також можуть перетворюватись у вітамін А.

Вітамін А має у своєму складі циклічні ненасичені спирти з великою кількістю пов'язаних між собою подвійних зв'язків.

Вітамін А має декілька вітамерів: А₁, А₂, А₃, що існують у вигляді ряду геометричних ізомерів. Вітамін А₂ дещо відрізняється за своєю структурою від вітаміну А₁ тим, що у своєму β-іоновому кільці має не один, а два подвійних зв'язки.

Це кристалічні речовини лимонно–жовтого кольору, з температурою плавлення від 59 до 64°C (у залежності від виду циклічного ізомеру), добре розчинні в жирах і жиророзчинниках: бензині, діетиловому етері, хлороформі, ацетоні та ін. Завдяки наявності спиртової групи вітамін А може утворювати естери з жирними кислотами.

Вітамін А являє собою жовті пластинчасті кристали, температура плавлення – 8°C. Вітамін А розчиняється в більшості органічних розчинників і нерозчинний у воді. Дуже чутливий до дії окисників і ультрафіолетових променів. Його стійкість підвищується у присутності вітаміну Е.

Було встановлено, що вітамін А, який міститься у печінці прісноводних риб, відрізняється від вітаміну А₁, що міститься в печінці морських риб, за деякими фізико–хімічними константами. Наприклад, його максимум поглинання визначається у межах 345–350нм замість відомого максимуму для вітаміну А – 328нм. Ця біологічно активна речовина була названа вітаміном А₂. Біологічна активність його складає 40 % активності вітаміну А₁.

У печінці китів була виявлена речовина, близька за властивостями і дією до вітаміну А, але мала спектр поглинання – 290нм. Ця речовина була названа вітаміном А₃. Для того, щоб речовина мала високу А-вітамінну активність, в її структурі повинно міститися β-іононове кільце, боковий ланцюг, що складається з 11 атомів Карбону і має чотири спряжені подвійні зв'язки; дві метильні групи при третьому і сьомому атомах Карбону; гідроксильну, альдегідну або карбоксильну кінцеву групу. Максимальну біологічну активність мають сполуки в транс-формі.

Вітамін А необхідний для росту і розмноження клітин, сприяє нормальному обміну речовин. Він необхідний для нормальної діяльності органу зору. При А-авітамінозі у першу чергу уражується орган зору, зменшується опір інфекційним хворобам.

Зоровий пігмент у морських риб, а також у деяких ссавців, птахів та рептилій, має рожеве забарвлення і називається родопсином, а у багатьох прісноводних риб він фіолетовий і називається порфіропсином. Спектр максимального поглинання складає у родопсину 500нм, а у порфірину – 540нм. У глибоководних морських риб пігменти сітківки ока мають золотисте забарвлення із спектром поглинання менше 500нм; їх називають хризопсином. До складу пігментів входить альдегід вітаміну А – ретиналь, зв'язаний з білком. Вітамін А₁ входить до складу родопсину і хризопсину, а вітамін А₂- порфіропсину.

Було встановлено, що зоровий пігмент морських риб містить вітамін А₁; у риб, що пристосовані до існування в умовах значних коливань солоності води, мігруючих із моря в ріки і навпаки – містить суміш вітамінів А₁ і А₂; прісноводних – тільки А₂. Разом з тим слід зазначити, що існує багато відхилень від такої схеми, наприклад, евригалінна олвайф *Pomolobus pseudoharengus* і морські губани *Labridae* містять чистий порфіропсин, а у прісноводних видів вітамін А₁ зустрічається так же часто, як і вітамін А₂.

У філогенетичному аспекті спектр поглинання родопсину в різних риб подібний у дуже близьких видів. Із збільшенням глибини місця перебування у різних видів риб спектр поглинання зорових пігментів зсувається в бік блакитного кольору і чутливість очей риб до цієї частини спектру збільшується. Світло, що проникає на глибину, має довжину хвилі близько 475нм, саме тому глибоководні риби краще за все адаптовані саме до цієї частини спектру.

Золотисті пігменти глибоководних морських риб, як і родопсин, базуються на вітаміні A_1 . таким чином не глибина визначає природу пігментів у риб, а довжина хвилі світла, яке проникає на дану глибину.

Незважаючи на те, що наявність пігментів, які містять вітаміни A_1 і A_2 , має спадковий характер, їх співвідношення в одній особині не може бути ідентифіковане генетично тому, що залежить від освітленості і може змінюватись протягом онтогенезу. Все ж існують межі зміни співвідношення пігментів, які, очевидно, визначені генетично: вміст пігментів, до складу яких входить вітамін A_1 , ніколи не буває нижче 15% і вище 85% від загального вмісту. Вміст зорових пігментів, заснованих на вітаміні A_1 , збільшується із збільшенням освітленого періоду.

Слід зазначити, що зорові пігменти, які містять і A_1 , і A_2 . були знайдені в стадних риб, тоді як види, що характеризуються територіальною поведінкою, мають єдину форму пігменту. Наявність парних пігментів дозволяє рибі змінювати свою спектральну чутливість і тому властиве видам, які займають мінливі екологічні ніші. В ріках чи морському прибережжі спектр світла часто змінюється в залежності від мутності і наявної рослинності. Риби з парними пігментами добре пристосовані до таких змін. Але багато видів риб, що живуть в цих же біотопах, мають тільки один пігмент.

У деяких видів риб очі взагалі дегенерують, наприклад у міксини, глибоководного ската і деяких риб, що населяють печери, у яких на місці очей знаходиться луска.

Вітаміни групи D – це безкольорові кристали, плавляться при температурі 115-116°C, не розчиняється у воді, але добре розчиняється у жирах та розчинниках жирів (хлороформі, бензені, ацетоні, спирті). Швидко руйнуються під дією окисників та мінеральних кислот.

Термін „вітамін D” включає групу сполук, подібних за хімічною будовою, що є похідними стеролів, які виконують однакову функцію – регулюють обмін Кальцію і Фосфору в організмі тварин. Вітамін D відіграє виключно важливу роль у нормальному формуванні кісткового скелета.

Вітамін D – це група сполук, які утворюються при опроміненні сонячним світлом $\Delta^{5,7}$ - ненасичених стеролів, таких, як ергостерол і 7-дегідрохолестерол. При опроміненні ергостеролу утворюється ергокальциферол (вітамін D₂), а опромінення 7-дегідрохолестеролу – холекальциферол (вітамін D₃). Крім того, в ході фотохімічних реакцій утворюються і інші сполуки, деякі з яких токсичні. Тому ступінь опромінення ергостеролу і 7-дегідрохолестеролу повинен бути контрольований. Переопромінення призводить до накопичення токсичних сполук.

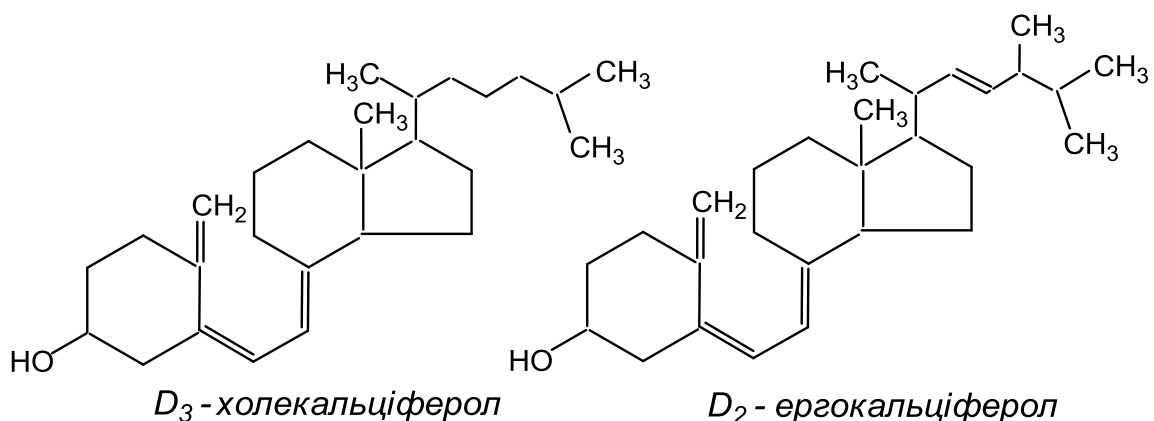
З усіх природних стеролів мають фізіологічну активність вітаміну D₂ після їх опромінення ультрафіолетом лише ті стероли, в яких є така ж кільцева система, як і в ергостеролі.

Для проявлення активності важливе значення має структура кільця B ергостеролу, при розриві якого внаслідок ультрафіолетового опромінення утворюється третій подвійний зв'язок. Подвійний зв'язок у боковому ланцюгу ергостеролу менш суттєвий для фізіологічної активності. Так, при гідруванні бокового ланцюга вітаміну D₂ утво-

рюється вітамін D₄ (дігидроергокальциферол), активність якого тільки вдвічі нижча активності вітаміну D₂.

Холестерол у кільці В має тільки один подвійний зв'язок, і при УФ опроміненні це кільце розривається даючи два подвійних зв'язки, внаслідок чого така структура не проявляє D-вітамінної активності. Для того, щоб холестерол після УФ опромінення перетворився у речовину з D-вітамінною активністю, потрібно перетворити його в 7-дегідрохолестерол, в молекулі якого в кільці В з'являється другий подвійний зв'язок. Тоді після опромінення 7-дегідрохолестеролу і розриві кільця В буде структура з трьома подвійними зв'язками, як і у вітаміні D₂. Такий вітамін називається D₃- холекальциферол. Активність вітаміну D₃ майже у півтора рази вища, ніж активність вітаміну D₂.

Активність вітаміну D виражається в міжнародних одиницях (МО). Одна міжнародна одиниця містить 0,000025мг чистого вітаміну D₂. Всі вітаміни групи D (D₂, D₃, D₄, D₅, D₆, D₇) відрізняються між собою лише за будовою бокового ланцюга. Термін „вітамін D₁” не вживається. Це є продукт опромінення ергостеролу з домішкою люмістеролу. Вітамін D₂ – це опромінений ергостерол, очищений від усіх домішок.



Вітаміни D₂ і D₃ являють собою безбарвні кристали, нерозчинні у воді з температурами плавлення 115-117°C і 84-85°C відповідно, не

стійкі при зберіганні. При нагріванні вище 125°C відбувається руйнування вітаміну D₂. У нейтральному та лужному середовищі вітамін D₂ стійкий до нагрівання, у кислому середовищі руйнується. Наявність у жирових розчинах вітаміну D₂ невеликих кількостей токсистеролу й інших продуктів опромінення ергостеролу знижує його стійкість.

Вітамін D₂ дає різні кольорові реакції. Із стибій(III) хлоридом у хлороформі він дає жовтогаряче, жовте забарвлення. Є і інші кольорові реакції: з пірогаловою кислотою, трихлороцтовою кислотою, сахарозою, ароматичними альдегідами. Всі ці реакції можна застосувати як для якісного, так і для кількісного визначення вітаміну.

Вітамін D регулює всмоктування Ca²⁺ з кишечника і мобілізацію Ca²⁺ з кісток. Оскільки сам вітамін діє повільно, очевидно, він перетворюється у більш активні речовини.

Було встановлено, що вітамін D₃ транспортується в печінку, де перетворюється в 25-оксихолекальциферол під дією мітохондріальної ферментної системи, яка діє за участі НАДН·Н⁺ і молекулярного O₂. 25-Оксихолекальциферол далі гідроксилується в нирках з утворенням 1,25-діоксихолекальциферолу. 1,25-Діоксихолекальциферол підсилює транспорт Ca²⁺ в кишечнику, а також сприяє перетворенню білка клітин слизової кишечника в кальційзв'язуючий білок. Вважають, що кальційзв'язуючий білок і Ca²⁺-залежна АТФ-аза беруть участь у транспортуванні Ca²⁺ в кишечнику. 1,25-Діоксихолекальциферол значно швидше, ніж холекальциферол чи 25-оксихолекальциферол викликає мобілізацію Ca²⁺ із кісткової тканини.

При надлишку в організмі вітаміну D спостерігається демінералізація кісток. Кістки ламаються, у сироватці крові значно підвищується концентрація Ca²⁺ і фосфату; це призводить до кальцифікації багатьох м'яких тканин і утворення каменів у нирках. Під дією кисню

вітамін окиснюється, а світло перетворює його в досить отруйний токсикостерол.

Найбільше вітаміну D міститься в шкірі ссавців і в риб'ячому жирі. Вітамін D₃ міститься в основному в печінці риб. В жирі морського окуня міститься від 20 до 800 МО/г вітаміну D₃; у тунця - від 1000 до 4000 МО/г цього вітаміну, а у річкового окуня вміст вітаміну D₃ складає до 11 МО/г печінки. В м'язах риб холекальциферол міститься в незначних кількостях. Максимальний вміст його (до 30мг%) виявлено в атлантичних оселедцях, скумбрії, тунці.

Еласмобранхії відрізняються від костистих риб тим, що їх скелет складається з хряща або окостенілого хряща. Вітамін D необхідний для нормального росту і кальцифікації кісток. Еласмобранхії, які не мають кісткового скелета, можуть жити без цього вітаміну. У них майже відсутній вітамін D, вміст якого в 1г жиру печінки становить менше 25 МО.

Наявність вітаміну D у жирі печінки риб не знаходить пояснення. Якщо виходити з того, що вітамін D може утворюватися тільки при опроміненні стеролів сонячним світлом, то в печінку риб вітамін може попадати тільки з їжі. Джерелом вітаміну в жирі печінки риб у такому разі міг бути планктон, який знаходиться біля поверхні води і опромінюється сонячним світлом. Проте, у планктоні вмісту вітаміну D не виявлено.

Токоферолі, вітаміни групи E. У 1936 р. Еванс із співробітниками виділили з олії зародків пшениці речовину, яка виліковувала тварин від безпліддя. Ця речовина пізніше була названа вітаміном E або токоферолом.

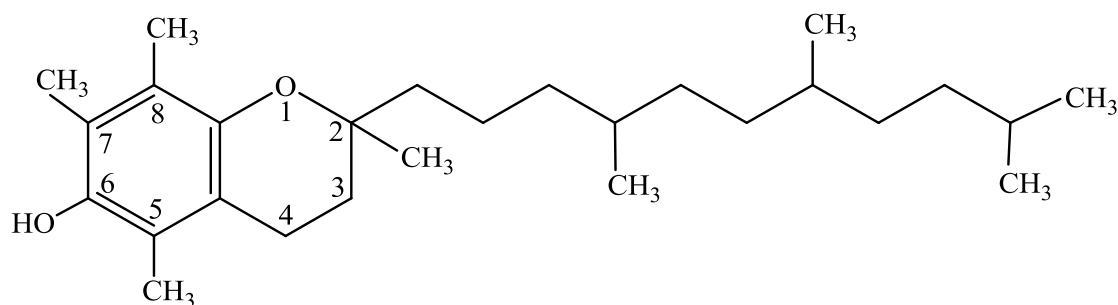
Вітамін E міститься в рослинних оліях. Особливо багато його в олії пшеничних зародків (25-30мг % вітаміну E, з яких 58% складає α-токоферол). Він міститься також в листі салату, люцерни, в незначних

кількостях у жовтку яєць, вершковому маслі. У тканинах тварин токоферолів мало. Риб'ячий жир токоферолів не містить.

Із природних джерел виділено сім ізомерних токоферолів, які мають різну ступінь біологічної активності. Найбільше значення мають α -, β -, γ -, δ -токофероли.

За хімічною будовою токофероли є похідними токолу [2-метил-2-(4',8',12'-триметилтридецил)хроман-6-ол]. Провітамінами вітаміну Е є похідні бензопірану, токофероли. Токоферол було отримано з олії зародків пшениці. У продуктах харчування встановлено наявність трьох близьких за хімічною структурою токоферолів – α -, β -, γ - токоферолів, які мають вітамінну активність і відрізняються одне від одного за кількістю і розташуванням у їх циклічному компоненті метильних груп. Токоферол має у своєму складі циклічний компонент – триметилгідрохінон і спирт – фітол, що входить також до складу хлорофілу.

α -Токоферол (5,7,8 – триметилтокол) має таку будову:



β – токоферол має Н у положенні 7;

γ – токоферол має Н у положенні 5;

δ – токоферол має Н у положенні 5 і 7.

У положенні 2 ядра хроману – метил і боковий ланцюг, що являє собою залишок фітолу. Відрізняються токофероли між собою тільки кількістю та розташуванням метильних груп у хромановому ядрі.

Залишок фітолу в молекулі токоферолу має велике значення для проявлення біологічної активності. Якщо боковий ланцюг вкоротити

або відщепити, біологічна активність вітаміну зникає. Заміна метильних груп на інші радикали, наприклад етильні, призводить до різкого зниження біологічної активності. Забезпечує прояв біологічної активності також наявність у положенні 6 вільної гідроксильної групи.

Токофероли – олійсті речовини, нерозчинні у воді і розчинні в органічних розчинниках. Для них характерна оптична активність, обумовлена наявністю асиметричного атома Карбону. Механізм дії вітаміну Е пов'язаний з його антиоксидантними властивостями та перенесенням електронів в окисно-відновних реакціях. Вітамін Е є дуже важливим внутрішньоклітинним агентом, що оберігає від окиснення жири та інші легко окиснювальні сполуки, у тому числі оберігає від окиснення каротини і вітамін А. Також вітамін Е функціонує як переносник електронів у окисно-відновних реакціях, пов'язаних із запасанням вивільненої при цьому енергії. Токофероли нестійкі до окисників. При дії HNO_3 у спиртовому розчині відбувається окиснення у положенні 5 з утворенням о-токохінону.

Маючи вільний фенольний гідроксил, токофероли можуть утворювати естери з фосфатною, оцтовою, янтарною, бензойною і іншими кислотами. Ці естери є кристалічними речовинами. Естери токоферолу в організмі можуть розщеплюватись з утворенням вільного токоферолу. Вони мають більшу Е-вітаміну активність, ніж сам токоферол, бо більш стійкі до окиснення.

Токофероли стійкі до нагрівання. При нагріванні їх до 170°C на повітрі і до 250°C у вакуумі їх біологічна активність зберігається. За відсутністю кисню і світла препарати вітаміну Е можуть зберігатися в олійних розчинах впродовж декількох років без втрати їх активності.

Якщо прийняти біологічну активність найбільш активного α -токоферолу за 100%, то активність β -токоферолу складає 40-50%, γ -токоферолу – 8%, δ -токоферолу – 1%.

Недостатність вітаміну Е у тварин викликає м'язову дистрофію. М'язи поглинають з надмірною швидкістю кисень, особливо скелетні м'язи і серцевий м'яз, виявляються аномалії в мембранах ендоплазматичного ретикулуму. Вважається, що безпосередньо причиною смерті при Е-авітамінозі є руйнування лізосомних мембран.

Загальноприйнята думка про функції токоферолів така, що вони є антиоксидантами за відношенням до ненасичених ліпідів. Токофероли можуть захищати ліпідні мембрани від дії вільних радикалів, які утворюються у процесах пероксидного окиснення ліпідів. Токофероли інгібують ці процеси; імовірно радикали захоплюються токоферолами, з якими вони утворюють більш стійкі радикали токоферолу.

Одним з негативних наслідків пероксидного окиснення ліпідів вважається утворення малонового альдегіду в результаті обумовленого радикалами розриву полієнових кислот.

При недостатності вітаміну Е у тварин спостерігається також дегенерація епітелію ниркових каналців, поява в депо ліпідів коричневого пігменту, якщо до складу раціону входять ненасичені ліпіди (наприклад, трісковий жир). Інколи розвивається некроз печінки, коли раціон містить значні кількості ненасичених ліпідів. Іншим проявом недостатності вітаміну Е є гемоліз еритроцитів.

Збільшення споживання кисню м'язами тварин при недостатності вітаміну Е зв'язано, імовірно, з пероксидним окисненням ненасичених жирних кислот. В інших тканинах, наприклад у печінці, це призводить до порушення структури мітохондрій і зниження дихання. Пероксидне окиснення ненасичених кислот в ендоплазматичному ретикулумі м'язових клітин призводить до вивільнення лізосомних гідролаз, в результаті розвивається м'язова дистрофія.

Легко окиснюючись, токофероли виступають як антиоксиданти, захищаючи каротиноїди, вітамін А й інші речовини від окиснення. То-

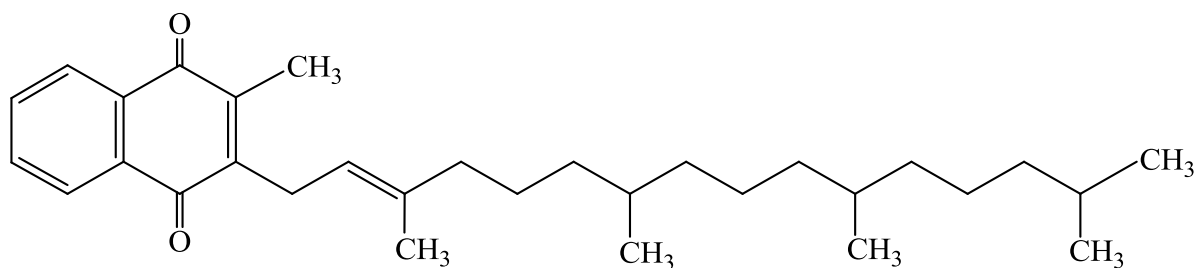
кофероли мають значення не тільки для нормальної функції розмноження, а також беруть участь у окисно-відновних реакціях організму.

Для виявлення токоферолів використовують їх властивість легко окиснюватись. При цьому в залежності від характеру окисника утворюються продукти реакції, що мають різне забарвлення. На інтенсивності забарвлення їх ґрунтуються і методи кількісного визначення токоферолів.

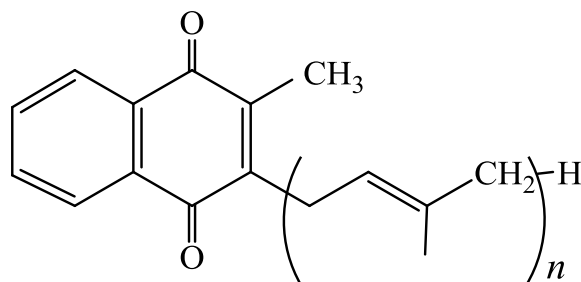
Вітаміни групи К. У природі зустрічаються вітамін K_1 – філохінон і вітамін K_2 – менахінон. В 1929 році Г. Дем виявив, що один з необхідних компонентів корму курчат є „антигеморагічний фактор”, який забезпечує швидке згортання крові. Цю жиророзчинну речовину пізніше було названо вітаміном К. Чистий вітамін був виділений із люцерни в 1939 році. Незабаром було встановлено, що вітамін у природі є в двох формах: філохінону (вітамін K_1) і менахінону (вітамін K_2). Філохінони мають у боковому ланцюгу чотири ізопреноїдні ланки і зустрічаються у рослинах; у тварин і бактерій є менахінони з п'ятьма ізопреноїдними ланками. Вітамінну активність проявляє і синтетичний менадіон (вітамін K_3), а також синтетичний аналог цих вітамінів – вікасол, який був одержаний в 1942 році О.В.Палладіним і М.М.Шемякіним. Вікасол є водорозчинним аналогом вітамінів К.

Вітамін K_1 являє собою жовту маслянисту рідину, нерозчинну у воді, нестійку при нагріванні в лужному середовищі і при ультрафіолетовому опромінюванні. Вітамін K_2 – кристалічна речовина жовтого кольору, легкоплавка, не розчиняється у воді.

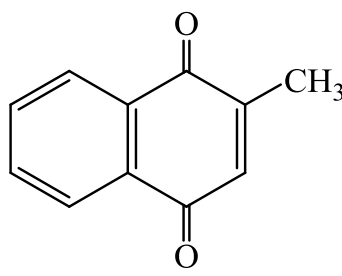
Вітамін К всмоктується разом з ліпідами в тонкому кишечнику. Ці процеси активуються жовчю. Біля половини введеного в організм вітаміну депонується в мікросомах печінки. Частина вітаміну депонується в тканинах міокарда, в ретикулоендотеліальній системі.



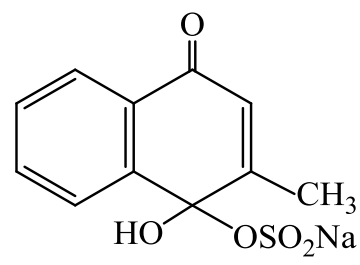
Філохінон, K_1



Менахінон, K_2



Менадіон, K_3



Вікасол

Вітамін К бере участь у процесах згортання крові. Недостатність вітаміну К призводить до пониження вмісту протромбіну, деяких факторів згортання крові (факторів II, VII, IX, X) і одного плазматичного білка. Було виявлено, що дефектний протромбін, що утворюється в печінці при відсутності вітаміну К, не може зв'язувати Ca^{2+} , які необхідні для подальшого зв'язування протромбіну з фосфоліпідами і активації його в тромбін. Функція вітаміну К полягає в тому, що він сприяє включенню додаткових карбоксильних груп у залишки глутамату з утворенням γ -карбоксиглутамату, який необхідний для зв'язування Ca^{2+} в перетвореному протромбіні.

Вітамін К є простетичною групою ферменту менадіонредуктази. У мікобактерій вітамін К, а не убіхінон, слугує зв'язуючою ланкою між НАДН₂-дегідрогеназою і цитохромом *b*. Крім того, припускають, що в бактеріях менахінон виконує роль специфічного коферменту при перетворенні дігідрооротату в оротат; при цьому роль окисника виконує фумарат.

Вітамін бере участь в окиснювальному фосфорилуванні. При недостатці вітаміну К або при введенні дікумаролу, який є сильним анта-

гоністом вітаміну К, у мітохондріях спостерігається роз'єднання окиснення і фосфорилування. Дікумарол викликає роз'єднання у ланцюзі транспорту електронів. Крім дікумаролу антагоністами вітаміну К є саліцилова кислота, дифтіокол, тримексан. У хлоропластах вітамін К₁ бере участь у перенесенні електронів у процесі фотосинтезу. З присутністю вітаміну К в тканинах зв'язана активність креатинкінази, гексокінази і міозинової АТФ-ази. Вітамін К стимулює біосинтез білків крові – альбумінів і глобулінів, ферментів амілази, пепсину, трипсину, ліпази і ентерокинази. Вітамін К попереджує токсичну дію вітаміну А при гіпервітамінозі.

7.2. Водорозчинні вітаміни

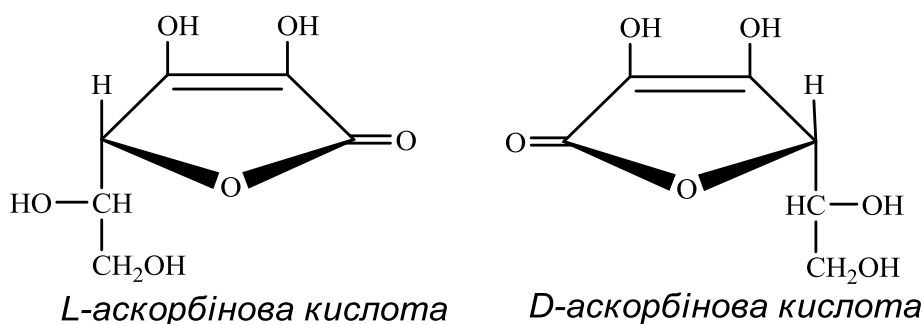
Вітамін С (аскорбінова кислота). Цю речовину виділив з кори надниркових залоз, а пізніше з соку апельсин і капусти угорський біохімік Сент-Дьордьї. При С-авітамінозі виникає захворювання цинга, по латині – скорбут. Тому цей вітамін, що попереджає скорбут, було названо антискорбутним або аскорбіновою кислотою. На цингу хворіють лише примати і морські свинки. Інші види вмiють синтезувати аскорбінову кислоту самі. При авітамінозі має місце кровотоочивість ясен, слизових оболонок, м'язів, розхитуються і випадають зуби, з'являються підшкірні геморагії. У риб при С-авітамінозі відбувається деформація хребта і зябрової кришки, крововиливи в шкірі, печінці, нирках, кишечнику і м'язах.

Вітамін С представляє собою похідне 2,3-ендіол-1,4-лактону-L-гулонової кислоти. За своєю будовою аскорбінова кислота може бути віднесена до похідних вуглеводів, які включають до своєї структури γ-лактонне кільце і угруповання редуктона з двома спряженими подвійними зв'язками.

Найважливішою властивістю цих систем є здатність до оборотних окиснювально – відновних перетворень. В організмі аскорбінова

кислота знаходиться також у вигляді окисненої форми – дегідро-аскорбінової кислоти.

Аскорбінова кислота має два асиметричних атоми Карбону у положеннях 4 та 5 і утворює чотири оптичних ізомери і два рацемати. Вона представлена у двох епімерних формах, кожна із яких дає по два оптичних антиподи: D– і L– аскорбінові кислоти і їх діастереоізомери – D– і L–ізоаскорбінові кислоти.



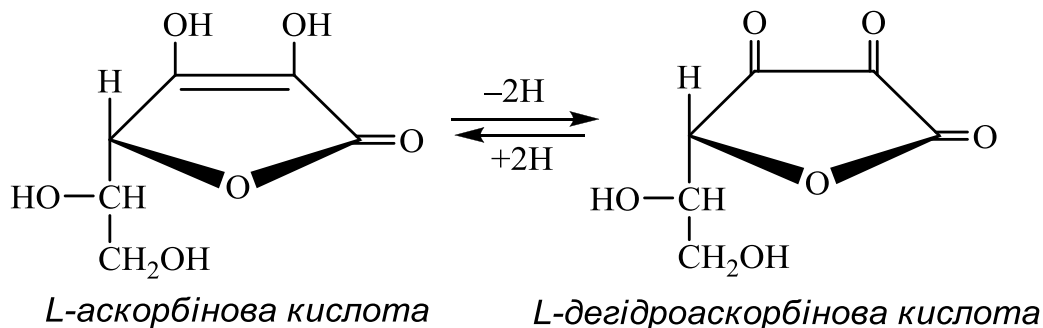
Природна біологічно активна аскорбінова кислота відноситься до похідних гулози L-ряду. Находження серед біологічно активних речовин похідних гексоз L-конфігурації є своєрідним, тому що природні моносахариди тваринного організму, як правило, мають D-конфігурацію.

D-аскорбінова кислота вітамінних властивостей не має, а навпаки, є майже єдиним антагоністом вітаміну С.

Аскорбінова кислота представляє собою безкольорові призми без запаху. Адсорбується активованим вугіллям, добре розчина у воді, значно слабше у спирті. Мало розчинна у гліцерині та ацетоні, нерозчинна у полярних розчинниках, таких як ароматичні і аліфатичні вуглеводні та ін. У водних розчинах дає кислу реакцію і реагує як одноосновна кислота. Кислі властивості викликаються, в основному, гідроксильною групою, що знаходиться у положенні 3 і частково у положенні 2.

Внаслідок своєї здатності до легкого окиснення аскорбінова кислота є донором Гідрогену; вона легко відновлює численні сполуки. На здатності цих сполук змінювати своє забарвлення при відновленні оснований різні способи визначення аскорбінової кислоти.

Здатність до окиснювально–відновних перетворень пов'язана з ендіольним угрупованням, яке стабілізоване сусідньою карбонільною групою, що знаходиться у циклі, і супроводжує перенесення атомів Гідрогену до акцепторів, є найважливішою каталітичною функцією аскорбінової кислоти у живому організмі.



Аскорбінова кислота є дуже сильним відновником і одним з найкращих природних антиоксидантів. При окисненні аскорбінової кислоти утворюється дегідроаскорбінова кислота. У тварин і людини найбільше аскорбінової кислоти міститься в тканинах надниркових залоз. Аскорбінова кислота надходить до клітин у вигляді дегідроаскорбінової кислоти. У клітинах вона швидко відновлюється, наприклад цистеїном або глутатіоном. При окисненні аскорбінова кислота перетворюється в дегідроаскорбінову, дегідроаскорбінова – в дикетогулонову, а при розпаді дикетогулонової кислоти утворюється щавлева кислота. Частина дикетогулонової кислоти декарбоксилюється з утворенням ксилози, яка використовується для біосинтезу рибози чи дезоксирибози або глюкози.

Вітамін С бере участь практично у всіх окисно-відновних процесах в організмі. Він є донором і акцептором протонів і електронів. Аскорбінова кислота бере участь у відновленні дисульфідних зв'язків в

молекулах ферментів. При С-авітамінозі порушується перехід проколагену в колаген, що призводить до кровотеч. Порушується біосинтез колагену у кістковій тканині і гіалуронової кислоти. Виникають типові цинготні зміни скелета. Уповільнюється регенерація всіх тканин, біосинтез гормонів надниркових залоз, дентину, процеси згортання крові, гальмується активність багатьох ферментів.

Вміст вітаміну С в організмах риб складає від 0,5 до 20 мг%. В м'язах морських риб міститься значно більше аскорбінової кислоти, ніж в м'язах прісноводних риб. Вміст вітаміну С в різних тканинах прісноводних і морських риб найбільший у літній період. Важливими джерелами аскорбінової кислоти для рослиноїдних риб є водорості. За вмістом вітамінів водорості переважають наземні рослини.

Хоча аскорбінова кислота і виявляє антиоксидантні властивості, у присутності йонів Fe^{3+} вона сприяє утворенню вільних радикалів, які згубно діють на організм.

Аскорбінова кислота відіграє важливу роль у життєдіяльності рослин. Рівень цього вітаміну у рослинах може бути характеристикою інтенсивності обмінних процесів на різних етапах розвитку. Однією з функцій аскорбінової кислоти в рослинах є захист фотохімічного апарату фотосинтезу, який відповідає за перетворення світлової енергії у хімічну, від деструктивної дії світла. Вона захищає зелений пігмент від окиснення, спільно з вітаміном К бере участь у складних синтетичних реакціях, які відбуваються при фотосинтезі. Існують дані про те, що дегідроаскорбінова кислота контролює мітотичну активність і тим самим впливає на розвиток рослин. Аскорбінова кислота знаходиться у кожній клітині зелених рослин і підтримує у певних межах відновні властивості клітин (хлоропластів).

Збільшення вмісту вітаміну С характерно для рослин із посиленою стійкістю до низьких температур. Накопичення аскорбінової кислоти у рослинах значно підвищується із зниженням температури під

час періоду вегетації. Сприятлива дія аскорбінової кислоти в збільшенні холодостійкості рослин полягає в тому, що при зниженні зовнішньої температури посилюються реакції, у яких бере участь вітамін С.

Аскорбінова кислота різко підвищує дихання рослин, знижуючи дихальний коефіцієнт. Вважається, що вона необхідна для синтезу білків, що беруть участь у процесі дихання. У процесі дихання відбувається окиснення вітаміну С.

Ферментативне окиснення аскорбінової кислоти може відбуватися прямим шляхом за участі специфічної аскорбатоксидази, а також непрямим – через посередництво хінонів та інших окиснених продуктів, які утворюються в результаті діяльності різних оксидаз. Окиснюючись, аскорбінова кислота перетворюється на дегідроформу, яка виконує роль акцептора Гідрогену.

Найбільш інтенсивно відбувається утворення аскорбінової кислоти у рослинах, які ростуть на відкритих слабо затемнених місцях і на помірно зволжених ґрунтах. Верхні частини рослин містять більше аскорбінової кислоти і менше дегідроаскорбінової, ніж нижні, що є пропорційно освітленості. Рівень аскорбінової кислоти в рослинах гірських районів вищий, ніж в рослинах низин.

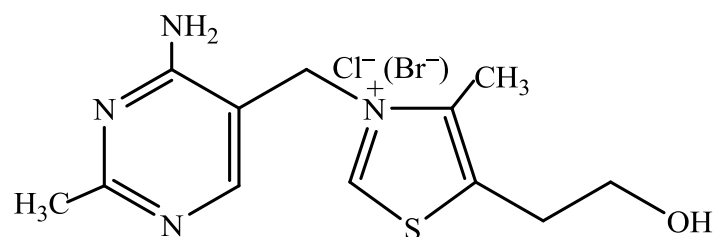
У більшості рослин великий вміст вітаміну С спостерігається в недозрілих плодах і в міру їх дозрівання зменшується, але у дозрілих плодах шипшини відмічається максимум накопичення цього вітаміну.

Вітамін В₁ (тіамін) був одним з перших вітамінів, відкритих наукою. Вивчення вітаміну пов'язане із захворюванням бері-бері, поширеним в країнах Південно-Східної Азії. Мільйони людей гинули від пов'язаних з цією хворобою дивних судом – поліневриту. Ще в давнину багато поколінь китайців знали, що відвар рисових висівок виліковує бері-бері, але ці відомості не отримали розповсюдження. В 1893 році голландський лікар Ейкман, що працював на о. Ява, експеримен-

тальним шляхом викликав судоми у курчат, згодовуючи їм білий полірований рис, який вживало місцеве населення. Ейкман показав також, що судоми швидко зникають при додаванні до корму екстракту рисових висівок. Спочатку він вважав, що у білому рисі є якась токсична сполука, яка нейтралізується якоюсь речовиною із висівок. Пізніше він прийшов до висновку, що рисові висівки містять необхідну поживну речовину. Структура тіаміну, вперше виділеного у кристалічному стані Янсенем в Голландії і Віндаусом у Німеччині, була встановлена Р.Р. Вільямсом і його колегами.

За хімічною природою тіамін є похідним тіазолу (4-метил-5-оксиетилтіазолу) і піримідину (2-метил-5-оксиметил-6-амінопіримідину).

Молекула тіаміну складається з залишків двох компонентів – похідного піримідину (2-метил, 5-оксиметил, 6-амінопіримідин) і похідного тіазолу (4-метил, 5-оксиетилтіазол). У наведеному нижче вигляді, тобто у вигляді солі чотиризаміщеної амонійної основи (тіамін хлориду), вітамін В₁ існує у кислому середовищі.

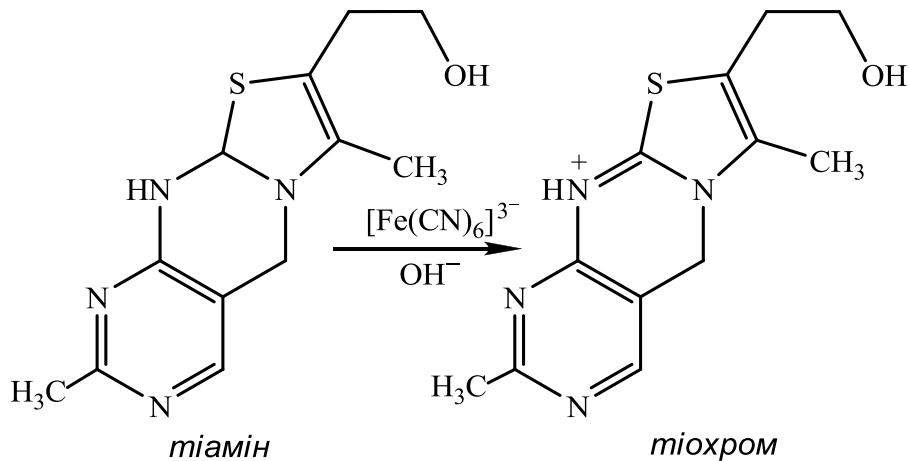


Для нейтрального і лужного середовища характерна інша структура – з розімкненим тіазоловим кільцем. При цьому у молекулі тіаміну з'являються вільні альдегідна і сульфгідрильна групи.

Тіамін являє собою безбарвні кристали, добре розчинні у воді, гіркий на смак з характерним запахом.

Тіамін легко перетворюється в тіохром при дії м'яких окисників. У кислому середовищі тіамін стійкий до нагрівання до 140°C. У луж-

ному середовищі тіамін руйнується. Тіольна форма гідролізується і окиснюється в тіохром – флуоресціюючу сполуку, утворення якої із тіаміну при обробці лужним розчином $K_3[Fe(CN)_6]$ лежить в основі широко розповсюдженого флуориметричного методу визначення тіаміну:



Вітамін B_1 синтезується в рослинах та мікроорганізмами. Особливо багато тіаміну міститься у пивних та пекарських дріжджах. Багато його у висівках злаків. Більшість тканин тварин містять значні кількості тіаміну, особливо печінка і м'язи. В організмах риб вміст вітаміну B_1 знаходиться в межах від 4 до 460мг%. В м'язах прісноводних риб міститься менше вітаміну, ніж у морських риб. Було виявлено, що у тріски з північних районів тіаміну більше, ніж з південних. Вітаміну B_1 найбільше виявлено в м'язах налима (до 460мг%), тунця, скумбрії, сьомги (200-250мг%). У оселедцевих риб вміст цього вітаміну значно нижчий – 23-60мг%. Червоні м'язи багатьох риб містять більше тіаміну, ніж білі м'язи.

Потреба у вітаміні змінюється в залежності від складу їжі. Ліпіди і білки проявляють тіамінзберігаючу дію. Ліпіди запобігають руйнуванню тіаміну. Частина вітаміну може синтезуватися мікроорганізмами травного тракту. Після всмоктування він швидко надходить у всі органи і тканини. Частина тіаміну у печінці фосфорилується. Найбільший рівень вітаміну виявлено в міокарді (до 360мкг%), а та-

кож у печінці, мозку, легенях, нирках, надниркових залозах. Надлишок тіаміну і продукти його розпаду виділяються в основному з сечею.

Усі тварини, за винятком жуйних, потребують надходження тіаміну у складі раціону.

Дослідження *Salmo gairdnerii* виявили такі симптоми недостатності вітаміну В₁: уповільнений ріст, висока смертність, поганий апетит, уповільнене плавання, відстовбурчені зяброві кришки, втрата рівноваги. Найбільш характерним показником функціонального рівня тіаміну є активність ферменту транскетолази в еритроцитах.

Біологічне значення тіаміну обумовлене його коферментними функціями. Тіамін, який надходить у тканини з током крові, може фосфорилюватися під дією ферменту тіамін-пірофосфокінази:



Тіаміндіфосфат складає 70-90% всіх фосфатних естерів тіаміну тканин, інше складають тіамінмонофосфат і тіамінтрифосфат.

У 1937р. К. Ломан і П. Шустер виділили чисту кокарбоксілазу – кофермент, що необхідний для декарбоксілювання пірувату за участі ферменту із дріжджів. Було доведено, що це є тіаміндіфосфат. Тіаміндіфосфат є коферментом піруватдекарбоксілази, яка каталізує окиснювальне декарбоксілювання піровиноградної і інших α -кетокислот. Під дією піруватдекарбоксілази відбувається декарбоксілювання піровиноградної кислоти з утворенням ацетил-КоА. Якщо в організмі немає тіаміну, то в тканинах накопичується піровиноградна і молочна кислоти, виникає ацидоз, при якому руйнуються клітини, перш за все нервової системи. Вважається, що тіаміндіфосфат (або, можливо, тіамінтрифосфат) відіграють важливу роль у системі транспорту Na^+ через мембрану нейронів.

Заміщення метилу в піримідиновому циклі тіаміну на етил, пропіл чи ізопропіл знижує вітамінну активність, а заміщення Гідрогеном

знижує активність до 5% від вихідного рівня. Бутильний аналог є конкурентним інгібітором тіаміну. Конкурентним аналогом є піритіамін – дуже токсичний особливо для нервової системи, та окситіамін – сильний антагоніст.

Тіаміндіфосфат входить до складу більш, ніж 30 ферментів. Так, він входить до складу 2-оксоглутаратдегідрогенази, яка каталізує окиснювальне декарбоксілювання α -кетоглутарової кислоти до янтарної, входить до складу транскетолази. Тіамін прискорює реакцію дегідрування янтарної кислоти, запобігає окисненню вітаміну С, сприяє біосинтезу нуклеїнових кислот, білків, глюкози, глікогену і жирів.

Вітамін В₂ (рибофлавін) розповсюджений у всіх тваринних і рослинних тканинах, знаходиться в них як у вільному стані, так і в комплексі з білками. Під дією ферментів такі комплекси руйнуються. Великі кількості рибофлавіну містяться в бобових рослинах, в печінці, нирках і серцевому м'язі ссавців. Особливо багато рибофлавіну в дріжджах, є він і в молоці та молочних продуктах, яйцях, оболонках злаків. Певна кількість рибофлавіну синтезується симбіотичною мікрофлорою у кишечнику тварин і людини.

В організмі риб вміст вітаміну В₂ складає від 14 до 660мг %. У значних кількостях він міститься в м'язах скумбрії (230-660мг%), тихоокеанських оселедців (287мг %), палтуса (230-660мг %).

Синтез рибофлавіну здійснюється всіма зеленими рослинами, а також більшістю бактерій і грибів. Не всі бактерії можуть синтезувати рибофлавін. Значні кількості рибофлавіну продукують деякі плісеневі гриби. Риби отримують необхідну кількість вітаміну з кормом.

Найбільш достовірним показником достатнього надходження в організм тварин рибофлавіну є вміст вітаміну В₂ в еритроцитах.

У 1879 році Блайт виділив вітамін із молочної сироватки, який був названий лактофлавіном. Увагу хіміків привернуло інтенсивне жовтогаряче забарвлення і яскрава зеленувата флуоресценція рибо-

флавіну. Пізніше ця речовина була виділена з курячих яєць, м'язів і сечі. Структуру рибофлавіну встановили в 1933 році Кун і його співробітники, які виділили 30мг чистої речовини з 30кг яєчного білка. В 1935 році вітамін був синтезований Каррером.

Рибофлавін – кристалічна речовина жовтогарячого кольору із специфічним запахом, гірка на смак. погано розчиняється у воді (~100мг/л при 25°C), не розчиняється в органічних розчинниках, водні розчини флуоресціюють, стійкий до нагрівання (до 120°C), розкладається при ультрафіолетовому опромінюванні. У лужному середовищі при нагріванні руйнується.

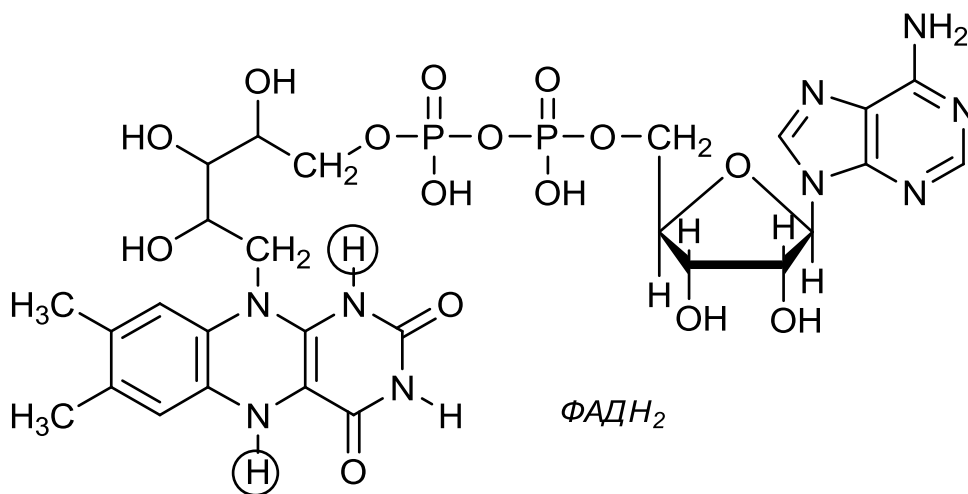
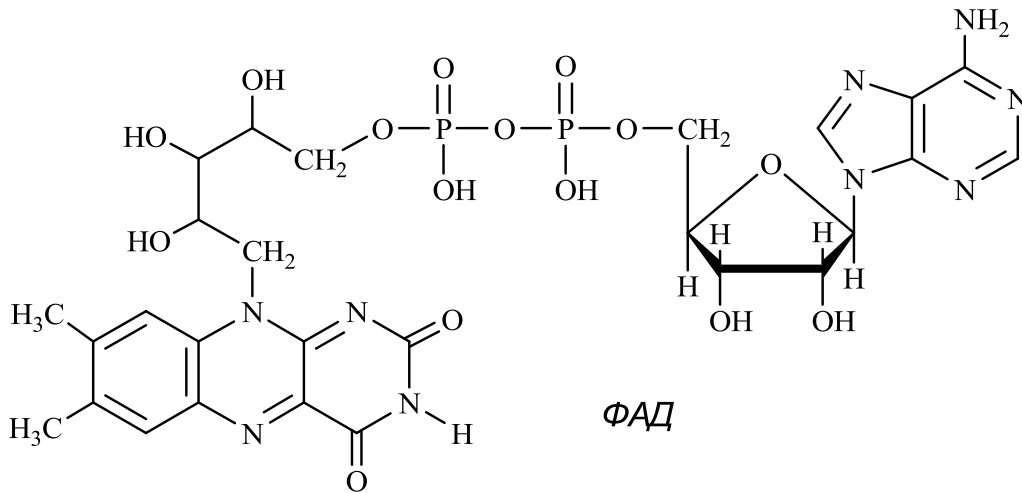
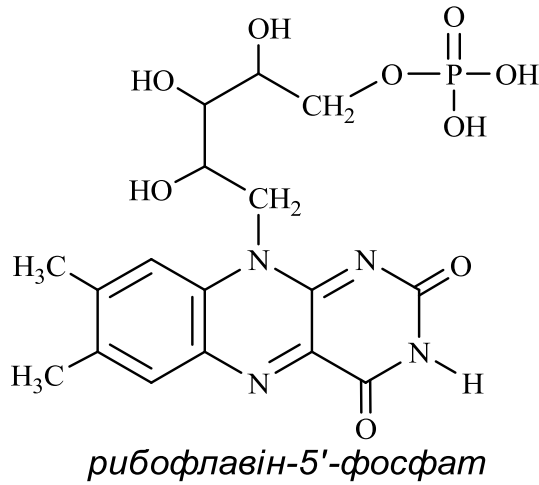
Симптоми недостатності вітаміну B₂ у риб проявляються в уповільненому рості, некрозі зябрової кришки і плавників, поганому поїданні корму, уповільненому плаванні. При B₂-авітамінозі спостерігається висока смертність риби.

Рибофлавін – складова частина більш ніж 60 флавінових ферментів, які беруть участь у клітинному диханні і інших реакціях обміну речовин. Рибофлавін входить до складу коферментів флавінових ферментів. Таких коферментів є два: флавінаденіндинуклеотид (ФАД) і рибофлавін-5'-фосфат. Останній помилково називають флавінмононуклеотидом (ФМН). Цей кофермент не є нуклеотидом, бо не містить рибози, а є лише фосфатним естером рибофлавіну.

Флавінаденіндинуклеотид по суті не зовсім динуклеотид, оскільки D-рибітильна група не утворює з рибофлавіном глікозидного зв'язку. Флавінові ферменти беруть участь в реакціях дегідрування субстратів. Особливо характерною реакцією їх є участь в окисненні відновленого НАДН·Н⁺: $\text{НАДН}\cdot\text{Н}^+ + \text{ФАД} \rightarrow \text{НАД}^+ + \text{ФАДН}_2$;

Флавопротеїни беруть участь також в окисненні α-амінокислот, α-оксикислот. При відсутності у кормах вітаміну B₂ помітно знижується активність оксидази D – амінокислот у тканинах тварин.

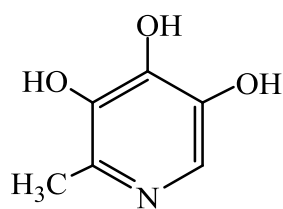
Відновлена форма ФАДН₂ є субстратом окиснення для коферменту Q – убіхінону: ФАДН₂ + УХ — ФАД+ УХ·Н₂.



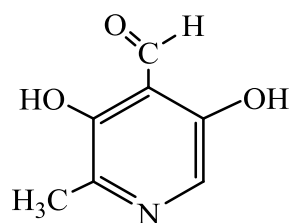
Біологічна дія флавінових ферментів пов'язана з тим, що до атомів Нітрогену в ізоалоксазиновому кільці коферменту за місцем по-

двійних зв'язків приєднуються атоми Гідрогену, які відщепились від молекул субстратів, що окиснюються:

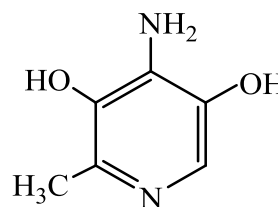
Вітамін В₆ являє собою групу споріднених речовин: піридоксолу (піридоксину), піридоксалу і піридоксаміну:



піридоксол



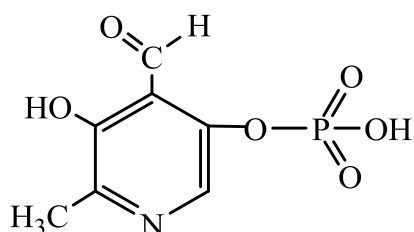
піридоксаль



піридоксамін

Всі три речовини близькі між собою за хімічною будовою, є похідними піридину і можуть взаємно перетворюватись одна в одну. Вони є однаково ефективними як компоненти раціону тварин. Піридоксол синтезується зеленими рослинами і багатьма мікроорганізмами з проміжних продуктів гліколізу. Піридоксол слід розглядати як провітамін оскільки він сам не проявляє вітамінної дії. Піридоксол, який потрапив до організму тварини з кормом, у печінці фосфорилюється під дією специфічної кінази, а потім окиснюється до піридоксальфосфату за участі флавінового ферменту.

Як і піридоксол, піридоксамін, надходячи до організму тварин, перетворюється в піридоксальфосфат:



Піридоксальфосфат є коферментом багатьох ферментів, які каталізують реакції декарбоксілювання, переамінування амінокислот, тобто забезпечує синтез і обмін амінокислот в організмі. Піридоксальфосфат відіграє центральну роль в реакціях, в результаті яких клітина

трансформує амінокислоти, які надходять з кормом, у суміш амінокислот і інших нітрогенвмісних сполук, необхідних для її життєдіяльності. Потреба тварин у вітаміні змінюється в залежності від вмісту білка в раціоні.

Піридоксаль може вступати в реакції з різними амінокислотами й амінами, в результаті відновлення яких утворюються відповідні піридоксамінокислоти і піридоксаміни, що мають 50%, а інколи і 100% вітамінної активності. Ця активність обумовлена перетворенням цих сполук знову в піридоксаль. Виходячи з цього, вважають, що піридоксаль є основним представником у групі вітамінів В₆. Природним вітаміном є не піридоксол, а піридоксаль.

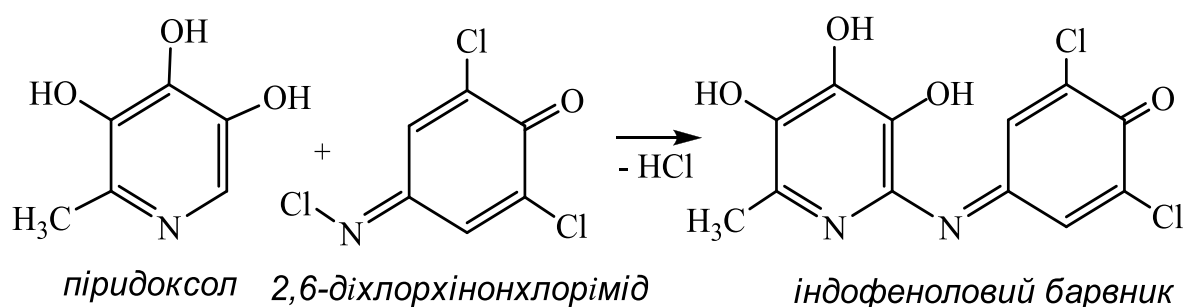
Вітаміни групи В₆ є термостабільними і стійкими до дії кислот і лугів. Але вони не стійкі за відношенням до окисників, а їх розчини не стійкі на світлі.

Дослідження вмісту вітаміну В₆ в ікрі лосося *Salmo gairdnerii*, вирощеного штучно, і дикої риби показали, що у дикої риби вітаміну вдвічі більше, ніж у риби, яка вирощена штучно. Вміст цього вітаміну в організмі риб не залежить від розмірів риби. Вміст піридоксолу в печінці різних видів риб досить відрізняється, але залишається постійним для одного виду – від 2мкг/г у *Sebasticus marmoratus* до 20мкг/г у *Euthunnus pelamis*. У м'язах активних риб його більше, ніж у м'язах малорухливих риб.

Симптомами недостатності піридоксину (наприклад, у *Salmo gairdnerii*) є поганий ріст, висока смертність, порушення координації рухів.

Для виявлення піридоксолу можна застосовувати різні методи. Фенольний гідроксил в молекулі піридоксолу дає можливість утворення азобарвника при взаємодії з різними солями діазонію. Однак ця реакція неспецифічна, оскільки й інші феноли дають цю реакцію. Більш поширена реакція утворення індофенолового барвника при

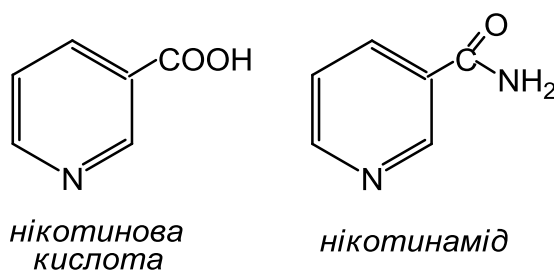
взаємодії вітаміну з 2,6-діхлорхінонхлорімідом, який реагує лише з тими фенолами, в яких *n*-положення є незаміщеним:



При додаванні до розчину вітаміну розчину $FeCl_3$ з'являється червоне забарвлення, яке зникає при внесенні декількох крапель розбавленої сульфатної кислоти.

Вітамін B₅ (PP, нікотинамід). Назва вітаміну походить від слів preventive pellagra, що означає італійською мовою – попереджує пеллагру – захворювання, пов'язане з порушенням структури і функцій шкіри, а також розладами травного тракту і нервово-м'язового апарату. Виникають атрофічні явища в тканинах шкіри, м'язів, кісток, печінки, залоз внутрішньої секреції, кишечника, розвивається анемія.

За хімічною будовою вітамін PP представлений нікотиною та її амідом:



Нікотинова (3-піридинкарбонова) кислота і нікотинамід – кристалічні безбарвні речовини, розчинні у воді, стійкі до високих температур. Серед інших вітамінів нікотинова кислота та нікотинамід найбільш термостабільні, не змінюються під дією світла і кисню повітря.

Фізіологічна дія вітаміну полягає в тому, що він входить як складова частина ряду коферментів – небілкових компонентів ферментів, що беруть участь у перенесенні атомів Гідрогену у процесі біохімічних перетворень в живих організмах. Це було встановлено ще в 1935 році Ейлером, Варбургом, Крістіаном.

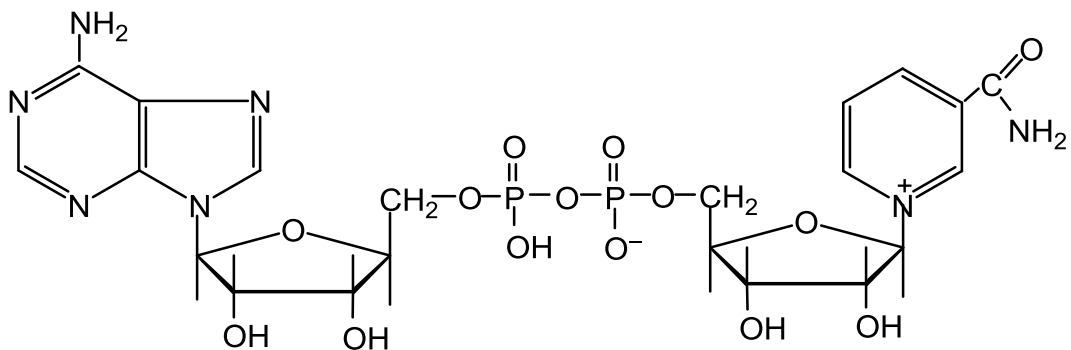
Добова потреба в цьому вітаміні для людей становить близько 7,5мг.

Захворювання на пелагру спостерігалось в тих регіонах Землі, де люди споживали у великих кількостях їжу з кукурудзи, в білках якої дуже мало амінокислоти триптофану, з якого в живих організмах за участі ряду ферментів утворюється нікотинамід; він і проявляє вітамінну дію.

Вітамін широко розповсюджений у природі, частково синтезується мікрофлорою кишечника з триптофану. Багато вітаміну РР міститься в дріжджах, оболонках злаків, у м'ясі і рибі.

Всмоктування як ендогенного, так і екзогенного вітаміну здійснюється, в основному, в тонкому кишечнику.

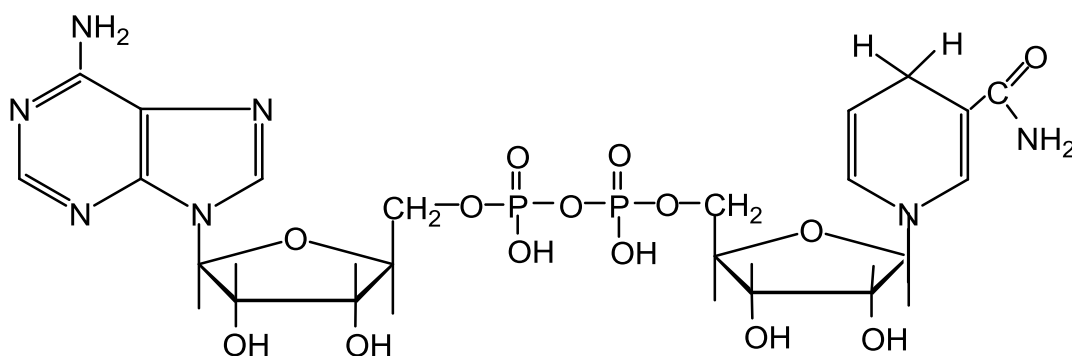
Нікотинамід є складовою частиною багатьох ферментів, що беруть участь у процесах біологічного окиснення. Він входить до складу коферментів нікотинамідаденіндинуклеотиду – NAD^+ та нікотинамідаденіндинуклеотидфосфату $NADP^+$:



нікотинамідаденіндинуклеотид - NAD^+

NADP^+ у положенні 2' рибози аденозину має естерний зв'язок з фосфатом.

У більшості хімічних реакцій NAD^+ або NADP^+ як коферменти приєднують протон і два електрона від субстрату, що окиснюється, і передають їх іншим учасникам дихального ланцюга, зокрема FAD , або транспортують від відновлених $\text{NADH}\cdot\text{H}^+$ чи $\text{NADPH}\cdot\text{H}^+$ до іншого субстрату.



$\text{NADH}\cdot\text{H}^+$ — нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений

В тканинах міститься в 5–10 разів більше NAD^+ , ніж NADP^+ . NAD^+ є коферментом багатьох ферментів гліколізу, циклу трикарбонових кислот, β -окиснення вищих жирних кислот і ін. До ферментів, що містять як кофермент NADP^+ , відносяться, наприклад, ферменти фосфоглюконатного циклу. Коферменти NAD^+ та NADP^+ легко відщеплюються від апоферменту і тому є мобільними переносниками атомів Гідрогену. Відновлений $\text{NADPH}\cdot\text{H}^+$ використовується як донор атомів Гідрогену в реакціях синтезу жирних кислот, холестеролу, стероїдних гормонів і ін.

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Вітаміни

Лабораторна робота 1

Якісні реакції на жиророзчинні вітаміни

Дослід 1. Проба на вітамін А з ферум(III) хлоридом

Принцип методу. Вітамін А має в молекулі довгий ланцюг спряжених зв'язків. Наявність великої кількості подвійних зв'язків зумовлює можливість приєднувати різні атоми та легко окиснюватись різними окисниками у тому числі Fe^{3+} .

Мета роботи. Ознайомитися з якісною реакцією на вітамін А з ферум(III) хлоридом.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки. Розчин рослинної олії у хлороформі ($\omega=10\%$). Розчин риб'ячого жиру у хлороформі ($\omega=10\%$). Розчин ферум(III) хлориду ($\omega=10\%$).

Хід роботи. В одну пробірку вносять розчин риб'ячого жиру у хлороформі, а у другу – розчин рослинної олії у хлороформі і додають по декілька крапель розчину ферум(III) хлориду. У присутності вітаміну А розчин забарвлюється у яскраво–зелений колір.

Дослід 2. Проба на вітамін А з сульфатною кислотою

Принцип методу. Вітамін А під дією концентрованої сульфатної кислоти зневоднюється і руйнується. При цьому утворюються забарвлені продукти.

Мета роботи. Ознайомитися з якісною реакцією на вітамін А з сульфатною кислотою.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки. Розчин рослинної олії у хлороформі ($\omega=10\%$). Розчин риб'ячого жиру у хлороформі ($\omega=10\%$). Сульфатна кислота концентрована.

Хід роботи. В одну пробірку наливають кілька см³ розчину риб'ячого жиру у хлороформі, а у другу – розчин рослинної олії у

хлороформі і додають по 1-2см³ розчину концентрованої сульфатної кислоти. При наявності вітаміну А з'являється синє забарвлення, яке змінюється на фіолетове, а потім на червоно-буре.

Дослід 3. Проба на вітамін D з аніліном

Принцип методу. Для вітаміну D є характерною реакція з анілін гідрохлоридом. При наявності вітаміну D відбудеться зміна забарвлення.

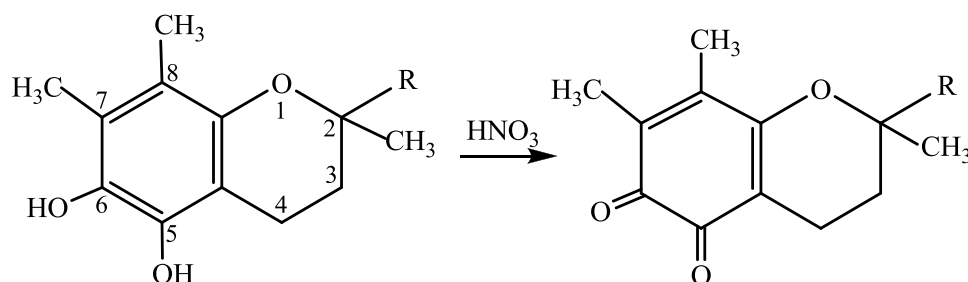
Мета роботи. Ознайомитися з якісною реакцією на вітамін D з аніліном.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Розчин жиру, що досліджують, у хлороформі ($\omega=10\%$). Анілін гідрохлорид.

Хід роботи. До 1-2см³ жиру, що досліджують, додають рівний об'єм розчину анілін гідрохлориду, ретельно перемішують і нагрівають при постійному збовтуванні до кипіння. Кип'ятять 30 секунд. При наявності вітаміну D жовта емульсія стає спочатку зеленою, а потім червоною. Через 1-2 хвилини емульсія розшаровується. З'являються два шари; нижній забарвлюється у яскраво-червоний колір. При стоянні забарвлення темнішає.

Дослід 4. Якісна реакція на вітамін E з нітратною кислотою

Принцип методу. Вітамін E при взаємодії з нітратною кислотою окиснюється з утворенням о-хінона, забарвленого в помаранчево-червоний колір. При дії нітратної кислоти на токоферолі відбувається їх окиснення в положенні 5 хроманового циклу навіть тоді, коли в цьому положенні є метильна група. При цьому утворюється о-токоферилхінон.



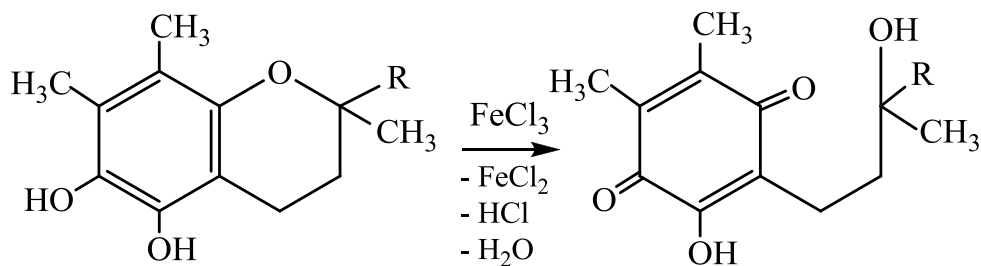
Мета роботи. Ознайомитися з якісною реакцією на вітамін Е з нітратною кислотою.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Водяна баня. Нітратна кислота концентрована. Вітамін Е, розчин у олії (промисловий препарат).

Хід роботи. У 2 пробірки вносять по 2-3 краплі розчину вітаміну Е в олії. У першу пробірку додають 1-2см³ води, у другу – таку ж кількість концентрованої нітратної кислоти. Обидві пробірки нагрівають на киплячій водяній бані впродовж 10 хвилин. У пробірці з нітратною кислотою олійний шар вітаміну забарвлюється в помаранчево-червоний колір.

Дослід 5. Виявлення вітаміну Е за реакцією з ферум(III) хлоридом

Принцип методу. При окисненні токоферолів ферум(III) хлоридом відбувається розрив піранового циклу з утворенням γ -оксиалкіл-п-хінону:



Мета роботи. Вивчити методи виявлення токоферолів у біологічних об'єктах, з'ясувати джерела та участь вітаміну в процесах метаболізму.

Обладнання та реактиви. Сухі пробірки. Спиртовий розчин α -токоферолу ($\omega=0,1\%$). Розчин ферум (III) хлориду ($\omega=1\%$).

Хід роботи. У суху пробірку вносять 4-5 крапель спиртового розчину α -токоферолу ($\omega=0,1\%$), додають 0,5см³ розчину ферум(III)

хлориду ($\omega=1\%$), ретельно перемішують. Вміст пробірки набуває червоного забарвлення.

Виявити токофероли можна також при взаємодії їх з фосфорно-молібденовою кислотою в льодяній оцтовій кислоті. При цьому розчин набуває жовто-зеленого забарвлення. За інтенсивністю забарвлення можна і кількісно визначити суму токоферолів спектрофотометричним методом.

Лабораторна робота 2

Кількісне визначення вітаміну К

у рослинному матеріалі (зокрема у водоростях)

Принцип методу. Вітамін К в лужному середовищі взаємодіє з діетилмалоновим естером. Утворюється забарвлена у червоно-фіолетовий колір сполука, вміст якої визначають спектрофотометричним (колориметричним) методом

Мета роботи. Освоїти методику спектрофотометричного (колориметричного) визначення вітаміну К в рослинному матеріалі за реакцією з діетилмалоновим естером. З'ясувати роль вітаміну у процесах метаболізму в організмі.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Водяна баня. Ступка. Гомогенізатор. Лійка Бюхнера. Колба Бунзена. Вакуум-насос. Фільтр. Мірна колба на 10см^3 . Водорості. Кварцовий пісок. Натрій карбонат. Діетиловий етер. Безводний натрій сульфат. Хлороформ. Спиртовий розчин діетилмалонового естеру ($\omega=1\%$). Розчин калій гідроксиду ($\omega=1\%$).

Хід роботи. Роботу проводять у витяжній шафі. Дрібно нарізають 10-15г кормового засобу або водоростей на шматочки, ретельно розтирають у ступці з кварцовим піском, додаючи невелику кількість натрій карбонату. Потім у ступку приливають 10см^3 діетилового етеру і знову розтирають. Гомогенат переносять на лійку Бюхнера, яку став-

лять на колбі Бунзена, двічі ополіскують ступку невеликими порціями етеру, який виливають на лійку. Приєднують колбу Бунзена до вакуум-насоса. Фільтрують і тричі промивають осад на фільтрі етером. Фільтрат висушують безводним натрій сульфатом, після чого етер випаровують у витяжній шафі на теплій водяній бані, яку нагрівають заздалегідь. Користуватись електронагрівальними приладами чи пальниками відкритого вогню при випаровуванні діетилового етеру не можна. Залишок після випаровування етеру розчиняють у 5см³ хлороформу. До одержаного розчину додають 1см³ спиртового розчину діетилмалонового естеру (ω=1%) і 0,2см³ розчину калій гідроксиду (ω=1%). Загальний об'єм доводять водою в мірній колбі до 10см³. Розвивається червоно-фіолетове забарвлення. Забарвлений розчин спектрофотометрують (колориметрують з світлофільтром) при λ=490нм у кюветах з l=10мм проти контролю на реактиви.

Одночасно проводять кольорову реакцію зі стандартним хлороформним розчином вітаміну К, що містить 0,04мкг вітаміну в 1см³.

Вміст вітаміну К розраховують за формулою :

$$X = \frac{D_1 \cdot a \cdot V \cdot 100}{D_2 \cdot m}, \text{ де } X \text{ – вміст вітаміну К, мкг \%};$$

m – маса матеріалу, взятого для дослідження, г;

a – вміст вітаміну К в 1см³ стандартного розчину, мкг;

V – об'єм стандартного розчину вітаміну К, взятий для визначення, см³;

D₁ – екстинкція досліджуваного розчину;

D₂ – екстинкція стандартного розчину вітаміну К.

Лабораторна робота 3

Кількісне визначення вітаміну D в печінці

Принцип методу. Вітамін D із SbCl₃ утворює сполуку, яка має жовтогаряче забарвлення. Забарвлений розчин спектрофотометрують

(колориметрують) при довжині хвилі 500 нм проти контролю на реактиви. Вміст вітаміну D в пробі знаходять за калібрувальним графіком.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Водяна баня. Фарфорова ступка. Гомогенізатор. Колба на 100см³ зі зворотним холодильником. Ділильна лійка. Сухий паперовий фільтр. Свіжа печінка. Спиртовий розчин калій гідроксиду ($\omega=2\%$). Діетиловий етер. Фенолфталеїн. Свіжопрожарений натрій сульфат чи магній сульфат. Хлороформ. Ацетилхлорид. Хлороформний розчин SbCl₃ ($\omega=23\%$).

Мета роботи. Визначити кількісний вміст вітаміну D в жирі печінки риб, поглибити знання про біосинтез, будову і біологічну роль вітамінів групи D.

Хід роботи. Свіжу печінку масою 2-3г ретельно гомогенізують у фарфоровій ступці, додаючи частками 40см³ спиртового розчину калій гідроксиду ($\omega=20\%$). Гомогенат переносять у колбочку на 100см³ із зворотним холодильником. Ступку ополіскують спиртовим розчином калій гідроксиду, додають його до гомогенату. Колбу вміщують у водяну баню і нагрівають протягом 30-40хв. при температурі близько 90°C. Відбувається омилення жиру. Після закінчення омилення вміст колби кількісно переносять у ділильну лійку і тричі екстрагують вітамін D діетиловим етером порціями по 50,25 і 25 см³. Етерні екстракти об'єднують, вносять у іншу ділильну лійку, промивають етерний екстракт багаторазово дистильованою водою до повного видалення лугу (за фенолфталеїном). До промитого етерного екстракту вносять 7г свіжопрожареного натрій сульфату чи магній сульфату, збовтують протягом 20хв. для зв'язування води, що є в етерному екстракті. Висушують до повної прозорості етерного екстракту, після чого його фільтрують через сухий паперовий фільтр у витяжній шафі. Фільтрат випарюють досуха на попередньо нагрітій водяній бані під витяжкою. Під час упарювання діетилового етеру в лабораторії не по-

винно бути відкритого вогню. До сухого залишку додають 5см³ хлороформу, розчиняють вітамін D.

З отриманого хлороформного розчину вітаміну відбирають 1см³, додають 3 краплини ацетилхлориду і 6см³ хлороформного розчину SbCl₃ (w=23%). Через 5 хвилин спектрофотометрують (колориметрують) у кюветах з $\ell=10$ мм при $\lambda=500$ нм проти суміші, що складається з 1см³ хлороформу, 6см³ хлороформного розчину SbCl₃ і трьох крапель ацетилхлориду.

Вміст вітаміну D визначають за калібрувальним графіком. Для побудови калібрувального графіка використовують фармакопейні форми вітаміну – розчини ергокальциферолу в жирі чи спиртові розчини ергокальциферолу із вмістом в 1см³ 200000 МО вітаміну. Готують хлороформні розчини вітаміну D₂ із вмістом його від 200 до 1000 МО в 1см³.

З кожним розведенням проводять кольорові реакції, як вказано вище. На осі абсцис калібрувального графіка відкладають вміст вітаміну D₂ в МО/1см³ розчину, а на осі ординат – оптичну густину забарвленого розчину.

Вміст вітаміну D в досліджуваному матеріалі розраховують за формулою:

$$X = x \cdot V / m,$$

де X – вміст вітаміну D в МО/г матеріалу;

V – загальний об'єм хлороформного екстракту вітаміну, см³;

x – вміст вітаміну в 1 см³ хлороформного екстракту, знайдений за калібрувальним графіком;

m – маса досліджуваного матеріалу, г.

Примітка: Діетиловий етер і хлороформ, що використовують у роботі, повинні бути очищені і висушені.

Лабораторна робота 4

Кількісне визначення каротинів у рослин

Принцип методу. Відділяють каротини від інших пігментів хроматографією. Вміст каротину у досліджуваному матеріалі визначають колориметричним методом.

Мета роботи. Виділити каротини з рослинного матеріалу (наприклад, водоростей), відділити їх від інших пігментів методом адсорбційної хроматографії, кількісно визначити їх вміст в рослині. Поглибити знання про роль каротинів у життєдіяльності рослин.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Хромато-графічна колонка. Колба Бунзена. Насос. Тампон із скловати. Ступка. Водорості. Безводний натрій сульфат. Магній карбонат. Натрій оксалат. Тальк. Бензин.

Хід роботи. Кормові зразки або водорості масою 0,5-1,0г розтирають у ступці з 2г безводного натрій сульфату і 0,5г магній карбонату. Після розтирання суміш залишають на 5хв. для підсушування. Після цього суміш наносять на хроматографічну колонку. Колонка являє собою скляну трубку діаметром 15–20мм, довжиною 120–150мм, в нижній частині звужена, а у верхній – розширена. В нижню частину колонки вміщують тампон з скловати, потім насипають 10г добре розтертої в ступці суміші натрій оксалату і тальку (1:1) і ущільнюють. Зверху порошка кладуть теж тампон із скловати, щоб порошок не змушувався. Хроматографічну колонку прилаштовують до колби Бунзена, яку приєднують до насоса.

Після нанесення розтертої і підсушеної маси на колонку, ступку ополіскують 5см³ бензину, який виливають у колонку. Потім вмикають насос і відсмоктують бензиновий екстракт зі швидкістю 50-60 крапель за хвилину. Колонку промивають порціями бензину по 3см³ до повного видалення нижньої жовтогарячої смуги каротинів, яка знаходиться попереду інших пігментів. За нею іде жовта смуга ксан-

тофілів, а вище – синя смуга хлорофілу а. Розчин каротинів доводять бензином до певного об'єму (10 або 15см³), спектрофотометрують (колориметрують) при довжині хвилі 490нм.

Екстинкцію бензинового елюату порівнюють з екстинкцією стандартного розчину. Замість стандартного розчину каротину можна використати розчин калій дихромату, забарвлення якого схоже на забарвлення каротинів. Для виготовлення такого розчину калій дихромат масою 72мг вносять у мірну колбу на 100см³, розчиняють, об'єм доводять до риски і ретельно перемішують. 1см³ такого розчину відповідає 0,00416 мг каротину. Вміст каротину у досліджуваному матеріалі розраховують за формулою:

$$X = \frac{100 \cdot D_1 \cdot m \cdot V}{a \cdot D_2},$$

де X – вміст каротинів у рослинному матеріалі, мг %;

a – маса рослинного матеріалу, г;

D₁ – екстинкція досліджуваного розчину каротинів;

D₂ – екстинкція стандартного розчину K₂Cr₂O₇;

m – вміст каротинів у стандартному розчині, мг/ см³;

V – об'єм бензинового елюату каротинів, см³.

Лабораторна робота 5

Кількісне визначення вітаміну А в печінці

Принцип методу. Метод кількісного визначення заснований на кольоровій реакції вітаміну А з SbCl₃. Інтенсивність блакитного забарвлення сполуки, що при цьому утворюється, пропорційна кількості вітаміну А. Отриманий забарвлений розчин спектрофотометрують (колориметрують) і за калібрувальним графіком визначають вміст вітаміну в пробі.

Мета роботи. Дослідити вміст вітаміну А в печінці тварин спектрофотометричним (колориметричним) методом. З'ясувати будову, властивості, джерела, біологічну роль каротиноїдів.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Водяна баня. Ділильна лійка. Ножиці. Фарфорова ступка. Гомогенізатор. Колба із зворотним повітряним холодильником. Фільтр. Печінка. Спиртовий розчин КОН ($\omega=20\%$). Діетиловий етер. Дистильована вода. Сухий натрій сульфат. Порошок Na_2SO_4 . SbCl_3 ($\omega=22\%$) у хлороформі.

Хід роботи. Для порівняння вмісту вітаміну А беруть печінку тварин. Свіжу печінку масою 2–3 г добре подрібнюють ножицями, розтирають у фарфоровій ступці, переносять у колбу із зворотним повітряним холодильником, додають спиртовий розчин КОН ($\omega=20\%$) об'ємом 10см^3 , нагрівають на киплячій водяній бані протягом 30хв. до повного розчинення тканини. Розчин переносять у ділильну лійку, і тричі екстрагують вітамін порціями діетилового етеру по $10\text{--}15\text{см}^3$. Етерні витяжки об'єднують і відмивають від лугу у ділильній лійці дистильованою водою. Етерну витяжку переносять у суху колбу, додають сухий натрій сульфат масою 5г для видалення вологи з витяжки і залишають на 30хв. у темному місці. Після цього вміст колби фільтрують у суху фарфорову чашку через фільтр, на який насипано невелику кількість порошку Na_2SO_4 . Фарфорову чашку ставлять у теплу водяну баню для випарювання етеру.

Усі операції з діетиловим етером необхідно проводити обов'язково у витяжній шафі. Поблизу не повинно бути джерел відкритого вогню, увімкнених електронагрівальних приладів. Для випарювання етеру водяну баню нагрівають заздалегідь, нагрівальний пристрій вимикають.

Діетиловий етер – летка речовина, проявляє наркотичну дію, з повітрям утворює вибухову суміш. Коли весь етер випариться, до за-

лишку додають зневоднений хлороформ об'ємом $1,5\text{см}^3$ і розчин SbCl_3 ($\omega=22\%$) у хлороформі об'ємом 4см^3 . Через 25 секунд розчин спектрофотометрують (колориметрують) проти хлороформу при $\lambda=620\text{нм}$ (червоний світлофільтр) у кюветі з $l=10\text{мм}$. Спектрофотометрування (колориметрування) треба проводити дуже швидко, бо забарвлення швидко зникає. Для визначення вмісту вітаміну А в пробі будують калібрувальний графік. Для цього готують серію розчинів з відомим вмістом вітаміну, проводять кольорову реакцію з SbCl_3 , спектрофотометрують (колориметрують). На абсцисі відкладають вміст вітаміну, на ординаті – оптичну гуστину забарвленого розчину.

Таблиця 20. Об'єми розчинів для побудови калібрувального графіка

№ пробірки	1	2	3	4	5	6	7	8
Об'єм робочого стандартного розчину вітаміну, см^3	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,5
Об'єм хлороформу, см^3	1,3	1,1	0,9	0,7	0,5	0,3	0,1	–
Вміст ретинолу, МО	4	8	12	16	20	24	28	30
Екстинкція								

До кожної пробірки додають розчин SbCl_3 у хлороформі ($\omega=22\%$) об'ємом 4см^3 . З'являється блакитне забарвлення рідини різної інтенсивності. Через 25 секунд спектрофотометрують (колориметрують) проти хлороформу, величини оптичної густини вносять у таблицю. За калібрувальним графіком знаходять вміст вітаміну А в пробі (взята для дослідження маса печінки), перераховують на 100г матеріалу. Одна міжнародна одиниця (МО) відповідає 0,344мкг ретинолацетату або 0,3мкг ретинолу (спирту).

Лабораторна робота 6

Якісні реакції на водорозчинні вітаміни

Дослід 1. Реакція відновлення вітаміну B_2

Принцип методу. Вітамін В₂ відновлюється Гідрогеном, який виділяється при взаємодії металічного цинку з хлоридною кислотою.

Мета роботи. Ознайомитися зі здатністю рибофлавіну оборотно переходити з окисненої форми до відновленої.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки. Пробки до пробірок. Водний розчин вітаміну В₂, ($\omega=0,005\%$). Хлоридна кислота розбавлена (1:1). Цинк металічний (у гранулах).

Хід роботи. У пробірку наливають 2см³ розчину вітаміну В₂, додають 1см³ хлоридної кислоти, перемішують і відливають рівно половину у другу пробірку. У одну з пробірок кидають шматочок металічного цинку і обидві пробірки закривають пробками. У пробірці з цинком знебарвлення розчину настає впродовж 5-10 хвилин. Відновлена форма рибофлавіну безбарвна.

Дослід 2. Якісна реакція на вітамін В₅

Принцип методу. Під дією гідросульфіту натрію відбувається часткове відновлення нікотинаміду з утворенням 1,4-дігідропіридинпохідного, забарвленого у жовтий колір.

Мета роботи. Ознайомитися з якісною реакцією на вітамін В₅. Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Нікотинова кислота або амід нікотинової кислоти. Розчин натрій гідрокарбонату ($\omega=10\%$). Розчин Na₂S₂O₄ ($\omega=5\%$).

Хід роботи. У пробірку поміщають невелику кількість вітаміну В₅, додають 1-2см³ розчину натрій гідрокарбонату і після перемішування додають 1-2см³ розчину натрій гідросульфіту. Рідина у пробірці забарвлюється у жовтий колір.

Дослід 3. Якісні реакції на вітамін В₆ (піридоксаль)

Принцип методу. Фенольний гідроксил у молекулі піридоксалу дає можливість утворення барвника при взаємодії з ферум(III) хлоридом.

Мета роботи. Освоїти методи якісного виявлення вітаміну В₆ у біологічних об'єктах, розширити знання про будову і біологічну роль цього вітаміну.

Обладнання та реактиви. Пробірки. Водний розчин піридоксалу ($\omega=1\%$). Розчин ферум(III) хлориду ($\omega=1\%$). Розбавлена сульфатна кислота (1:1).

Хід роботи. У пробірці змішують 1 см³ водного розчину піридоксалу ($\omega=1\%$) і 2 краплини розчину ферум(III) хлориду ($\omega=1\%$). Суміш струшують. Вміст пробірки набуває червоного забарвлення.

Лабораторна робота 7

Кількісне визначення тіаміну в тканинах тварин флуорометричним методом

Принцип методу. Визначення засноване на окисненні тіаміну в лужному середовищі в тіохром, екстракції тіохрому органічним розчинником і визначенні інтенсивності флуоресценції тіохрому. Для кількісного визначення тіаміну порівнюють флуоресценцію окиснених стандартних розчинів тіамінхлориду і досліджуваних розчинів на флуорометрі.

На відміну від вільного вітаміну В₁ його пірофосфатний естер при окисненні дає тіохромпірофосфат, який нерозчинний в ізоаміловому спирті, через що він там не може бути визначений. Для кількісного визначення вітаміну В₁ у формі тіаміндіфосфату необхідно його дефосфорилувати під дією ферменту фосфатази.

Мета роботи. Освоїти методику визначення тіаміну в тканинах тварин флуорометричним методом. Поглибити знання про участь тіаміну у процесах метаболізму у тварин і людини.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Термостат. Водяна баня. Фарфорова ступка. Гомогенізатор. Конічна колба на 100 см³. Фільтр. Ділильна лійка. Пробірки з притер-

тими скляними корками. Печінка або червоні м'язи тварин. Кварцовий пісок. Розчин сульфатної кислоти ($c(1/2)=0,1$ моль/дм³). Толуен. Розчин натрій ацетату ($c=2,5$ моль/дм³), що містить ферментний препарат фосфатази (рН 4,0-4,5). Трихлороцтова кислота ($\omega=20\%$). Ізоаміловий спирт. Натрій гідроксид ($\omega=30\%$). Розчин $K_3[Fe(CN)_6]$ ($\omega=2\%$). Дистильована вода.

Хід роботи. Свіжу тканину гомогенізують у фарфоровій ступці з кварцовим піском, додаючи невеликими частками 10-15см³ розчину сульфатної кислоти ($c(1/2)=0,1$ моль/дм³).

Гомогенат кількісно переносять у конічну колбу на 100см³ і доводять об'єм суміші приблизно до 75см³ розчином сульфатної кислоти ($c(1/2)=0,1$ моль/дм³). Вміст колби нагрівають на киплячій водяній бані при частому перемішуванні протягом 45 хвилин. Після охолодження у колбу додають декілька крапель толуену і 5см³ розчину натрій ацетату ($c=2,5$ моль/дм³), що містить ферментний препарат фосфатази (рН 4,0-4,5). Для звільнення зв'язаного тіаміну колбу ставлять у термостат при $t \approx 50^\circ C$ на 2 години. Після цього в колбу вносять 10 см³ розчину трихлороцтової кислоти ($\omega=20\%$), через 10хв. переносять у мірну колбу на 100 см³, доводять дистильованою водою до риски, добре перемішують і фільтрують. Для звільнення від домішок інших флуоресціюючих речовин 50см³ отриманого фільтрату переносять у ділильну лійку, додають 25см³ ізоамілового спирту і струшують протягом 2хв. Після розшарування суміші спиртову фазу відкидають. Повторюють цю операцію 2-3 рази. Далі працюють з водною витяжкою.

Кількість калій гексаціано(III)-ферату, яка необхідна для окиснення тіаміну, визначають емпірично. Для цього у 6 пробірок з притертими скляними корками вносять по 2см³ розчину натрій гідроксиду ($\omega=30\%$) і по 5см³ отриманої водної витяжки тіаміну, додаючи в 5 з них свіжоприготований розчин $K_3[Fe(CN)_6]$ ($\omega=2\%$), об'ємами 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5см³ відповідно. Вміст пробірок інтенсивно струшують про-

тягом 2хв. В деяких пробірках виникає жовте забарвлення. Той об'єм окисника, при додаванні якого з'являється жовте забарвлення, яке не зникає протягом 30 секунд після струшування, використовують далі при визначенні тіаміну.

У дві ділильні лійки вносять по 2см^3 розчину натрій гідроксиду ($\omega=30\%$) і в одну з них (дослідна проба) – визначений емпірично об'єм розчину гексаціано(III)-ферату ($\omega=2\%$), ретельно перемішують. Потім у обидві лійки швидко вносять по 5см^3 досліджуваного вітамінного екстракту і вміст лійок ретельно перемішують. Після цього у кожну лійку додають по 10см^3 ізоамілового спирту і протягом 2хв. інтенсивно струшують. Після розшарування суміші водний шар видаляють, а ізоаміловий шар промивають ще 5см^3 води. У лійки додають по 2см^3 етилового спирту для просвітлення розчинів. Дослідну і контрольну суміш знову струшують і визначають їх флуоресценцію.

Стандартний розчин тіаміну окиснюють таким же чином, як і досліджуваний вітамінний екстракт із тканини, використовуючи для цього $0,05\text{см}^3$ розчину $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\omega=2\%$). Для стандартного розчину тіаміну визначають поправку на флуоресценцію можливих супутніх речовин. Для цього 1см^3 стандартного розчину тіаміну обробляють вищезгаданим способом без додавання окисника.

Довжина хвилі флуоресценції тіохрому – 460-470нм, довжина хвилі збудження флуоресценції – 360нм.

Отже, при визначенні флуоресценції тіохрому слід використати первинний світлофільтр з $\lambda=320-390\text{нм}$ і вторинні світлофільтри з $\lambda=400-580\text{нм}$.

Використання таких світлофільтрів виключає можливість накладки флуоресценції інших речовин, зокрема флуоресценції вітаміну B_2 , для яких довжина хвиль збудження і випромінювання флуоресценції мають інші значення.

Вміст тіаміну в досліджуваному матеріалі визначають за формулою:

$$X = \frac{(E_1 - E_2) \cdot V}{(E_3 - E_4) \cdot V_1 \cdot m \cdot 10}, \text{ де}$$

X – вміст тіаміну в досліджуваному матеріалі, мг %;

E₁ – інтенсивність флуоресценції досліджуваного екстракту вітаміну після окиснення вітаміну в тіохром;

E₂ – інтенсивність флуоресценції досліджуваного екстракту вітаміну без окиснення тіаміну в тіохром;

E₃ – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину тіаміну, що містить 1 мкг вітаміну, після окиснення тіаміну в тіохром;

E₄ – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину тіаміну, що містить 1 мкг вітаміну, без окиснення тіаміну в тіохром;

V – загальний об'єм вітамінного екстракту, см³;

V₁ – об'єм вітамінного екстракту, взятий для визначення, см³;

m – маса досліджуваної тканини, г;

10 – перерахунок вмісту тіаміну з мкг/г тканини у мг %.

Лабораторна робота 8

Кількісне визначення вітаміну С у рослинах

Принцип методу. Вітамін С кількісно визначають у безбарвних екстрактах вітаміну за реакцією його окиснення у кислому середовищі 2,6-дихлорфеноліндофенолом.

Мета роботи. Набути вміння кількісно визначати вітамін С титриметричним методом. Дати порівняльну характеристику вмісту аскорбінової кислоти у різних рослинах (в т.ч. – водоростях).

Обладнання та реактиви. Фарфорова ступка з товкачиком. Піпетки на 10см³. Мірна колба на 100см³. Фільтр. Мікробюретки. Конічні колбочки на 50см³. Фрукти, овочі, капуста, синьо-зелені, зелені, бурі і інші водорості, морські і прісноводні. Кварцовий пісок.

HPO_3 ($\omega=2\%$). Хлоридна кислота ($\omega=5\%$). Розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу. Гідроген пероксид. Розчин аскорбінової кислоти ($\omega=0,1\%$). Калій йодат ($c(1/5)=0,001$ моль/дм³). Кристали калій йодиду. Розчин крохмалю ($\omega=1\%$). Дистильована вода.

Хід роботи. Для порівняння вмісту аскорбінової кислоти досліджують фрукти, овочі, капуста, синьо-зелені, зелені, бурі і інші водорості, морські і прісноводні.

10 грамів матеріалу переносять у фарфорову ступку і розтирають з невеликою кількістю кварцового піску, додаючи невеликими порціями розчин хлоридної кислоти ($\omega=5\%$) до одержання рідкої кашки. Доданого розчину кислоти не повинно бути більше 100см³. Гомогенат кількісно переносять у мірну колбу на 100см³. Ступку і товкачик ретельно обмивають тим же розчином хлоридної кислоти і переносять його у мірну колбу. Вміст колби доводять дистильованою водою до риски, перемішують перевертанням колби догори дном і фільтрують або центрифугують.

Одержаний екстракт повинен бути зовсім прозорим. Для досягнення цього інколи треба фільтрувати декілька разів.

Для визначення вмісту аскорбінової кислоти у екстракті у дві конічні колбочки на 50см³ беруть піпеткою по 10см³ одержаного екстракту з рослинного матеріалу. Вміст колб титрують з мікробюретки розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу. За наявності в екстракті вітаміну С розчин знебарвлюється, а при подальшому додаванні робочого розчину з'являється блідо-рожеве забарвлення. Робочий розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу забарвлений у синій колір. При взаємодії з аскорбіновою кислотою відбувається відновлення 2,6-дихлорфеноліндофенолу, а відновлена форма безбарвна. Коли вся аскорбінова кислота буде окиснена реагентом, подальше відновлення його відбуватися не буде і невеликий надлишок реагенту дасть блідо-

рожеве забарвлення, а не синє, бо в кислому середовищі 2,6-дихлорфеноліндофенол має червоне забарвлення.

В одній з проб руйнують вітамін С кип'ятінням у присутності декількох крапель гідроген пероксиду і проводять всі вищеописані операції. У пробі, де вітамін С був зруйнований, при додаванні декількох крапель робочого розчину з'являється рожеве забарвлення. На основі середньої величини титрування розраховують вміст вітаміну С:

$$X = \frac{100 \cdot V_1 \cdot V \cdot T}{a \cdot V_2}, \text{ де}$$

X – вміст аскорбінової кислоти мг%;

T – титр розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу за аскорбіновою кислотою, мг/см³;

V – загальний об'єм вітамінного екстракту, см³;

a – маса досліджуваного матеріалу, г;

V₁ – затрачений об'єм реагенту при титруванні, см³;

V₂ – взята для титрування аліквота із загального об'єму екстракту, см³.

У результаті знаходять вміст вітаміну С в міліграмах на 100г досліджуваного матеріалу.

За даною методикою визначається лише відновлена форма аскорбінової кислоти.

Визначення титру розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу

Титр розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу (с(1/5)≈0,001моль/дм³) за аскорбіновою кислотою визначають в день роботи. Беруть 2см³ розчину аскорбінової кислоти (ω=0,1%) і вносять у 50см³ розчину НРО₃ (ω=2%), перемішують. Беруть 5см³ одержаного розчину і титрують розчином 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи рожевого забарвлення. Відмічають затрачений на титрування об'єм реагенту. Такий же об'єм розчину аскорбінової кислоти титрують з іншої бюретки титрованим розчином калій йодату (с(1/5)=0,001моль/дм³). До розчину аскорбінової кислоти перед титруванням додають декілька кристалів

(не більше 0,1г) калій йодиду і 5 крапель розчину крохмалю ($\omega=1\%$). Обережно титрують до появи ледве помітного синього забарвлення і відмічають затрачений на титрування об'єм калій йодату. Так як у першому і в другому випадку були відтитровані однакові об'єми аскорбінової кислоти, то з цього випливає, що кількості затрачених калій йодату та 2,6-дихлорфеноліндофенолу еквівалентні. Так як 1см^3 розчину калій йодату ($c(1/5)\approx 0,001$ моль/ дм^3) еквівалентний 0,088 мг аскорбінової кислоти, то титр розчину 2,6-дихлорфеноліндофенолу за аскорбіновою кислотою буде:

$$T = \frac{0,088 \cdot V_2}{V_1} \text{ мг/см}^3, \text{ де}$$

V_1 і V_2 – об'єми розчинів 2,6-дихлорфеноліндофенолу та калій йодату відповідно затрачені на титрування однакових об'ємів розчину аскорбінової кислоти.

Лабораторна робота 9

Кількісне визначення рибофлавіну

в крові тварин та ікрі риб флуорометричним методом

Принцип методу. Рибофлавін в природних об'єктах знаходиться у вільному стані та зв'язаний з білками, чи у складі флавінових коферментів. У більшості випадків рибофлавін перебуває у зв'язаній формі. Зв'язані з білком форми рибофлавіну не флуоресціюють. Для розриву зв'язку з білками і вивільнення рибофлавіну з коферментів необхідний кислотний гідроліз і обробка ферментними препаратами. Визначення рибофлавіну засноване на здатності його окисненої форми до флуоресценції при довжині хвилі збудження 430нм і випромінювання 565нм. Інтенсивність флуоресценції кількісно вимірюється флуорометром.

Мета роботи. Освоїти методику флуорометричного визначення вітаміну В₂ в крові та ікрі риби. Поглибити знання про природні джерела рибофлавіну та його участь у метаболізмі.

Обладнання та реактиви. Фотоелектроколориметр. Центрифуга. Широка пробірка. Оксалатна кров тварин, ікра риби. Розчин трихлороцтової кислоти ($\omega=10\%$). Розчин K_2HPO_4 ($c(1/2)=4,0$ моль/дм³). Дистильована вода. $NaHCO_3$ і $Na_2S_2O_4$ кристалічні.

1. Хід визначення рибофлавіну в крові. Оксалатну кров зразу після відбору об'ємом 2см³ вносять у широку пробірку, туди ж додають 18см³ розчину трихлороцтової кислоти ($\omega =10\%$), ретельно перемішують і залишають стояти в темряві протягом однієї години. Потім центрифугують, прозору надосадову рідину залишають при кімнатній температурі на дві доби для гідролізу. Потім нейтралізують кислоту, додаючи розчин K_2HPO_4 ($c=4,0$ моль/дм³) з розрахунку 1см³ розчину калій гідрофосфату на 4см³ гідролізату. Доводять об'єм отриманого розчину дистильованою водою до 25см³. Далі 10см³ витяжки вміщують у кювету флуорометра і вимірюють інтенсивність флуоресценції, використовуючи первинний світлофільтр з пропусканням світла в межах довжин хвиль 350-480 нм і вторинні світлофільтри з $\lambda=510-650$ нм. У іншу кювету вносять 10см³ робочого стандартного розчину рибофлавіну і визначають інтенсивність його флуоресценції. Для приготування стандартного розчину рибофлавіну 10мг розтертого в ступці рибофлавіну розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі на 250см³ (1см³ такого розчину містить 0,04мг або 40мкг рибофлавіну). Цей основний розчин може зберігатися протягом місяця на холоді в темряві. З основного розчину безпосередньо перед визначенням кожного разу готують робочий розчин: 1см³ основного стандартного розчину вносять у мірну колбу на 100см³ і доводять водою до риски. В 1см³ робочого розчину міститься 0,4 мкг рибофлавіну.

Після визначення інтенсивності флуоресценції дослідного і стандартного розчинів рибофлавіну в обидві кювети вносять на кінчику шпателя кристалічні NaHCO_3 і $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ для гасіння флуоресценції рибофлавіну і знову вимірюють інтенсивність флуоресценції. При цьому в стандартному розчині флуоресценція повинна гаситися до нуля, але здебільшого до 5-6, а в досліджуваних витяжках залишається флуоресценція, яка обумовлена сторонніми флуоресціюючими речовинами незважаючи на проведену обробку. Гасіння флуоресценції рекомендується проводити два рази, так як воно відбувається повільно. Для цього до взятих на вимірювання флуоресценції проб повторно додають NaHCO_3 і $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ і знову вимірюють флуоресценцію розчинів. Вміст рибофлавіну в досліджуваній крові розраховують за формулою:

$$X = \frac{(A - B) \cdot m \cdot V \cdot 100}{(C - C_0) \cdot V_1}, \text{ де}$$

X – вміст рибофлавіну в крові, мкг%;

A – інтенсивність флуоресценції досліджуваного розчину;

B – інтенсивність флуоресценції досліджуваного розчину після гасіння флуоресценції рибофлавіну;

C – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину рибофлавіну;

C_0 – інтенсивність флуоресценції стандартного розчину рибофлавіну після гасіння флуоресценції;

m – вміст рибофлавіну в 1 см^3 робочого стандартного розчину, мкг;

V – загальний об'єм вітамінного екстракту, см^3 ;

V_1 – об'єм крові, взятий для дослідження, см^3 .

2. Визначення рибофлавіну в ікрі риби

Обладнання та реактиви. Термостат. Водяна баня. Фарфорова ступка. Гомогенізатор. Колба на 100 см^3 . Мірна колба на 100 см^3 . Фільтр. Калібровані пробірки. Сульфатна кислота ($c(1/2)=0,1\text{ моль/дм}^3$). Толуен. Розчин натрій ацетату ($c=2,5\text{ моль/дм}^3$), що містить ферментний препарат фосфатази (рН 4,0-4,5). Стандартний робочий розчин

рибофлавіну. Калій перманганат ($\omega=4\%$). Гідроген пероксид ($\omega=3\%$). Насичений розчин $\text{SnCl}_2 \cdot \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Ікра риби. Дистильована вода.

Хід роботи. Ікру риби масою 1-2г ретельно гомогенізують у фарфоровій ступці з $10\text{-}15\text{см}^3$ розчину сульфатної кислоти ($c^{(1/2)}=0,1\text{ моль/дм}^3$), яку додають невеликими порціями. Гомогенат кількісно переносять у колбу на 100см^3 і доводять об'єм суміші до 75см^3 розчином сульфатної кислоти ($c^{(1/2)}=0,1\text{ моль/дм}^3$). Вміст колби нагрівають протягом 45хв. на киплячій водяній бані при частому перемішуванні. Після цього колбу охолоджують, додають декілька краплин толуену і 5см^3 розчину натрій ацетату ($c=2,5\text{ моль/дм}^3$), що містить ферментний препарат фосфатази (рН4,0-4,5). Для звільнення зв'язаного рибофлавіну колбу витримують 2 години в термостаті при $40\text{-}45^\circ\text{C}$. Після охолодження вміст колби переносять у мірну колбу на 100см^3 , доводять дистильованою водою до мітки, добре перемішують і фільтрують.

В одну з каліброваних пробірок вносять 8см^3 профільтрованої витяжки, а в другу – 1см^3 стандартного робочого розчину рибофлавіну і 7см^3 води. Потім краплинами у обидві пробірки додають рівні кількості розчину калій перманганату ($\omega=4\%$) до появи блідо-рожевого забарвлення. Через 10хв. в обидві пробірки додають також краплинами розчин гідроген пероксиду ($\omega=3\%$) для руйнування надлишку калій перманганату (2-5 крапель). Доводять дистильованою водою об'єми в обох пробірках до 10см^3 і вимірюють інтенсивність флуоресценції. Після флуориметрування в обидві пробірки додають по $0,2\text{см}^3$ насиченого розчину SnCl_2 і $0,1\text{см}^3$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ для гасіння флуоресценції рибофлавіну і вимірюють флуоресценцію домішок.

Вміст рибофлавіну в досліджуваному матеріалі розраховують за формулою:

$$X = \frac{(A-B) \cdot m \cdot V_1 \cdot V \cdot 100}{(A_1 - B_1) \cdot V_2 \cdot a} \quad \text{мкг}\%, \text{ де}$$

X – вміст рибофлавіну в досліджуваному матеріалі, мкг%;

A – показання флуорометра для дослідного розчину;

B – показання флуорометра для дослідного розчину після гасіння флуоресценції рибофлавіну;

A_1 – показання флуорометра для стандартного розчину рибофлавіну;

B_1 – показання флуорометра для стандартного розчину рибофлавіну після гасіння флуоресценції;

m – вміст рибофлавіну в 1 см³ стандартного розчину, мкг;

V – об'єм екстракту, взятого для вимірювання флуоресценції, см³;

V_1 – загальний об'єм вітамінної витяжки, см³;

V_2 – аліквотний об'єм вітамінної витяжки, взятої для аналізу, см³;

a – маса взятої для дослідження ікри, г.

ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ВІТАМІНИ”

1. Наведіть схему перетворень вітаміну А у зоровому процесі.
2. Наведіть рівняння реакції, що розкриває механізм участі убіхінону в окисно-відновних процесах в організмі.
3. Складіть схему окиснювального декарбоксілювання піровиноградної кислоти. Які коферменти беруть участь у цьому процесі? Напишіть формули цих коферментів.
4. Напишіть рівняння реакції переходу окисненої форми нікотинамідаденіндинуклеотиду у відновлену.
5. Виразіть системою хімічних рівнянь механізм реакції переамінування аланіну і α -кетоглутарової кислот за участі піридоксальфосфату.
6. Обґрунтуйте твердження:
 - а) тіаміндіфосфат бере участь у перетворенні α -кетоглутарату в сукцинат;
 - б) овочі і фрукти містять значну кількість тіаміну;
 - в) згодовування тваринам свіжої риби призводить до захворювання їх на поліневрит.
7. Виберіть вірні парні сполучення ключових слів, позначених літерами **А, Б, В, Г, Д**, і смислових завершальних речень, позначених літерами **а, б, в, г, д**:

А – нікотинамід; **Б** – тіамін; **В** – рибофлавін; **Г** – пантотенова кислота; **Д** – піридоксальфосфат;

 - а) містить кільце тiazолу;
 - б) є складовою частиною коферменту, здатного приєднувати і віддавати атоми Гідрогену в ізоалоксазиновому циклі;
 - в) синтезується в організмі тварин з триптофану;

- г) бере участь як кофермент у реакціях трансамінування, декарбоксилювання амінокислот;
- д) входить до складу коензиму А.

8. Із запропонованих тверджень виберіть правильні:

- а) токоферолі є похідними стеролів;
- б) у молекулі вітаміну А є ізопреноїдні фрагменти;
- в) вітамін С є одним з найсильніших природних антиоксидантів;
- г) вітамін А виявляє антиксерофтальмічну дію

9. ГОРМОНИ

9.1. Характеристика окремих гормонів

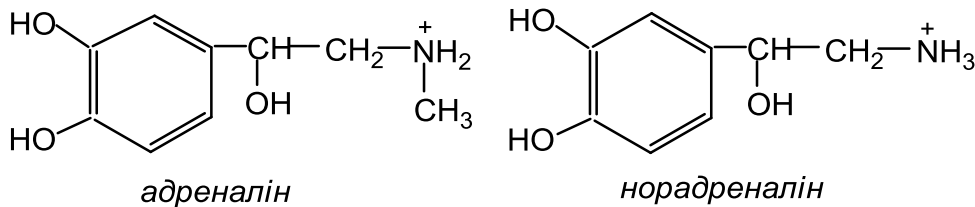
Взаємодія і координація перебігу хімічних процесів у живих організмів забезпечується регуляторними механізмами – нервовою системою і хімічними речовинами. Ці речовини, що називаються гормонами, утворюються у спеціальних органах, надходять до кровоносного русла, переносяться у різні тканини і органи, де і проявляють свою регуляторну дію.

Гормони за хімічною природою є білками (інсулін), пептидами (окситоцин), стероїдами (андростерон), фенолами (адреналін), похідними амінокислот (тироксин). Всі вони мають високу біологічну активність при низьких дозах (10^{-3} – 10^{-6} мг). За добу в організмі тварини може синтезуватися декілька мг або ще й менше. Ці сполуки проявляють короточасну дію і швидко руйнуються. Концентрація їх у крові може складати 10^{-6} – 10^{-9} г / 100 мл. Вони не мають видової специфічності і тому однаково діють у організмі будь-якої тварини. Після розшифрування структури появилася можливість отримувати синтетичні аналоги. Показано різнобічний вплив гормонів на безліч реакцій обміну речовин: вуглеводів, ліпідів, білків, нуклеїнових кислот, мінеральних та багатьох перетворень інших полімерів.

На даний час відомо вже більше 100 гормонів і створено препарати – аналоги для застосування в практиці. За характером дії їх поділяють на пускові та виконавці. До перших належать нейрогормони гіпоталамуса, що стимулюють діяльність відповідних залоз внутрішньої секреції, а другі діють на основні реакції обмінних процесів. Цим самим вони забезпечують відповідні особливості росту і розвитку організму, розмноження, продуктивності, різноманітної функціональної діяльності, адаптації тощо. Їхній регуляторний вплив на метаболізм реалізується через механізм активування чи інгібування

ензимів з використанням системи медіаторів – цАМФ, цГМФ, простагландинів, йонів Ca^{2+} та інших ефektorів. Поміж дією різних гормонів існує певний взаємозв'язок. Вони можуть виступати в ролі синергістів (соматотропін і тироксин) і антагоністів (інсулін і глюкагон). У клініці часто відмічаються гормональні порушення – гіпо- та гіперфункції залоз внутрішньої секреції. На це можуть вказувати результати визначення концентрації гормонів у крові, сечі та інших біорідинах.

Адреналін – гормон мозкової речовини надниркових залоз. За хімічною природою це метиламіноетанолпірокateхін.



Адреналін є похідним ароматичних амінокислот і, так само, як норадреналін і дофамін відносяться до катехоламінів і синтезуються з тирозину при перебігу реакцій гідроксилування ароматичного кільця, декарбоксилування, гідроксилування бокового ланцюга та N-метилування.

Адреналін у тканинах окиснюється з утворенням фізіологічно активних, а також неактивних речовин. На першому етапі окиснення утворюється дегідроадреналін.

Завдяки зворотному перетворенню адреналіну у дегідроадреналін, виникає окиснювально-відновна система. Дегідроадреналін не має фізіологічних властивостей адреналіну. Продуктом окиснення дегідроадреналіну є адренохром, який, у свою чергу, окиснюючись, дає оксоадренохром. Відновлюючись, адренохром оборотно перетворюється в лейкоадренохром. Адренохром і лейкоадренохром не можуть перетворюватися в адреналін. Вони складають окиснювально-відновну систему, що бере участь в окиснювальних процесах. Оксоадренохром, що виникає як продукт необоротного окиснення адрено-

хрому, має фізіологічні властивості, протилежні адреналіну (викликає розширення кровоносних судин).

Роль адреналіну у процесах життєдіяльності

Уперше адреналін був виділений з мозкової речовини надниркових залоз. Синтезується адреналін з амінокислоти тирозину. Процес регулюється АКТГ і гормонами кори надниркових залоз. В організмі він знаходиться у вільному і зв'язаному стані з білками. Після виконання гормональних функцій основна маса його інактивується і виділяється з організму. Частина взаємодіє у печінці з сульфатною і оцтовою кислотами, утворюючи естери, які видаляються з сечею. В результаті складних перетворень з адреналіну утворюються полімерні пігменти коричневого або чорного кольору – меланіни.

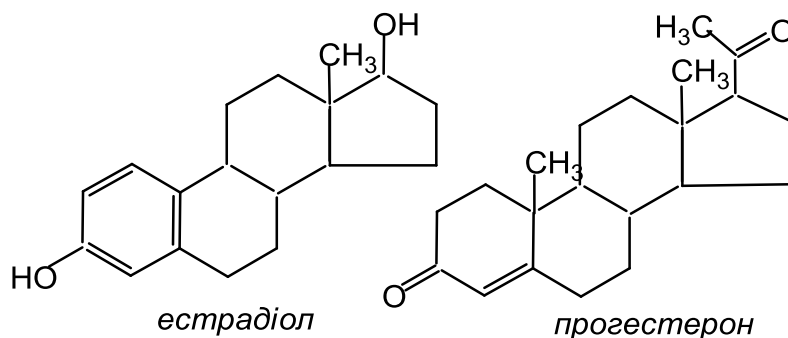
Адреналін бере участь у регуляції обміну вуглеводів, білків, ліпідів, інших речовин. Молекула гормону з кровоносного русла поступає у міжклітинну рідину, а з неї – на поверхню клітини-мішені. Тут вона взаємодіє з рецепторами клітини, що розміщені на її поверхні. Рецептори взаємодіють з ферментом аденілатциклазою, яка знаходиться в неактивній формі. Під дією ферменту з АТФ утворюється цАМФ. Якщо субстратом перетворення є глікоген, через цАМФ гормон активує фермент фосфорилазу, яка каталізує фосфороліз глікогену, перетворюючи його в глюкозо-1-фосфат.

Підвищене виділення адреналіну з надниркових залоз в кров або надлишкове введення його в організм викликає гіперглікемію і глюкозурію. Гормон збільшує швидкість розпаду в тканинах білків і виділення азотистих продуктів обміну з сечею, активує ліпазу жирових депо і прискорює розщеплення ліпідів. Дія адреналіну проявляється в дозах $1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-5}$ мг на 1кг маси тварини і людини. При цьому підвищується кров'яний тиск, прискорюється і підсилюється серцебиття та ритм дихання, уповільнюється перистальтика кишок, підвищується температура тіла. Адреналін підвищує систолічний тиск.

Адреналін синтезується не тільки в мозковій речовині надниркових залоз, але і в нервових закінченнях, в гіпоталамусі. В мозковій речовині надниркових залоз адреналін знаходиться у вигляді гранул діаметром 0,05-0,2мкм. Сигналом для вивільнення вмісту гранул є надходження з прегангліонарних волокон ацетилхоліну і взаємодія його з рецепторами хромафінних клітин, що призводить до локальної деполаризації. Наступне входження Ca^{2+} в ці клітини викликає виштовхування адреналіну й інших речовин з гранул у позаклітинну рідину і далі у систему циркуляції. У плазмі крові вміст адреналіну приблизно 0,06 мкг/дм³. З сечею за 24 години виділяється 10-15 мкг адреналіну.

Гіпофункція мозкової речовини надниркових залоз не виявлена. Гіперфункція цієї структури виникає у людини при пухлинах хромафінної тканини; при цьому вміст у плазмі крові адреналіну може збільшитись у порівнянні з нормою більш, ніж у 500 разів. У плазмі підвищується вміст жирних кислот, в сечі збільшується вміст адреналіну, спостерігається гіпертонія, підсилення основного обміну, глюкозурія.

Фолікулін (естрон) - жіночий статевий гормон (естроген). Утворюється у фолікулах яєчника і жовтому тілі. За своєю хімічною природою всі статеві гормони відносяться до стероїдів. Стероїди представляють собою похідні поліциклічних спиртів – стеролів, у яких вкорочено (окиснено) боковий ланцг. Вони мають у своїх молекулах циклічний компонент у вигляді циклопентанпергідрофенантрону і прототипом їх може бути циклічний вуглевод естран.



Естрогени виділяються з організму з сечею головним чином у вигляді естерів сульфатної кислоти і сполук з глюкуроновою кислотою. Ці сполуки розчинні у воді, у той час як вільні естроїни у воді не розчиняються. Синтез похідних естрагенів з сульфатною кислотою і з глюкуроновою кислотою відбувається у печінці.

Інсулін – гормон, що синтезується у підшлунковій залозі в β -клітинах острівців Лангерганса. Це речовина білкової природи. При рН нижче 4 і вище 7,5 молекули інсуліну дисоціюють на фрагменти з молекулярною масою 12 кДа. Кожна така часточка складається з чотирьох відкритих поліпептидних ланцюгів, зв'язаних один з одним дисульфід-ними містками (S-S). Один ланцюг (А) має N-кінцевою амінокислоту гліцин і закінчується залишком аспарагіну. Другий ланцюг (В) має N-кінцевою амінокислоту фенілаланін і закінчується залишком аланіну.

Серотонін є медіатором нервового імпульсу в нервових центрах і на периферії, гормоном місцевої дії, впливає на скорочення гладенької мускулатури, бере участь у регуляції кров'яного тиску, діяльності травного тракту і багатьох інших процесах.

Синтезується серотонін з триптофану. Під дією ферменту триптофан-5-моноксигенази, що знаходиться в мозку, відбувається гідроксилювання триптофану в 5-окситриптофан. У результаті декарбоксілювання 5-окситриптофану за участі 5-окситриптофан-декарбоксілази, яка також є в мозку, утворюється 5-окситриптамін, або серотонін (схема нижче)

Серотонін зустрічається у тваринних і рослинних організмах. У результаті реакцій ацетилювання і метилювання він перетворюється в мелатонін – гормон епіфізу. Деякі рослинні метаболіти утворюються безпосередньо з серотоніну; зокрема, таким шляхом у грибах *Psilocybe aztecorum* утворюється ксилобіцин – речовина, що викликає галюцинації.

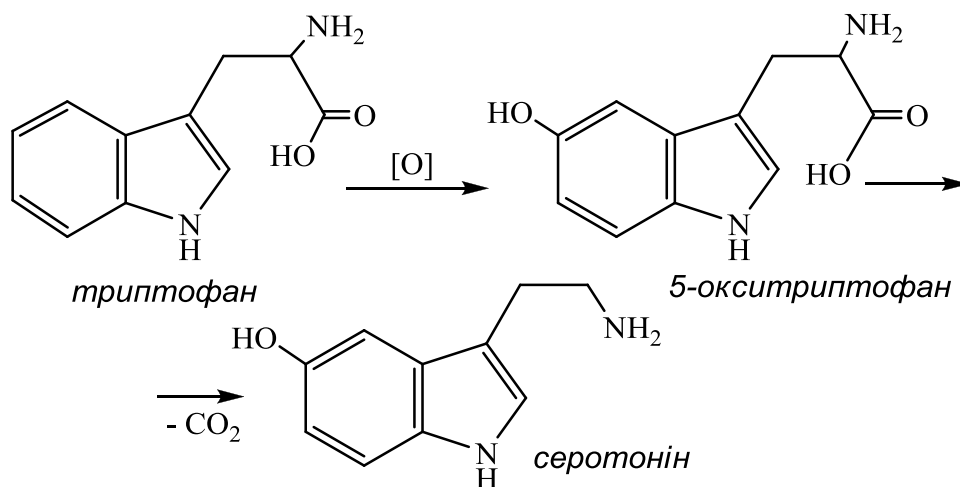


Схема утворення серотоніну з триптофану

Серотонін виявлено у мозку всіх ссавців, а також безхребетних. Він розповсюджений обмежено: серотонінвмісні нейрони містяться в серединних ядрах мозкового стовбура. Ці нейрони йдуть у висхідному напрямку в головний мозок і вниз у спинний мозок. В нервових гангліях равликів були виявлені серотонінвмісні волокна. Використавши ці відносно просто побудовані організми було виявлено як гальмування, так і збудження у відповідь на подразнення таких нейронів.

Серотонін є також у тканині кишечника, тромбоцитах. Він є дуже сильним фактором, що викликає звуження кровоносних судин. Серотонін входить до складу багатьох отрут, наприклад, отрут ос і жаб.

N-Метильовані похідні серотоніну, наприклад буфотенін, дуже широко розповсюджені у амфібій. Вони викликають у ссавців порушення діяльності центральної нервової системи. Великі кількості серотоніну виявлені в отрутах молюска *Murex* і восьминога. Серце двостулкових молюсків дуже чутливе до серотоніну, який є медіатором прискорюючої дії на серце молюсків. Значні кількості серотоніну містять і членистоногі, зокрема ракоподібні.

Вміст серотоніну в мозку залежить від характеру їжі. Він зростає при вживанні великої кількості вуглеводів. На основі цього було висунуто припущення, що серотонін, можливо, є хімічним сигналом, що посиляється одним видом нейронів у інші частини мозку для інформування про характер їжі.

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Гормони

Лабораторна робота 1

Якісні реакції на гормони

Дослід 1. Якісні реакції на адреналін

Принцип методу. Ці реакції засновані на утворенні забарвлених продуктів окиснення адреналіну.

Мета роботи. Навчитись визначати наявність адреналіну у розчині за допомогою проби з йодом та з ферум(III) хлоридом.

Обладнання та реактиви. Штатив із пробірками. Піпетки. Спиртівка. Адреналін, водний розчин. Розчин йоду ($c(1/2)=0,1$ моль/дм³). Розчин ферум(III) хлориду ($\omega=3\%$). Розчин NaOH ($\omega=4\%$).

Реакція 1. Проба з йодом

Хід роботи. У пробірку вносять 1 см³ водного розчину адреналіну і додають краплю розчину йоду. Нагрівають. Розвивається червоне або рожеве забарвлення.

Реакція 2. Проба з ферум(III) хлоридом

Хід роботи. У пробірку вносять 1 см³ водного розчину адреналіну, додають краплю розчину ферум(III) хлориду. Рідина забарвлюється у зелений колір, який при додаванні лугу переходить у червоний.

Дослід 2. Реакція фолікуліну з сульфатною кислотою

Принцип методу. При взаємодії фолікуліну з сульфатною кислотою утворюється естер, забарвлений у жовтий колір.

Мета роботи. Навчитися визначати наявність фолікуліну у розчині за допомогою якісної реакції з сульфатною кислотою.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками. Піпетки. Водяна баня. Фолікулін, спиртовий розчин. сульфатна кислота концентрована.

Хід роботи. У пробірку до 1-2см³ спиртового розчину фолікуліну обережно додають 5-6 крапель сульфатної кислоти до появи жовтого забарвлення.

Дослід 3. Якісні реакції на інсулін

Принцип методу. У лужному середовищі поліпептиди утворюють комплексні солі Купруму, які мають фіолетове забарвлення. Перша реакція (біуретова) обумовлена наявністю пептидного зв'язку, що підтверджує білкову природу інсуліну. Друга реакція, на сульфурвмісні амінокислоти, заснована на взаємодії цих амінокислот з лугами при нагріванні. При цьому від амінокислот відщеплюється Сульфур у вигляді гідроген сульфід, який знаходять за допомогою реакції з плюмбум ацетатом.

Мета роботи. Навчитись визначати наявність інсуліну у досліджуваному розчині за допомогою біуретової реакції та реакції на сульфурвмісні амінокислоти.

Обладнання та реактиви. Штатив з пробірками. Піпетки. Інсулін, розчин. Розчин NaOH ($\omega=10\%$). Розчин CuSO₄, ($\omega=1\%$). Розчин плюмбум ацетату ($\omega=0,5\%$).

Реакція 1. Біуретова реакція на інсулін

Хід роботи. До 1-2см³ розчину інсуліну додають рівний об'єм розчину натрій гідроксиду і 1-2 краплі розчину купрум сульфату. У пробірці розвивається фіолетове забарвлення.

Реакція 2. Реакція на сульфурвмісні амінокислоти

Хід роботи. До 1-2см³ розчину інсуліну додають рівний об'єм розчину натрій гідроксиду і нагрівають до кипіння. Потім додають 2-3 краплі розчину плюмбум ацетату. У пробірці з'являється коричневе або чорне забарвлення.

Лабораторна робота 2

Кількісне визначення серотоніну в нервовій тканині тварин

флуорометричним методом

Принцип методу. Серотонін екстрагують з досліджуваної тканини в бутанол, а потім з бутанолу – в солянокислий розчин. До солянокислого екстрату серотоніну додають розчин нінгідрину. При взаємодії серотоніну з нінгідрином утворюється сполука, яка флуоресцює. Вміст серотоніну в досліджуваному розчині визначають за калібрувальним графіком залежності інтенсивності флуоресценції нінгідринового похідного серотоніну від вмісту серотоніну.

Гомогенізацію тканини і екстракцію серотоніну слід проводити при охолодженні, оскільки серотонін у процесі гомогенізації тканини при кімнатній температурі частково розкладається.

Мета роботи. Визначити рівень серотоніну в нервовій тканині тварин, з'ясувати його фізіологічну роль.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Водяний термостат. Рефрижераторна центрифуга. Механічна гойдалка. Фільтрувальний папір. Таблеточний штампель. Пробірка на 70см³ з притертим корком. Пробірка на 100см³ з притертим корком. Піпетка. Щойно вилучений мозок. Рідкий азот. Хлоридна кислота (с=0,01моль/дм³). Бутанол. Кристалічний натрій хлорид. Гептан. Фосфатний буферний розчин (рН 8,0). Водний розчин нінгідрину (с=0,1 моль/дм³).

Хід роботи. Щойно вилучений мозок після евтонації тварини підсушують на фільтрувальному папері і вміщують на 1-2 хвилини в рідкий азот. Заморожений мозок подрібнюють і спресовують у таблеточному штампелі, вміщують у пробірку ємністю 70см³ з притертим корком. У пробірку вносять 2см³ розчину хлоридної кислоти (с=0,01моль/дм³), 30см³ бутанолу і 5г кристалічного натрій хлориду. Пробірку встановлюють на механічну гойдалку і проводять екстрак-

цію серотоніну в бутанол протягом години. Після цього для розділення органічної і водної фаз центрифугують протягом 10хв. зі швидкістю 2000об/хв. у рефрижераторній центрифугі при температурі 4°C. Відбирають 15см³ бутанольної фази, переносять у пробірку на 100см³ з притертим корком, додають сюди 30см³ гептану і 6,5см³ розчину хлоридної кислоти (с=0,01моль/дм³). Пробірку енергійно струшують протягом 5хв. Після цього органічну і водну фази розділяють центрифугуванням у рефрижераторній центрифугі протягом 5хв. зі швидкістю 2000об./хв. при температурі 4°C. Солянокислий екстракт відсмоктують піпеткою, органічну фазу відкидають.

У пробірку вносять 2см³ фосфатного буферного розчину (рН 8,0) і 4см³ солянокислого екстракту серотоніну (при цьому рН суміші повинен бути 7,0) і 0,5см³ водного розчину нінгідрину (с=0,1 моль/дм³). Пробірку вміщують у водяний термостат при 75°C на 30хв. Після цього пробірку виймають з термостату і залишають при кімнатній температурі на одну годину.

Далі вимірюють інтенсивність флуоресценції проби на флуорометрі, використовуючи первинний світлофільтр з $\lambda=385\text{нм}$ і вторинні з $\lambda=490\text{нм}$ проти контролю на реактиви (4см³ розчину хлоридної кислоти, с=0,01моль/дм³; 2 см³ фосфатного буферного розчину, рН 8,0; 0,5см³ водного розчину нінгідрину, с=0,1моль/дм³).

Флуоресценція нінгідринового похідного серотоніну стабільна протягом 6 годин. Вміст серотоніну в пробі розраховують за калібрувальним графіком. Для цього готують основний розчин серотонінкреатинсульфату, що містить 100мкг/см³ серотоніну. Серотонінкреатинсульфат розчиняють у розчині хлоридної кислоти (с=0,01моль/дм³). 4,62мг солі еквівалентні 2мг серотоніну основи. З основного розчину готують серію робочих розчинів з різною концентрацією серотоніну. Беруть по 4см³ робочих розчинів серотоніну і проводять з ними всі операції, як і з досліджуваними солянокислими

екстрактами. На осі абсцис відкладають вміст серотоніну в пробі, а на осі ординат – інтенсивність флуоресценції. За калібрувальним графіком знаходять вміст серотоніну в досліджуваних пробах.

Далі розраховують вміст серотоніну в досліджуваній тканині за формулою:

$$X = \frac{a \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot m}, \text{ де}$$

X- вміст серотоніну в досліджуваній тканині, мкг % ;

a - вміст серотоніну в пробі солянокислого екстракту, знайдений за калібрувальним графіком, мкг;

V- загальний об'єм солянокислого екстракту серотоніну, см³;

V₁- аліквотний об'єм солянокислого екстракту серотоніну, взятий для реакції з нінгідрином, см³;

m – маса взятої для дослідження тканини.

Лабораторна робота 3

Кількісне визначення адреналіну спектрофотометричним методом

Принцип методу. Метод заснований на спектрофотометричному визначенні інтенсивності синього забарвлення, яке виникає при взаємодії адреналіну з реактивом Фоліна.

Мета роботи. Освоїти методику спектрофотометричного визначення адреналіну в розчині за реакцією з реактивом Фоліна, з'ясувати біологічну роль гормону.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Калібровані пробірки на 10см³. Стандартний розчин адреналіну. Досліджувана біологічна рідина. Розчин натрій карбонату (ω=10%). Реактив Фоліна.

Хід роботи. У дві калібровані пробірки на 10см³ вносять: в першу – 1см³ стандартного розчину адреналіну, що містить 0,04 мг в 1см³; в другу – 1см³ досліджуваного розчину. Далі у кожену пробірку дода-

ють по 4см³ розчину натрій карбонату (ω=10%) і по 0,5см³ реактиву Фоліна. Перемішують вміст пробірок. Рідина поступово забарвлюється в синій колір, сягаючи найбільшої інтенсивності через 5 хвилин. Об'єм рідини в обох пробірках доводять розчином натрій карбонату (ω=10%) до 10см³, перемішують. Спектрофотометрують обидва розчини в кюветах (l=10мм) із світлофільтром з довжиною хвилі 670нм проти контролю на реактиви (містить всі компоненти за винятком розчину адреналіну, загальний об'єм – 10см³). Вміст адреналіну в пробі розраховують за формулою:

$$X = \frac{a \cdot E_1}{E}, \text{ де}$$

X – маса адреналіну в пробі, мг;

a – маса адреналіну в стандартному розчині, мг;

E – екстинкція стандартного розчину;

E₁ – екстинкція досліджуваного розчину.

Роблять розрахунки вмісту адреналіну в 1см³ досліджуваного розчину.

Лабораторна робота 4

Кількісне визначення адреналіну в крові

в умовах стресу флуориметричним методом

Принцип методу. Метод заснований на різниці в інтенсивності флуоресцентності дослідної і контрольної проб.

Мета роботи. Визначити вміст адреналіну в крові та вплив стресу на його рівень. Пояснити причину різної інтенсивності флуоресцентності дослідної і контрольної проб. Поглибити знання про будову, біосинтез та фізіологічну роль катехоламінів.

Обладнання та реактиви. Флуорометр. Лід. Центрифуга. Мірна колба на 2см³ та на 50см³. Мірна центрифужна пробірка. Хроматографічна колонка. Трихлороцтова кислота, (ω=5%). Розчин амоніаку

($c=1,0$ моль/дм³). Бідистильована вода. Оцтова кислота ($c=0,25$ моль/дм³). Фосфатний буфер з рН 4,2. Розчин $K_3[Fe(CN)_6]$, ($\omega=0,25\%$). Свіжоприготований розчин аскорбінової кислоти ($\omega=0,25\%$) у розчині натрій гідроксиду ($c=5,0$ моль/дм³). Адреналін гідротартрат. Хлоридна кислота ($c=1,0$ моль/дм³).

Хід роботи. Тварину доводять до стресового стану шляхом вимушеного активного руху протягом 15 хвилин або високочастотним звуком (свист чи включення гучномовця). Паралельно досліджують вміст адреналіну в крові у стані спокою. Відбирають кров і 1 см³ її вносять у центрифужну пробірку з 6 см³ охолодженої трихлороцтової кислоти ($\omega=5\%$), перемішують і вміщують у льодяну баню на 30 хвилин. Через 30 хвилин стояння на холоді центрифугують при 3000 об/хв. протягом 10 хв. При цьому катехоламіни знаходяться в безбілковому центрифугаті. Центрифугат доводять розчином амоніаку ($c=1,0$ моль/дм³) до рН 8,2-8,4 і наносять на хроматографічну колонку з алюміній оксидом.

Хроматографічна колонка являє собою скляну трубку діаметром 8-10 мм, висотою близько 20 см, розширену у верхній частині і з краном у нижній. Для утримання адсорбенту в колонці в нижню частину над краном вміщують шматок промитої скловати. У хімічному стакані суспендують промитий алюміній оксид (марки „для хроматографії”) і вносять суспензію на хроматографічну колонку. Адсорбент повільно заповнює колонку при відкритому крані. Нашаровують алюміній оксид на висоту близько 10 см. Дають воді повністю стекти з колонки. Далі колонку ще промивають 10 см³ бідистильованої води. Після проходження доведеного до рН 8,2-8,4 центрифугату через колонку її промивають 5 см³ амоніачної води двома порціями по 2,5 см³. Залишки промивних вод видаляють з кінця колонки фільтрувальним папером. Елюцію з колонки адсорбованих на алюміній оксиді катехоламінів проводять розчином оцтової кислоти ($c=0,25$ моль/дм³) двома порціями

по $3,5\text{см}^3$. Після додавання першої порції при закритому крані колонки скляною паличкою перемішують алюміній оксид на колонці і дають осісти. Після цього кран відкривають і елюат збирають у мірну центрифужну пробірку. Другу порцію оцтовокислого елюату збирають у ту ж пробірку, але без попереднього змучування адсорбенту на колонці. Якщо частина адсорбенту попала в елюат, його центрифугують. Об'єм елюату доводять до 7см^3 розчином оцтової кислоти ($c=1,0$ моль/дм³) до рН 4,2. У дві пробірки (дослід і контроль) вносять по 2см^3 фосфатного буферу з рН 4,2 і по 2см^3 елюату з колонки, доведеного до рН 4,2. У дослідну пробірку додають $0,2\text{см}^3$ розчину $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\omega=0,25\%$) і залишають на холоді на 4 хвилини. Потім у дослідну і контрольну проби вносять по 2см^3 свіжоприготованого розчину аскорбінової кислоти ($\omega=0,25\%$) у розчині натрій гідроксиду ($c=5,0$ моль/дм³), перемішують. Через 4 хвилини обидві проби доводять бідистильованою водою до об'єму 10см^3 , після чого у контрольну пробу вносять $0,2\text{см}^3$ розчину $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\omega=0,25\%$). У контрольній пробі у присутності аскорбінової кислоти адреналін окиснюватись не буде. Пробірки витримують у льодяній воді 2 хвилини, після чого визначають інтенсивність флуоресценції дослідної і контрольної проб на флуорометрі, використовуючи первинний світлофільтр з довжиною хвилі збудження флуоресценції продуктів відновлення адренохрому 436нм і вторинні світлофільтри з довжиною хвилі збудження флуоресценції адренохрому 530нм. Слід зазначити, що за таких концентрацій адреналіну в досліджуваному об'єкті необхідно застосувати приставку до флуорометра, яка підвищує чутливість приладу в 10 разів.

Приготування стандартних розчинів адреналіну

Спочатку готують основний стандартний розчин адреналіну. Для цього розчиняють 9,1мг адреналін гідротартрату в 4 краплинах розчину хлоридної кислоти ($c=1,0$ моль/дм³), кількісно переносять у мірну колбу на 25см^3 і доводять бідистильованою водою до риски, пе-

ремішують. В 1см^3 цього основного стандартного розчину міститься 200мкг адреналіну. Далі готують робочий стандартний розчин адреналіну. Основний розчин адреналіну об'ємом $0,2\text{см}^3$ вносять у мірну колбу на 50см^3 і доводять бідистильованою водою до риски. В 1см^3 робочого стандартного розчину міститься 0,8мкг адреналіну.

Окиснення адреналіну в стандартних пробах і визначення інтенсивності їх флуоресценції

У дві пробірки (стандартний розчин адреналіну і контроль) вносять по 2см^3 фосфатного буферу з рН4,2. Оцтову кислоту ($c=0,25\text{моль/дм}^3$) доводять розчином амоніаку ($c=1,0\text{моль/дм}^3$) до рН 4,2 і вносять у першу пробірку $1,83\text{см}^3$, а в другу (контроль) – 2см^3 . Далі у першу пробірку додають $0,2\text{см}^3$ робочого стандартного розчину адреналіну (0,16мкг адреналіну). У пробірку з адреналіном вносять $0,2\text{см}^3$ розчину $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\omega=0,25\%$) і витримують на холоді 4 хвилини. Потім у обидві пробірки вносять по 2см^3 розчину аскорбінової кислоти ($\omega=0,25\%$) у розчині натрій гідроксиду ($c=5,0\text{моль/дм}^3$), перемішують. Через 4 хвилини об'єми в обох пробірках доводять бідистильованою водою до 10см^3 , після чого у другу пробірку (контроль) вносять $0,2\text{см}^3$ розчину $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ($\omega=0,25\%$). Пробірки витримують у льодяній воді 2 хвилини, після чого визначають інтенсивність флуоресценції в обох пробірках.

Далі визначають вміст адреналіну в пробі елюату з хроматографічної колонки (2см^3) за формулою:

$$C = \frac{E_1 - E_2}{E_3 - E_4} \cdot 0,16, \text{ де}$$

C – вміст адреналіну в пробі елюату з хроматографічної колонки, мкг;

E_1 – інтенсивність флуоресценції дослідної проби;

E_2 – інтенсивність флуоресценції контролю дослідної проби;

E_3 – інтенсивність флуоресценції стандартної проби адреналіну;

E_4 – інтенсивність флуоресценції контролю стандартної проби адреналіну;

0,16 – вміст адреналіну в стандартній пробі, взятій для визначення флуоресценції, мкг.

Вміст адреналіну в досліджуваній крові розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot V}{V_1 \cdot V_2 \cdot 10}, \text{ де}$$

X – вміст адреналіну в досліджуваній крові, мг на 100см^3 крові;

C – вміст адреналіну в пробі елюату з хроматографічної колонки, мкг;

V – загальний об'єм елюату з хроматографічної колонки, см^3 ;

V_1 – аліквотний об'єм елюату з хроматографічної колонки, взятий для дослідження вмісту адреналіну, см^3 ;

V_2 – об'єм крові, взятий для аналізу.

Усі проби – дослідні, стандартні, а також усі контрольні досліджують у трьох повторностях і визначають середнє значення показника.

ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ГОРМОНИ”

1. Обґрунтуйте твердження:
 - а) адреналін, кортикостерон, альдостерон і тироксин входять до групи адrenalьних гормонів;
 - б) окситоцин, вазопресин, соматотропін, адренкортикотропін і гонадотропін складають групу гіпофізарних гормонів;
 - в) інсулін, глюкагон і паратгормон відносяться до групи панкреатичних гормонів;
 - г) тестостерон, естрадіол і альдостерон належать до групи статевих гормонів.
2. Наведіть схему біосинтезу адреналіну через окситирамін і назвіть ферменти, які каталізують стадії цього процесу.
3. Напишіть рівняння реакцій перетворення холестеролу у відповідності з наведеною схемою:
холестерол → прогестерон → 11-дезоксикортикостерон → кортикостерон → альдостерон.
4. Із запропонованих тверджень виберіть правильні:
 - а) глюкагон сприяє перетворенню неактивної форми фосфорилази печінки в активну, що супроводжується підсиленням розпаду глікогену в печінці;
 - б) молекула інсуліну представлена мультимером, який складений з трьох протомерів і двох атомів Цинку;
 - в) механізм дії інсуліну, можливо, полягає у тому, що при його взаємодії з рецептором клітинної мембрани виникає пептид, який впливає на активність ряду ферментів;
 - г) АКТГ регулює біосинтез головним чином глюкокортикостероїдів наднирковими залозами.
5. Як впливає інсулін на білковий обмін?

- а) активує синтез білків і нуклеїнових кислот;
- б) пригнічує синтез білків і нуклеїнових кислот;
- в) знижує проникність мембран для амінокислот;
- г) активує перетворення амінокислот у глюкозу;
- д) активує перетворення амінокислот у ліпіди.

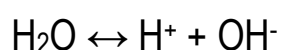
10. ВОДА І МІНЕРАЛЬНІ РЕЧОВИНИ В ОРГАНІЗМАХ

10.1. Вода

Вода, яка є прозорою рідиною без запаху і смаку, з температурами замерзання і кипіння (відповідно, 0°C і 100°C), щільністю 1 г/см³ при 4°C, займає $\frac{3}{4}$ біомаси землі. Відомо, що перші організми виникли у воді. Життя без води є неможливим: наприклад, без їжі собака може прожити 3 місяці, а без води – до 10 днів. У залежності від кількості втраченої води живим організмом спостерігаються різні відхилення гомеостазу: втрата 10 % води призводить до важких наслідків – порушення обміну речовин, а 20-25% – загибелі!

Для води характерний водневий зв'язок, який визначає значною мірою її властивості (точки кипіння і замерзання, високу діелектричну проникність, високу критичну температуру, універсальність як розчинника, здатність утворювати H⁺ і OH⁻ та виступати в якості структурного елемента макромолекул). Водневі зв'язки беруть участь у двобічній проникності біомембран, формуванні вищих рівнів організації молекул білка, нуклеїнових кислот, ліпідів тощо.

Вода – це слабкий електроліт, який дисоціює за рівнянням:



Стан рівноваги дисоціації води характеризується константою дисоціації $K_{\text{H}_2\text{O}}$.

$$K_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{O}]}, \text{ звідси } [\text{H}_2\text{O}] \cdot K_{\text{H}_2\text{O}} = [\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-].$$

Зважаючи на зовсім малу кількість дисоційованих молекул води, приймають концентрацію недисоційованої води за постійну величину ($[\text{H}_2\text{O}] = \text{const}$), добуток $[\text{H}_2\text{O}] \cdot K_{\text{H}_2\text{O}}$ називають K_w (water – вода англійською) $K_w = [\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-]$.

Величина K_w залежить від температури і рівна $1,02 \cdot 10^{-14}$ моль²·л⁻² за температури 25°C, тобто $10^{-14} = [\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-]$. Звідси у нейтральних розчинах $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] = 10^{-7}$ моль·л⁻¹. Прологарифмувавши вираз

$[H^+]=[OH^-]=10^{-7}$, отримуємо $-\lg[H^+]=-\lg[OH^-]=-\lg 10^{-7}$. Оскільки приймають: $pH=-\lg[H^+]$ і $pOH=-\lg[OH^-]$, то $pH=pOH=7$. Таким чином, значення pH – це від'ємний десятковий логарифм молярної концентрації іонів Гідрогену, тобто $pH=-\lg[H^+]$. Мірою кислотності є концентрація іонів Гідрогену. У кислих розчинах $[H^+]$ є більшою за 10^{-7} моль·л⁻¹, тобто $pH < 7$. У лужних (основних) розчинах $[H^+]$ є меншою за 10^{-7} моль·л⁻¹, тобто $pH > 7$. Зміна pH на одиницю означає 10-кратну зміну концентрації іонів Гідрогену.

У живих системах вода є компонентом внутрішнього середовища, бере участь у процесах транспорту і утворення структур та виконує функцію ізолятора. Відомо, що загальний вміст води дорослої людини вагою 70 кг складає 42 л. В основному, організм тварин і людини містить ~70% води, а медузи – до 98%. Слід пам'ятати, що з віком відсотковий вміст води тварин змінюється: зародок – 92%, 21-денний курячий плід – 80%, теля – 72 % , корова – 52%, вівця – 50 – 58%. Різна і кількість води в окремих органах: наприклад, у мозку – 83%, легенях – 79%, хрящах – 55 % та кістках – 22 %.

Складаючи раціони для тварин, керуються тим, що слід давати на 1 кг маси тіла 35 – 40 г води (тобто $40 \cdot 100 = 4$ л/добу). Звідси, на 1 кг сухого корму для свині дають 7 – 8 л води, корови – 4-6 л, вівці – 2-3л, коня – 2-3 л. Важливо знати й те, що потреба молодих тварин у воді є в 2-4 рази більшою за дорослих та обсяг води у різних кормах є відмінним. Наприклад, у зеленій масі трави є близько 85% води, у сіні – 15%, в картоплі й буряці – 75%, а в зерні – 15%.

Вода в живому організмі виявлена у вільному, гідратованому та іммобілізованому стані. Вільна вода є основою крові, лімфи, ліквору, яка приймає участь у перенесенні й постачанні поживних речовин органів, тварин і клітин та видаленні з них продуктів обміну. Міжклітинна вода знаходиться у вільному стані. Гідратаційна вода складає ~4% від усієї води тканин. Ця вода входить до міцел ко-

лоїдних часточок і приймає участь в утворенні гідратаційних оболонок. Наприклад, ~ 1 млн. молекул води припадає на одну молекулу ДНК або РНК у бактеріальній клітині. 10-80 % такої води зв'язують білки, а її втрата призводить до синерезису. Імобілізована вода міститься всередині клітин. Її молекули розміщуються між мембранами, волокнистими структурами; вона розчиняє багато речовин та легко бере участь у реакціях.

Між різними видами води існує динамічна рівновага. При патологіях (нефритах, перикардитах, абсцесах, флегмонах) зростає кількість вільної води. Виникають набряки. При короткочасній роботі (10-15 хв.) накопичується вільна міжклітинна вода, а при тривалій (більше 1 год.) внутрішньоклітинна (імобілізована) вода.

Біологічне значення води є великим, оскільки вона виконує важливі функції. Це розчинник мінеральних і органічних речовин, що є у складі корму (їжі) і продуктів обміну. Приймає участь у реакціях обміну: гідролізу, гідратації, окиснення, відновлення тощо. Вода бере участь у терморегуляції організму. Близько 25% надлишку теплової енергії організму виділяється з водою (через її випаровування з поверхні шкіри). Близько 25% теплоти виділяється з паром видихуваного повітря. Це дає можливість організму підтримувати сталу температуру, відповідні форми органів та повноцінний перебіг всіх реакцій, просторової (вторинної, третинної) та інших структур білків і багатьох сполук й утворень (мембрани).

Обмін води у тканинах і клітинах підтримує гомеостаз живого організму. Клітини й тканини використовують екзо- й ендогенну воду. Екзогенна вода надходить разом з кормом (їжею) і питтям. Вона складає $6/7$ від усієї води. Ендогенна ($1/7$ від загальної водної маси) вода утворюється в тканинах як кінцевий продукт окиснення ліпідів, вуглеводів, білків і нуклеїнових кислот. Наприклад, організм отримує при повному окисненні 100 г різних органічних речовин різні кількості во-

ди: наприклад, жир окислюється до 107,1 г води, вуглеводи – 55,6 г, а білки – 41,3 г води. Це важливо для тварин, які проживають на територіях степів та безводних пустель і при перебуванні їх у зимовій сплячці.

Вода всмоктується у невеликій кількості у ротовій порожнині та стравоході, далі всмоктування відбувається в шлунку (передшлунках), в основному – в тонкій кишці та частково – в товстому кишечнику. Наприклад, у птахів (наприклад, курей) всмоктування води спостерігається в сліпій кишці. Слід зауважити, що у великої рогатої худоби протягом доби всмоктується близько 100 л води, з якої 75% – це травні соки.

Вглиб епітелію слизових оболонок проникає вода разом з перетравленими речовинами внаслідок дифузії й осмосу (частково піноцитозу й активного транспортування). Вона переміщується від апікального до базального кінця клітин через ендоплазматичний ретикулум, потім – у міжклітинний простір, міжклітинну рідину, капіляри, венули, вени, брижі, ворітну вену і печінку, та в велике коло кровообігу. Слід зауважити, що деяка кількість води надходить через лімфатичну систему.

Проміжний обмін води: після всмоктування вода транспортується в різні органи, тканини і клітини, що здійснюється переважно білками крові – альбумінами і глобулінами. Накопиченню води у тканинах сприяють солі натрію (зокрема хлориди), спричиняючи набрякання колоїдів. У той час, як солі кальцію мають протилежний вплив на організм: зменшують зв'язування води білками і стимулюють її видалення. Через це при запальних процесах хворим вводять хлорид кальцію внутрішньовенно, щоб нормалізувати процеси.

Водний баланс – це співвідношення вжитої і виділеної організмом води. Додатний баланс води властивий для організмів, що ростуть, на старості – баланс води від'ємний.

Кінцевий обмін води: вона виділяється із сечею (до 50 %), видиханням повітря (~35 %), калом (~15%).

Регуляція обміну води відбувається нейрогуморальним шляхом, різними відділами центральної нервової системи (корою великих півкуль, проміжним і довгастим мозком, симпатичними і парасимпатичними гангліями). У регуляції бере участь багато залоз внутрішньої секреції. Стимулюють виділення води гормони – тироксин, паратгормон, андрогени, естрогени. А антидіуретиками є гормони – вазопресин, альдостерон, дезоксикортикостерон. Вміст води регулюється наявністю в ній катіонів (іони Na^+ утримують її, а K^+ і Ca^{2+} видаляють)

При багатьох хворобах (порушення морфофункціонального стану і розлади нейрогуморальної регуляції) спостерігається патологія водного обміну, причиною якого може бути загальне і водне голодування, дисбаланс водного обміну (порушення роботи нирок і/або серця, ураження ЦНС і залоз внутрішньої секреції).

10.2. Загальна характеристика мінеральних речовин

Середовище існування живих організмів відіграє значну роль. У живих організмах знаходиться більше 70 хімічних елементів, з яких 47 постійно виявляються в їх клітинах. Як відомо, близько 72 % від загальної маси організму тварини належить неорганічним сполукам, основою яких є вода і мінеральні речовини. В основному, живий організм тварин складається з води, органічних і мінеральних речовин, відповідно 66 %, 28 % і 6 %. У природних умовах усі хімічні елементи утворюють розчинні у воді сполуки, які в складі кормів (їжі), питних вод та повітря, потрапляють у рослини, організм тварин і людини, утворюючи ланцюги живлення (схема нижче).

Чотири основних органічних елементи (С, Н, О, N), макроелементи (К, Na, Ca, Mg, S, P, Cl) і мікроелементи (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Se, J) є біоелементами (тобто елементами, які постійно присутні в

біологічних тканинах). Мінеральні речовини входять до складу опорних тканин (Ca, P і Mg), біологічно-активних сполук (P, Fe, Zn, Cu, J, Co і Mn), високоенергетичних субстанцій (P і S) і сполук, які впливають на ферментну активність, захисні функції організму та транспорт поживних речовин. Найбільше мінеральних речовин є в кістках (48 – 74 % від загальної маси) і хрящах (2 – 10 %).

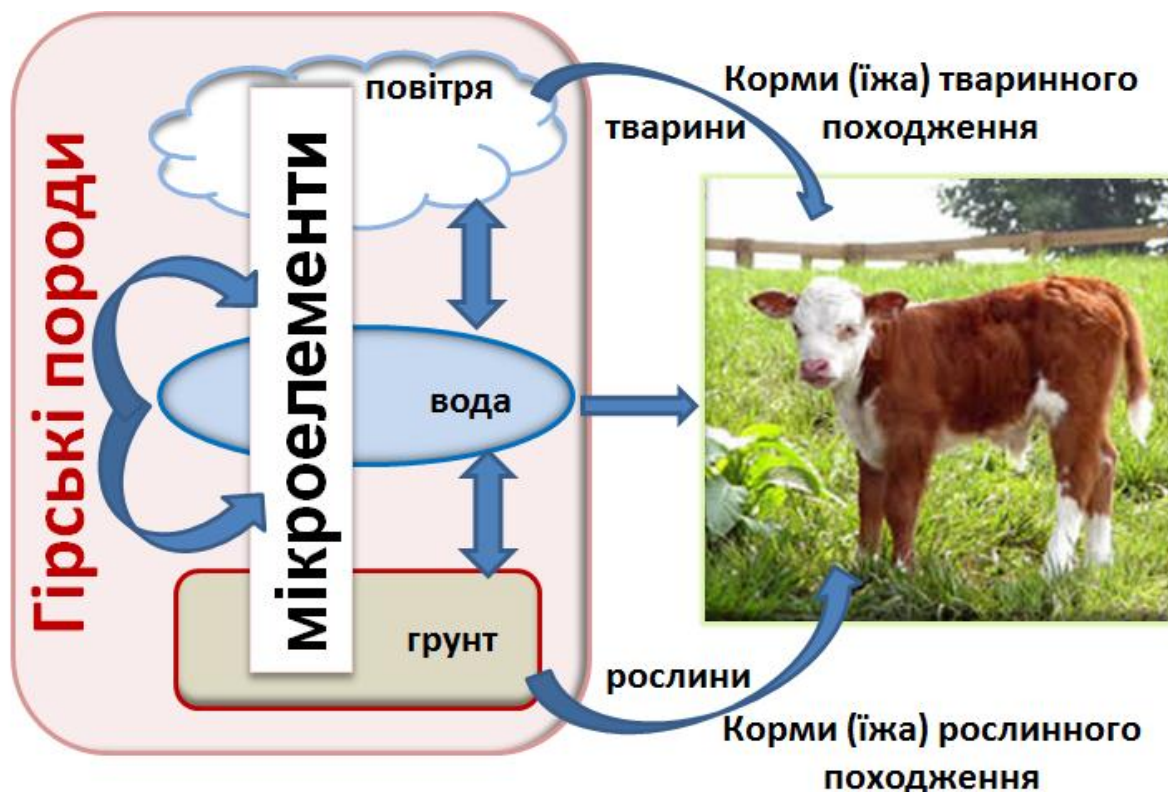


Схема. Ланцюг живлення тварин і людини.

У клітинах мінеральні речовини, що виконують життєво важливі функції, можуть бути у вільному і зв'язаному стані. Мінеральні речовини присутні у зв'язаному стані, наприклад, у кістках, хрящах і дентині – у вигляді міцних нерозчинних відкладів – неорганічних солей вугільної, ортофосфорної та інших кислот, у вільному стані або у вигляді окремих йонів – у таких біорідинах, як кров, лімфа, молоко, травний сік. Частина мінеральних речовин входить у склад біоорганічних сполук.

В організмі мінеральні речовини корму і води зазнають перетворень: ті мінеральні речовини, які є у вільному стані засвоюються напряму, без попередньої переробки, а ті, що у зв'язаному стані, – після ферментативної обробки у травному каналі. Наприклад, фосфорна кислота є в складі нуклеїнових кислот, фосфоліпідів, фосфопротеїдів, Ферум – гемоглобіну, міоглобіну, Магній – хлорофілу тощо. Корм (їжа) спершу розщеплюються ензимами до органічних і неорганічних речовин, а потім – до молекул, далі – на йони і після цього засвоюються.

В організмі тварин і людини всмоктування основної маси метаболітів відбувається через слизову оболонку токої кишки, а інша її частина – в шлунку. Наприклад, фосфорна кислота всмоктується у вигляді мінеральних солей або фосфорних етерів і естерів. Всмоктування ж двовалентних або полівалентних катіонів є багатоступеневим процесом, що залежить від багатьох факторів. Наявність у хімусі жирів, жовчі й соку підшлункової залози стимулює всмоктування ряду катіонів, а вітамін D – Ca^{2+} . Із аніонів найшвидше всмоктуються хлорид-іони, повільніше йодид- і бромід-іони.

Мінеральні речовини проникають в цитоплазму клітин покривного епітелію слизової оболонки в результаті дифузії або осмосу, певна частина – піноцитозом або з допомогою білків-переносників. По ендоплазматичному ретикулумі вони переміщуються від апікального до базального кінця клітини, далі надходять у міжклітинний простір, а з нього – у кровоносну (частково в лімфатичну) систему ворсинок, брижі, в печінку, з якої розносяться по всьому організму. Частина з них депонується в печінці та клітинах інших тканин. Надлишок мінеральних речовин у їжі може призводити до підвищеного осмотичного тиску в організмі та зміни йонного складу біорідин. Такі явища усуваються рефлекторно, адже з появою відчуття спраги вживається відповідна

кількість води, а згаданий надлишок видаляється нирками, слизовою оболонкою кишок і потовими залозами.

Таблиця 21. Вміст макроелементів у кормах для тварин, зокрема великої рогатої худоби, свиней

Корми*	Хімічні елементи (г/ кг)						
	Ca	P	Mg	K	Na	Cl	S
Трава							
Лучне пасовище	2,8	0,9	0,7	5,8	0,6	0,2	0,8
Кукурудза	1,24	0,78	0,48	3,53	0,28	0,72	0,63
Пшениця озима	1,5	0,9	0,3	3,8	0,5	1,0	0,5
Жито озиме	0,6	0,8	1,2	2,4	0,1	0,8	0,8
Тимофіївка	1,3	0,7	0,6	5,7	3,2	1,7	0,6
Конюшина	3,7	0,6	0,6	2,1	0,5	0,4	0,5
Люпин	1,9	0,5	0,4	2,8	0,1	0,7	0,9
Ріпак	1,4	0,4	0,4	3,2	0,8	0,9	0,6
Сіно лучне	7,2	2,2	1,7	16,7	0,4	6,8	1,8
Трав'яне борошно (різнотрав'я)	5,8	3,1	3,3	8,2	2,5	2,2	1,9
Солома вівсяна	3,4	1,0	1,1	13,9	1,0	4,3	1,7
Солома пшенична	2,8	0,8	0,8	7,6	1,3	2,6	0,8
Полова горохова	13,1	3,5	2,5	10,5	1,0	1,0	1,5
Силос комбінований	0,9	0,5	0,3	5,8	0,1	1,2	0,1
Сінаж конюшини	5,5	0,6	0,7	7,9	0,2	1,5	0,7
Буряки кормові	0,4	0,5	0,2	4,0	1,3	2,0	0,3

*адаптовано у цій і наступній табл.: Методичні вказівки для виконання лабораторних робіт з дисципліни «Годівля тварин» напрям підготовки 6.110101 «Ветеринарна медицина» (скорочений термін навчання), Укладачі: І.І. Ібатуллін, Ю.О. Панасенко, М.Я. Кривенок, І.І. Ільчук, О.В. Яценко. – К: Друкарня фітососіологічного центру. – 197 с.

Переважна кількість мінеральних речовин відкладається в органах і тканинах або використовується окремими клітинами для різних потреб, а частина їх залишаються і в крові та лімфі.

Депонування мінеральних речовин відбувається локально. У кістковій тканині Кальцій і Магній відкладаються у вигляді фосфатів, карбонатів та апатитів, у скелеті – Флуор, Титан, Стронцій, Цезій, Рубідій, Алюміній, Берилій, Плюмбум, Станум, у тканині печінки і в кістковому мозку (де утворюються еритроцити) – Ферум. Багато Fe накопичується в селезінці – місці руйнування еритроцитів. Цинк і Манган сконцентровуються переважно у тканинах підшлункової залози. Місцем депонування Йоду є щитовидна залоза.

Таблиця 22. Вміст мікроелементів у кормах для тварин, зокрема великої рогатої худоби, свиней

Корми	Хімічні елементи (мг/ кг)					
	Fe	Cu	Zn	Mn	Co	J
Трава						
Лучне пасовище	47	1,8	6,8	36	0,24	0,03
Кукурудза	86	0,5	3,5	11,3	0,03	0,05
Пшениця озима	48	3,6	4,4	56	0,012	0,02
Жито озиме	70	0,1	6,9	5,8	0,01	0,01
Тимофіївка	88	1,2	4,1	27	0,04	0,26
Конюшина	99	2,0	11,9	16,4	0,02	0,08
Люпин	60	0,8	8,9	51,2	0,31	-
Ріпак	88	1,8	4,5	18,0	0,12	0,03
Сіно лучне	92	5,5	21,2	94	0,1	0,4
Трав'яне борошно (різнотрав'я)	223	9,0	37,6	57,5	0,2	0,35
Солома вівсяна	141	2,9	26	90	0,7	0,44
Солома пшенична	360	1,8	29	44	0,31	0,50
Полова горохова	4270	7,5	50,0	18,1	0,2	0,4
Силос комбінований	38,0	1,4	3,6	11,0	0,01	0,03
Сінаж конюшини	72,0	2,7	5,1	28,0	0,07	0,14
Буряки кормові	8,0	1,9	3,3	11,1	0,10	0,01

Біологічне значення мінеральних речовин полягає у підтриманні нормального водного балансу і розподіленні води в тканинах, забезпе-

ченні постійного осмотичного тиску та кислотно-лужної рівноваги, нормалізації нервово-м'язового збудження і проведення нервових імпульсів, а також генерації біотоків та ін.

Таблиця 23. **Вміст макроелементів у тканинах і органах тварин** (мг /1 г сирової тканини; адаптовані дані Ф.Я. Бернштейна, цит.: О.І Кононський “Біохімія тварин”. – К: Вища школа, 2006. – С.188.)

Орган або тканина	K	Na	Ca	Mg	Cl	P
М'язи	3,6	0,72	0,07	0,23	0,66	2,2
Серце	2,5	1,85	0,1	0,17	1,35	2,7
Легені	1,5	2,50	0,17	0,07	2,6	1,2
Мозок	3,3	1,7	0,12	0,16	1,5	3,8
Печінка	2,15	1,9	0,12	0,22	1,6	2,1
Еритроцити	4,6	0,8	–	0,05	1,9	0,6
Нирки	1,75	1,75	0,2	0,21	2,2	1,4
Сироватка крові	0,2	3,35	0,1	0,02	3,7	0,15
Кісткова тканина	0,61	1,8	110,0	1,05	1,9	50,5
Зубна емаль	0,5	2,5	360,0	4,0	3,0	170,0

Обмін йонів між клітиною і міжклітинною рідиною відбувається за законами осмосу. В біорідинах мінеральні речовини знаходяться у зв'язаному з білками стані, та у вигляді окремих йонів (активна форма) чи солей. Обмін мінеральних речовин в організмі відбувається постійно. У епіфізі великої гомілкової кістки за 9 діб оновлюється ~11% Фосфору, а за 50 діб – 28,6 %. За добу в організмі миші ~20 % Кальцію і 5 % Стронцію. 50 % радіоактивного Йоду щитовидної залози обмінюються за 5 год. після введення. 13 % його видаляється з організму через 3 год., а 50 % - через добу. Введений в організм радіоак-

тивний Ферум через декілька годин з'являється в гемоглобіні. Близько 60 % Феруму еритроцитів оновлюється упродовж 3 тижнів. У шкірі багато є йонів Натрію і Калію. Значна кількість їх є підшкірній і м'язовій тканинах, плазмі, крові, лімфі і лікворі. Важливо зазначити, що йони Калію сконцентровані всередині клітин, а Натрію – у позаклітинному просторі.

Виділяються мінеральні речовини з сечею, потом і калом та молоком. Із сечею видаляються Натрій, Калій, Кобальт, Кальцій, Магній, Вісмут, Літій, Станум, Хлор, Бор, Бром, Йод, Флуор (фтор), Сульфур та ін. Натрій і Калій виділяються у складі хлоридів і сульфатів, Сульфур – у вигляді сульфатів і парних сполук, Фосфор – у вигляді середніх і кислих солей ортофосфорної кислоти. Із калом видаляються Ферум, Кальцій, Купрум, Стронцій, Алюміній, Берилій, Манган, Цинк, Молібден і загалом важкі метали у складі різних солей, а також силіцієва кислота і силікати. Лужноземельні солі фосфорної кислоти виділяються слизовою оболонкою кишок. Із потом виділяються мінеральні речовини у вигляді хлоридів, сульфатів, фосфатів і т.п. Мінеральний баланс є додатним у молодих і запліднених тварин, у старих – від'ємним, а його рівновага спостерігається у стадії зрілості організмів.

На відміну від наземних живих організмів, гідробіонти протягом життя перебувають у середовищі, що являє собою водний розчин мінеральних речовин тої чи іншої концентрації. Між організмами гідробіонтів і середовищем перебування відбувається постійний обмін йонами. Вміст основних іонів у природних водах ілюструє табл. 24.

Природна дощова вода має рН близько 5,6. Це обумовлено тим, що в ній розчинений CO_2 . Ступінь кислотності, яку витримує та чи інша риба, пов'язана не тільки з рН, а також із вмістом у воді розчинених солей. Кислота, можливо, пригнічує активне поглинання організмом риби Na^+ . Це узгоджується з даними, що риба зникає спочат-

ку з озер із дуже низьким вмістом розчинених солей і гине особливо весною, під час танення снігу, коли з потоком талої води в практично незабуферену воду навалюється хвиля кислої води.

Таблиця 24. Вміст основних іонів у природних водах (ммоль/дм³)

Іон	М'яка озерна вода	Річкова вода	Жорстка річкова вода	Материкова солона вода	Морська вода	Вода Мертвого моря
Na ⁺	0,17	0,39	6,13	640	470,2	840
Mg ²⁺	0,15	0,21	0,66	6	53,6	2302
Ca ²⁺	0,22	0,52	5,0	32	10,2	583
K ⁺	-	0,04	0,11	16	10,0	152
Cl ⁻	0,03	0,23	13,5	630	548,3	6662
SO ₄ ²⁻	0,09	0,21	1,4	54	28,3	8,4
HCO ₃ ⁻	0,43	1,11	1,39	3	2,35	Сліди

Солонувата вода, що містить від 3,0 до 0,05% солей, має велике біологічне значення. Вона створює бар'єр для розповсюдження багатьох морських тварин з одного боку і прісноводних – з іншого, а також утворює перехідну зону між морським і прісноводним середовищем перебування тварин.

Деякі водні тварини переносять великі коливання концентрації солей у воді; їх називають евригалінними. Інші тварини мають обмежену толерантність до зміни концентрації солей у воді; їх називають стеногалінними. Морська тварина, яка може проникати в солонуваті води і виживати в них – евригалінна. Евригалінна тварина може навіть знаходитися більш чи менш довго в прісній воді. Евригалінними називають також тих прісноводних тварин, які переносять значні підвищення солоності води.

Стеногалінний організм, морський чи прісноводний, може переносити зміни концентрації солей у воді у вузьких межах. Чіткої грані між евригалінними і стеногалінними тваринами немає.

Морські риби вимушені постійно протистояти зневодненню, а прісноводні – оводненню внаслідок різниці осмотичного тиску внутрішніх рідин і зовнішнього середовища. Тому об'єм сечі у прісноводних риб у 10 разів більший, ніж у морських. Морські риби гіпоосмотичні, в них постійно відбувається витік води з організму в концентровану морську воду, оскільки осмотичний тиск внутрішніх рідин цих риб значно менший осмотичного тиску морської води. Ці риби повинні компенсувати неминучу осмотичну втрату води і для цього п'ють морську воду. Хоча пиття компенсує втрату води, разом з водою з кишкового тракту всмоктується велика кількість солей. Для того, щоб після пиття морської води в тілі затримувалась тільки вода, солі повинні виводитися в концентрації більш високій, ніж їх концентрація в морській воді. Нирка костистої риби на це не здатна, бо вона не може зробити сечу більш концентрованою, ніж плазма крові. Для цього слугують зябра, які виконують подвійну функцію – осморегуляцію і газообмін. Секреція солей крізь зябровий епітелій є активним транспортом, оскільки вона направлена проти градієнта концентрації солей. Проте слід зазначити, що крізь зябра виділяються тільки Na^+ і Cl^- , а крізь нирку – Mg^{2+} і SO_4^{2-} , які складають приблизно десятку частку солей морської води.

Осмотичний тиск крові прісноводних костистих риб набагато вищий, ніж прісної води. Внаслідок цього створюється осмотичний притік води в організм цих риб. Велика роль у цьому належить зябрам внаслідок їх великої поверхні і досить високої проникності. Надлишок води виводиться з сечею. Сеча ця дуже рідка і виробляється в кількостях, що складає до третини маси тіла риби. Більшість костистих риб мають лише обмежену здатність переходити з прісної води в море і

назад. Та все ж у міног, лососів, вугрів такі міграції складають частину нормального життєвого циклу. При переході з прісної води в морську вугри починають ковтати морську воду для досягнення ізоосмотичного балансу з середовищем. Якщо ж перевести вугра з морської води в прісну, то підсилюється утворення сечі і через деякий час настає осмотична рівновага.

Деякі риби здатні пережити перенесення з морської води в прісну тому, що вони припиняють ковтати воду, але, наприклад, *Pleuronectes platessa* оводнюється і гине у воді з пониженою солоністю. *Sebasticus marmoratus* захищає себе від змін солоності навколишнього середовища шляхом утворення прозорої слизової плівки на всій поверхні тіла.

Пластинчастозяброві, хоч і ізоосмотичні з морською водою, все ж можуть регулювати йонний склад своїх рідин. Наприклад, концентрація Na^+ утримується на рівні приблизно вдвічі нижчим, ніж у морській воді. Це означає, що Na^+ буде дифундувати в організм акул з морської води головним чином крізь тонкий зябровий епітелій; крім того, деяка кількість Na^+ надходить з кормом. Оскільки концентрація Na^+ постійно підвищується, а її треба утримувати на низькому рівні, зайві Na^+ повинні виводитися назовні. Частина Na^+ виводиться через нирку, але більш важливу роль у цьому відіграє ректальна залоза, яка відкривається через проток у задній відділ кишечника – пряму кишку. Ця залоза виділяє рідину з високими концентраціями Na^+ і Cl^- , навіть дещо більш високими, ніж у морській воді. Наприклад, у акул, що знаходились у морській воді з концентрацією Na^+ 440 ммоль/дм³, вміст Na^+ в секреті ректальної залози досягав 500-560 ммоль/дм³. Проте виведення солей у пластинчастозябрових не можна повністю пояснити функцією ректальної залози. Якщо у колючої акул *Squalus acanthias* видалити ректальну залозу, то концентрація йонів у плазмі все ще може залишатися на звичайному рівні, тобто приблизно вдвічі нижчою,

ніж у морській воді. Головну роль у виділенні Na^+ все ж відіграють нирки.

Тому те, що пластинчастозяброві знаходяться майже в осмотичній рівновазі з морською водою, їм немає потреби пити морську воду і тим самим уникають поглинання великих кількостей Na^+ з морської води.

Концентрація розчинених речовин у крові пластинчастозябрових трохи вища, ніж у морській воді. Це викликає невеликий осмотичний притік води крізь зябра. Таким способом риба повільно поглинає воду, яка йде на утворення сечі і секрету ректальної залози. Підтримання ізоосмотичності рідин цих риб з морською водою за рахунок сечовини дає змогу зберігати низьку концентрацію солей організмів, які живуть у морі. Важливу роль в регуляції осмотичного тиску відіграють йони Ca^{2+} . Риба, яка голодує, може тижнями жити у водопровідній воді, але швидко гине при перенесенні у дистильовану воду. Причиною загибелі може бути швидка втрата Ca^{2+} через зябра. Роль Кальцію при виживанні в прісних водах поки не з'ясована. Йони Ca^{2+} гальмують дифузію води крізь клітинні мембрани. Було виявлено, що при значних концентраціях Ca^{2+} (близько 40 мг%) морські риби можуть переносити значне опріснення. Прісноводні ріки і озера, у воді яких значні концентрації Ca^{2+} , населені морськими видами костистих риб. Йони Ca^{2+} запобігають токсикації риб йонами Cu^{2+} . У воді, що не містить йонів Ca^{2+} , наявність тільки чверті початкової концентрації йонів Cu^{2+} призводить до загибелі значної кількості риби.

У більшості морських безхребетних тканинна рідина має такий же осмотичний тиск, як і морська вода; вони ізоосмотичні зі своїм середовищем існування. Але це не значить, що склад речовин, розчинених у рідині їх тіла, такий же, як і в морській воді. Концентрації найважливіших йонів (в ммоль/кг води) у морській воді і в рідинах тіла деяких морських тварин ілюструє табл. 25.

Серед круглоротих виключно морські стеногалінні міксини з усіх істинних хребетних мають концентрації солей у рідинах тіла такі ж, як і концентрації солей у морській воді; нормальна концентрація Na^+ у крові міксин навіть трохи більша, ніж у навколишньому середовищі. Разом з тим міксини в значній мірі здатні до йонної регуляції, хоч, будучи ізоосмотичними з морською водою і маючи високі концентрації солей, вони поведуться в осмотичному відношенні як безхребетні.

Таблиця 25. Концентрації найважливіших іонів (ммоль/кг води) у морській воді і в рідинах тіла деяких морських тварин

Об'єкт	Na^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	K^+	Cl^-	SO_4^{2-}
Морська вода	478,3	54,5	10,5	10,1	558,4	28,8
Медуза <i>Aurelia</i>	474	53,0	10,0	10,7	580	15,8
Поліхета <i>Aphrodite</i>	476	54,6	10,5	10,5	557	26,5
Морський їжак <i>Chinus</i>	474	53,5	10,6	10,1	557	28,7
Мідія <i>Mytilus</i>	474	52,6	11,9	12,0	553	28,9
Кальмар <i>Loligo</i>	456	55,4	10,6	22,2	578	8,1
Краб <i>Maia</i>	488	44,1	13,6	12,4	554	14,5
Норвезький омар <i>Nephrops</i>	541	9,3	11,9	7,8	552	19,8
Міксина <i>Muxine</i>	537	18,0	5,9	9,1	542	6,3

За винятком міксин, у всіх морських хребетних концентрації солей у рідинах тіла набагато нижчі, ніж у зовнішньому середовищі.

Друга група круглоротих – міноги – зустрічаються і в прісних водах, і в морі, але навіть морська мінога *Petromyzon marinus* піднімається для нересту в ріки. У прісноводних і морських міног осмотичний тиск рідин тіла в 3-4 рази нижчі, ніж у морської води.

У м'язах риб у великих кількостях містяться Фосфор, Кальцій, Магній, Натрій, Сульфур, Хлор та ін. Крім того, в організмах риб містяться в невеликих кількостях Ферум, Купрум, Манган, Кобальт, Бром, Йод. На відміну від теплокровних тварин, в м'язах риб відносно високий вміст Кальцію, Магнію, Йоду, Феруму (табл. 26).

У м'язах риб міститься: S – 100-300мг%, Cl – 60-250мг%, Mn – 0,01-0,05 мг%, Zn – 0,7-4,0 мг%. Високий вміст Цинку в тканинах деяких видів риб обумовлений їх харчуванням молюсками, які містять багато цього елемента. З мінеральних речовин, які проходять крізь зябра, Ca²⁺ всмоктується в присутності фосфатів і відкладається в тілі риб у вигляді кальцій фосфату. Загальний вміст мікроелементів (Cu, Mn, Fe, Co, Ni, Ag, Mo, Cr) найбільший у планктоноїдних риб (табл. 27).

Таблиця 26. Мінеральний склад м'язів теплокровних тварин і риб (мг%)

Об'єкт	Ca	Mg	P	K	S	I	Co	Fe
Велика рогата худоба	17	23	211	344	160	0,002	0,003	1,8
Свині	8	27	170	316	220	0,006	0,008	1,9
Прісноводні риби	47	77	193	264	200	0,011	0,002	2,0
Морські риби	46	62	226	273	197	0,137	0,002	3,5

Таблиця 27. Мінеральний склад м'язів деяких риб (мг %)

Риба	K	Ca	Fe	Mg	P
Осетер	304-309	31-48	4,1-4,6	32-35	195-198
Оселедці	213-245	56-62	3,1-3,2	26-36	244-270
Щука	295-306	51-52	3,0-3,5	23-27	188-195
Скумбрія	267-287	35-45	1,1-1,3	85-89	230-238
Тріска	210-230	28-32	1,0-1,2	75-83	210-216
Тунець	290-310	35-45	1,6-1,9	90-99	205-209
Карась	250-260	50-70	1,0-1,2	135-145	145-155
Окунь	260-270	45-55	–	70-80	265-275
Товстолобик	270-278	35-43	1,0-1,2	95-98	245-253

10.3. Роль Йоду в процесах життєдіяльності

В організмі тварин мікроелемент Йод, вміст якого складає 0,027% від загальної маси, є необхідним для синтезу тиреоїдних гормонів. Звідси, близько 65% Йоду крові знаходиться у складі тирокси-

ну, дийодтироніну і трийодтироніну, інша його частина зв'язана з білками, в основному з альбумінами. У крові Йоду міститься 0,5-10мкг на 100см³, а найбільше його є в тканинах щитоподібної залози, печінки, нирок.

Багато Йоду мають морські водорості – фукус, філофора, ламінарія і деякі губки. У тканинах риб, особливо морських, теж є значна його кількість. В організм тварин Йод надходить з кормом чи водою. Йодиди всмоктуються краще, ніж Йод, зв'язаний з білками і амінокислотами. Частина Йоду всмоктується з допомогою білкових переносників. Обмін Йоду в організмі тварин регулюється тиреотропним гормоном гіпофізу.

При недостатчі Йоду в організмі тварин знижується основний обмін речовин, окиснювальне фосфорилування, пригнічується синтез білка, настає ожиріння, затримується ріст.

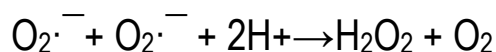
10.4. Роль Купруму в процесах життєдіяльності

Сполуки Купруму є необхідними компонентами їжі. Купрум широко розповсюджений в харчових продуктах і ознак його недостатності у людей не виявлено. Недостатність Купруму зрідка зустрічається у тварин: інколи внаслідок того, що поглинанню Cu^{2+} заважає Zn^{2+} , а іноді через зв'язування Купруму молібдатом у вигляді інертного комплексу. У тварин з недостатністю Купруму розвиваються порушення в кістках, порушується синтез гемоглобіну, знижується активність цитохромоксидази. Білок еластин з артеріальних стінок має мало поперечних зв'язків, артерії втрачають міцність. Купрум в клітинах може цілком знаходитися у комплексі з білками. Йони Купруму входять в активні центри багатьох ферментів. Як і Ферум, йон Купруму входить в ту частину молекули ферменту, де відбувається взаємодія з O_2 . Здатність Cu^+ переходити до Cu^{2+} і навпаки реалізується у різних окисно-відновних процесах. Білки, що містять Купрум (наприклад,

цитохром *c*), виконують функції одноелектронного переносника. Бактеріальні азурини є яскраво-блакитними білками. Вважають, що вони функціонують у ланцюгах перенесення електронів. Блакитне забарвлення є ознакою наявності йона Cu^{2+} ; воно проявляється і у гідратованого йона $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, а ще більш інтенсивно – у йона $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ та в мідних пептидних хелатах. Купрумвмісний пластоціанін з водоростей і зелених рослин функціонує в ланцюзі перенесення електронів між двома світлопоглинаючими центрами, що входять у систему фотосинтезу.

Більшість купрумвмісних білків реагує з O_2 . Купрумвмісними є переносник Оксигену гемоціанін, галактозооксидаза, яка каталізує окиснення 6-оксиметилької групи галактози в альдегідну. Вважають, що галактоза і O_2 можуть зв'язуватись з Купрумом, який при цьому може переходити з Cu^+ в Cu^{2+} і навпаки. Амінооксидази, що містять як Cu^{2+} , так і флавінові коферменти, за своєю дією подібні до оксидаз амінокислот. Купрумвмісними є ферменти уратоксидаза, тирозиназа (або поліфенолоксидаза). У тварин тирозиназа бере участь у синтезі діоксифенілаланіну (ДОФА).

Супероксиддисмутази, що каталізують реакцію:



містять йони Cu^{2+} і Zn^{2+} . Cu^{2+} безпосередньо бере участь у каталітичному процесі. Блакитні купрумвмісні оксидази можуть відновлювати обидва атоми молекулярного кисню до H_2O . Цим вони нагадують цитохромоксидазу, яка також містить Купрум, але вони не містять Феруму. α_2 -Глобулін, церулоплазмін, містить 0,34% Купруму. Транспортуючи Купрум, церулоплазмін забезпечує його рівень в тканинах, особливо в печінці. Церулоплазмін, можливо, якимось зв'язаний з регуляцією вмісту Купруму в організмі. Крім того, церулоплазмін проявляє ферментативні властивості; він може каталізувати окиснення Fe^{2+} у Fe^{3+} .

Купрум бере участь у біосинтезі ферментів каталази і пероксидази. Йони Cu^{2+} інгібують лужну фосфатазу, амілази, ліпази, пепсин, β -глюкуронідазу, прискорюють окиснення вітаміну С. Купрум підсилює використання тканинами вітамінів Е і К, активує дію інсуліну і гальмує дію адреналіну, стимулює дію гормонів гіпофізу.

10.5. Роль Фосфору в організмах

Хімічний елемент Фосфор є одним з найбільш важливих мікроелементів усіх живих організмів. Академік В.О. Енгельгард назвав Фосфор елементом життя.

В організмі тварин Фосфор у формі фосфатів Кальцію і Магнію входить до складу кісток і зубів, входить до складу буферних систем. Фосфор містять значна кількість білків (фосфопротеїнів), ліпідів (фосфоліпідів), нуклеотиди і нуклеїнові кислоти, макроергічні фосфати (фосфоенолпіруват, 1,3-дифосфогліцерат, фосфокреатин, фосфоаргінін, нуклеозидтрифосфати, ацилфосфати і ін.).

Фосфор бере участь практично у всіх процесах трансформації і акумуляції енергії в живих організмах шляхом чи субстратного окиснювального фосфорилування, чи окиснювального фосфорилування в електронотранспортній системі у процесі клітинного дихання. В організмах тварин вміст Фосфору складає близько 1% загальної маси.

Фосфор у біологічних об'єктах визначають переважно за методом Фіске-Суббароу. Тканини мінералізують при нагріванні з концентрованою сульфатною кислотою і окиснюють нітратною кислотою чи гідроген пероксидом. При цьому Фосфор, у якій би формі він не був у досліджуваній тканині, переходить у форму пірофосфату. Далі пірофосфат гідролізують до ортофосфату і останній визначають за реакцією з молібдатом. Утворену фосфорномолібнову кислоту відновлюють до молібденової сині сильними відновниками. Для цього можна

використати 1-аміно-2-нафтол-4-сульфонову кислоту (ейконоген), аскорбінову кислоту, станум(II) хлорид, сіль Мора і ін. Забарвлений у синій колір розчин колориметрують.

10.6. Характеристика мінеральних речовин

У водоростях накопичується значно більше мінеральних речовин, ніж у наземних рослинах.

Поглинання мінеральних елементів водоростями не завжди знаходиться у прямій залежності від їх вмісту в навколишньому середовищі. Так, Купрум навіть у високих концентраціях (10мг/дм^3) не впливає на швидкість росту *Euglena gracilis*, а Кадмій помітно знижує цю швидкість вже в концентрації 3мг/дм^3 . Швидкість росту водоростей зменшується із збільшенням концентрації Cd^{2+} . Вміст Cu^{2+} в клітинах завжди нижчий, ніж у середовищі, тоді як вміст Cd^{2+} у них поступово починає перевищувати його вміст у середовищі.

У *Anabaena cylindrica* Кадмій у підвищеній концентрації ($c=2 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³) викликає хлороз, клітинні деформації, а також зменшення частоти гетероцист. Він є найбільш токсичним важким металом для морських організмів. Нормальна концентрація Cd^{2+} у морській воді становить $2 \cdot 10^{-8}$ моль/дм³. Для зеленої водорості *Ulva lactuca* і бурої *Laminaria sacharina* токсична дія Кадмію відмічена при концентрації Cd^{2+} $0,8-2,6 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³, а при $c=4,5 \cdot 10^{-6}$ моль/дм³ водорості у більшості випадків гинуть. Цей елемент акумулюється в клітинах, де його вміст зростає в 100–150 разів. Після перенесення водорості *L. sacharina* в середовище, в якому відсутні Cd^{2+} , відновлення не відбувається так як Cd утворює в тканинах водорості стійкі сполуки.

Підвищена концентрація Купруму в живильному середовищі повністю інгібує ділення клітин синьо-зелених водоростей. Для *Microcystis aeruginosa* такою концентрацією є $25-27\text{мг/дм}^3$ Cu^{2+} , а для

Synechocystis minuscula – 30мг/дм³ Cu²⁺. Аналогічний вплив на ділення клітин виявляє Нікол.

Деякі прісноводні водорості можуть накопичувати Плюмбум, вміст якого може становити 20% сухої біомаси. Різні водорості (*Cladophora*, *Rhizoclonium*, *Hydrodictyon*, *Oscillatoria* та ін.) практично використовуються для очищення промислових стоків, що містять Плюмбум. При цьому Плюмбум зв'язується з клітинними стінками водоростей і, якщо не перевищені допустимі межі, водорості не пошкоджуються.

За ступенем токсичності важкі метали поділяються на три групи. До першої відносяться Cu, Zn, Fe. Під їх впливом не відбувається нормальний поділ клітин, ланцюгові колонії вкорочуються, інгібується утворення хітинових тканин, що з'єднують окремі клітини. Вважають, що ці метали блокують процеси кремнієвого обміну. До другої групи відносять Hg, Cd, Pb. Вони викликають розпад позаклітинних метаболітів. У результаті формуються грудкоподібні колонії, клітини яких стають зігнутими і видовженими. До третьої групи входять Sr, Ni, Se, Sb, As. Вони не викликають помітних порушень у морфології і фізіології водоростей при незначних концентраціях, а при значних дають ефект, подібний до дії важких металів першої і другої груп.

Для діатомової водорості *Navicula inceria* найбільш токсичним є Cd, а потім Pb. Токсичність Cu і Zn майже на порядок нижча.

Як індикатори при забрудненні водоймищ токсичними металами Cu і Zn використовують водорості *Skeletonema costatum* і *Nitzschia longissima*. Оптимальною концентрацією Cu²⁺ для їх росту є 10мкг/дм³, а 25мкг/дм³ затримує їх розвиток. Ці водорості терпимі до Zn. Протягом тривалого часу вони витримують концентрацію Zn²⁺ 150мкг/дм³. При високих концентраціях сполук Цинку відбувається розпад колоній цих водоростей.

Для визначення токсичності Mn і Zn у воді можна використати *Chlorella pyrenoidosa*. При концентрації Mn^{2+} 50мг/дм³ і Zn^{2+} 200мг/дм³ водорість гине через 96 годин. Вміст Mn і Zn в тканинах хлорели в сотні разів перевищує рівень цих елементів у навколишньому середовищі. У клітинах хлорели накопичується і Уран, причому мертві клітини поглинають його більше, ніж живі.

Діатомові водорості потребують Бор. При його дефіциті в культуральному середовищі поділ їх клітин припиняється через 24 – 30 годин. Через 48 годин у клітинах наступають незворотні зміни: майже вдвічі збільшується їх об'єм, підвищується вміст білків, нерозчинних вуглеводів, фенолів, хлорофілів, вдвічі зростає інтенсивність темного дихання.

Деякі морські водорості для свого розвитку потребують Ванадій (бура водорість *Fucus spiralis*, зелена водорість *Enteromorpha compressa*).

10.7. Іонний обмін



Зовсім мала кількість води, яка присутня в організмі тварин, знаходиться в істинно мобільному стані, що є характерним для неживої природи. Основна частина води є компонентом внутрішньоклітинних і зовнішньоклітинних структур. Одна з головних ролей серед них належить глікопротеїновому компоненту (зокрема, протеогліканам і

кислим муко полісахаридам), що складається з молекулярних поліаніонів і утворює сітчасту структуру. Негативні заряди таких макромолекул нейтралізуються іонами Na^+ , які в свою чергу оточуються гідратною оболонкою. Внаслідок всіх взаємодій утворюються желеподібні або сильно гідратовані структури, в яких вода і іони швидко й іони швидко обмінюються та встановлюється стаціонарний стан, характерний для живих систем. Таким же чином вода зв'язується і в структурі клітин. У розрахунках прийнято, що вода розподілена між двома середовищами, які називають внутрішньоклітинним і зовнішньоклітинним. Як зазначено вище, загальний вміст води у тілі дорослої людини масою 70 кг становить 42 л, з яких на внутрішньоклітинне середовище припадає 28 л (40 %), а на зовнішньоклітинне – 14 л (20%), з яких плазма має 3,5 л (5%). Окремі середовища розділяються мембранами, властивості яких визначають транспорт води, тобто утворення градієнта концентрації. Склад внутрішнього (інтерстиціального простору та плазми крові) підтримується на постійному рівні з допомогою певних динамічних процесів. За складом електролітів воно є дуже відмінним від внутрішньоклітинної рідини. Основним катіоном всередині клітини є K^+ (біля 160 мМ), значно менше займають наступні іони Mg^{2+} (біля 13 мМ) і Na^+ (близько 10 мМ). Аніони внутрішньоклітинної рідини – це білки (20 % від маси клітини, тобто 8 мМ), фосфати (50мМ), сульфат (10 мМ) і бікарбонат (11 мМ).

Таблиця 28. Катіонний склад рідин тіла тварин і людини

Іони	Внутрішньоклітинна рідина		Плазма		Інтерстиціальна рідина	
	мМ	мекв/л	мМ	мекв/л	мМ	мекв/л
Na^+	10	10	142	142	144	144
K^+	160	160	4	4	4	4
Ca^{2+}	1	2	2,5	5	1	2
Mg^{2+}	13	26	1,5	3	1	2
		198		154		152

Основним катіоном зовнішньоклітинної рідини є Na^+ (142 мМ у плазмі і 144 мМ в інтерстиціального простору), а концентрації наступних за кількістю присутніх в ній є K^+ (4 мМ) і Ca^{2+} (2,5 мМ у плазмі та 1 мМ в інтерстиціальній рідині). Основний аніон Cl^- (103 мМ у плазмі та 114 мМ в інтерстиціальній рідині). Ще є меншою частка HCO_3^- (27 мМ) і фосфатів. Стосовно вмісту води й іонів, то між плазмою і рештою зовнішньоклітинної рідини швидко утворюється рівновага, за якої звісно ж дотримується умова електронейтральності розчину, тобто рівна кількість позитивних і негативних зарядів. Загальна осмомольальна концентрація зовнішньо клітинної рідини біля 0,3 осмоль/л, а рН знаходиться в межах 7,35 – 7,45. Постійність складу внутрішнього середовища забезпечується регуляторним механізмом легенів та нирок. Нирки беруть участь у підтриманні рН середовища, здійснюючи наступні процеси: 1) обмін Na^+ на H^+ , 2) обмін HPO_4^{2-} на H_2PO_4^- , 3) H^+ до NH_3 з утворенням NH_4^+ . Нирки беруть участь у збереженні осмотичного тиску та іонного складу через диференційоване утворення сечі. Вони також виділяють відходи метаболізму (сечовину, креатинін тощо) та чужерідні речовини.

Таблиця 29. Аніонний склад рідин тіла тварин і людини

Іони	Внутрішньоклітинна рідина		Плазма		Інтерстиціальна рідина	
	мМ	мекв/л	мМ	мекв/л	мМ	мекв/л
Cl^-	3	3	103	103	114	114
HCO_3^-	11	11	279	27	30	30
HPO_4^{2-}	50	100	1	2	1	2
SO_4^{2-}	10	20	0,5	1	0,5	1
Органічні аніони			5	5	5	5
Білки	8	64	2	16	(0,1)	5
		198		154		152

Вода розподіляється в організмі між двома головними середовищами: внутрішньоклітинним (внутрішньоклітинна рідина) і зовнішньоклітинним (зовнішньоклітинна рідина – інтерстиціальна рідина, плазма, лімфа). Вода вільно вільно проникає шляхом дифузії між цими середовищами, але рух розчинених в ній речовин строго регулюється. Розподіл води між такими своєрідними відсіками залежить від загальної кількості розчинених речовин, оскільки вода рухається в напрямку осмотичного градієнту.

Постійний склад і відношення концентрації іонів в окремих середовищах є однією з головних умов для постійного перебігу біохімічних реакцій. Це є причиною існування добре відрегульованого складу середовищ, в кожному з яких підтримується постійне значення осмотичного тиску, рН і відношення концентрацій окремих іонів. Електронейтральність середовища забезпечується рівністю сумарної кількості аніонів та катіонів, що виражаються в мекв/л.

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Вода і мінеральні речовини

Лабораторна робота 1

Визначення рН розчинів різними методами

1. Колориметричний (або індикаторний) метод визначення рН

Принцип методу. Основою колориметричного методу є те, що індикатори, залежно від реакції середовища, проявляють забарвлення недисоційованих молекул або спостерігається поєднання кольорів недисоційованих молекул й аніонів. На основі того, що індикатори при різних значеннях рН мають різне забарвлення, будуються шкали еталонів.

Мета роботи. Освоїти методику визначення рН розчинів колориметричним (або індикаторним) методом. З'ясувати роль концентрації іонів Гідрогену (водневого показника) у процесах життєдіяльності.

Обладнання та реактиви. Зразки біологічних рідин, буферних розчинів. Пробірки. Штатив для пробірок. Хімічні стакани. Універсальні індикаторні папірці, рН-метр чи іонометр.

Хід роботи. Спершу визначають наближене значення рН досліджуваних розчинів за допомогою універсального індикаторного папірця: на смужку папірця наносять краплю розчину 1 і 2, визначаючи за допомогою кольорової шкали рН. Визначена величина дає підставу вибору індикатора.

Індикатор	межі рН (колір індикатора)	
Метиловий червоний	від 3,6 (червоний)	до 5,8 (жовтий)
Бромтимоловий синій	від 5,8 (жовтий)	до 7,6 (синій)

Далі у пробірку додають 6 крапель відповідного індикатора, відміряють 10 мл розчину, добре перемішують і по забарвленню

знаходять відповідне значення рН за допомогою відповідної шкали еталонів.

2. Електрометричний (потенціометричний) метод визначення рН

Принцип методу. Вимірювання електрорушійної сили між електродами (потенціал одного з яких є відомим, а інший служить для зрівноваження) є основою електрометричного методу визначення рН. З метою визначення рН за цим методом використовують прилади рН-метри (іонометри).

Мета роботи. Освоїти методику визначення рН розчинів електрометричним (або потенціометричним) методом. З'ясувати роль концентрації іонів Гідрогену (водневого показника) у процесах життєдіяльності.

Обладнання та реактиви. Зразки біологічних рідин, буферних розчинів. Пробірки. Штатив для пробірок. Хімічні стакани. Універсальні індикаторні папірці, рН-метр чи іонометр.

Хід роботи. Керуючись основними положеннями інструкції, визначають порядок роботи на рН-метрі для вимірювання рН розчину (50 – 70 мл), який вливають у склянку об'ємом 100 мл.

3. Ефективність вимірювання рН у біологічних зразках за допомогою різних методів

Принцип методу. Основою колориметричного методу є те, що індикатори, залежно від реакції середовища, проявляють забарвлення недисоційованих молекул або спостерігається поєднання кольорів недисоційованих молекул й аніонів. На основі того, що індикатори при різних значеннях рН мають різне забарвлення, будуються шкали еталонів. Вимірювання електрорушійної сили між електродами (потенціал одного з яких є відомим, а інший служить для зрівноваження) є основою електрометричного методу визначення рН. З метою визначення рН за цим методом використовують прилади рН-метри (іонометри).

Мета роботи. Освоїти методики визначення рН розчинів колориметричним (або індикаторним) та електрометричним (або потенціометричним) методами та порівняти їх. З'ясувати роль концентрації іонів Гідрогену (водневого показника) у процесах життєдіяльності.

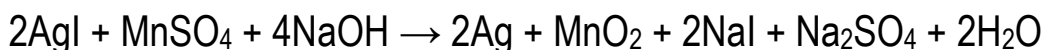
Обладнання та реактиви. Зразки біологічних рідин, буферних розчинів. Пробірки. Штатив для пробірок. Хімічні стакани. Універсальні індикаторні папірці, рН-метр чи іонометр.

Біологічні зразки	Індикаторний метод	Електрометричний метод

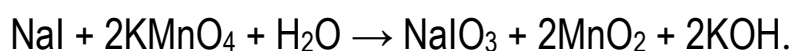
Лабораторна робота 2

Кількісне визначення вмісту йоду в організмах

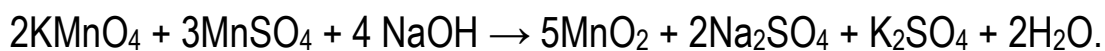
Принцип методу. Для визначення загального вмісту йоду в досліджуваному матеріалі тканину спалюють у мікрохвильовій або муфельній печі при 500°C. Сухий залишок розчиняють у розведеній нітратній кислоті. З цього розчину йодид-іони осаджують разом з хлорид-йонами, які завжди є в достатній кількості в біологічних об'єктах, аргентум нітратом. Розчинність AgCl значно вища, ніж розчинність AgI, тому весь йод, що був у досліджуваному об'єкті, осаджується повністю разом з AgCl. Після відділення і промивання осаду AgI і AgCl Аргентум відновлюють Mn²⁺ у лужному середовищі до металічного, який випадає в осад, а Йод у вигляді йодид-іонів переходить у розчин:



Після видалення осаду Ag і MnO₂ центрифугуванням, йодид-іони, що знаходяться в розчині, окиснюють калій перманганатом у нейтральному або лужному середовищі до йодат-іонів:



Надлишок калій перманганату за допомогою манган сульфату осаджується у вигляді MnO_2 і видаляється центрифугуванням:



Розчин, що містить йодат, випарюють на водяній бані досуха, залишок розчиняють у дистильованій воді і фільтрують для видалення залишків MnO_2 .

У фільтраті визначають йод фотометричним йодкрохмальним методом. Цим методом можна виявити від 0,5 до 5мкг йоду в пробі.

Мета роботи. Освоїти методику визначення мікрокількостей Йоду в їжі (кормах) та організмах гідробіонтів. З'ясувати роль цього елемента у процесах життєдіяльності.

Обладнання та реактиви. Сушильна шафа. Мікрохвильова або муфельна піч. Центрифуга на 3000-4000об/хв. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Колба. Центрифужний стакан ($V=100\text{см}^3$), або центрифужні пробірки. Плитка. Скляні палички. Чашка. Водяна баня. Фільтр. Сухий жом, зерно злаків і рибне борошно або морська водорість, наприклад, ламінарія чи тканини морських риб. Калій карбонат. Кальцій карбонат. Розведена нітратна кислота (1:5). Дистильована вода. Розчин $AgNO_3$ ($c=0,1\text{моль/дм}^3$). Хлоридна кислота (1:1). Алюмокалієвий галун ($\omega=0,5\%$). Манган сульфат ($\omega=10\%$). Натрій гідроксид ($c=0,2\text{моль/дм}^3$). Розчин калій йодиду ($\omega=20\%$). $KMnO_4$, ($c(1/3)=0,1\text{ моль/дм}^3$). Розчин $NaOH$, ($c=0,2\text{ моль/дм}^3$). Розчин фосфатної кислоти ($c=4\text{моль/дм}^3$). Розчин крохмалю ($\omega = 0,5\%$). Стандартний розчин KJO_3 , що містить 2,3мкг йоду в 1см^3 розчину.

Хід роботи. Для дослідження слід взяти жом, зерно злаків, морську водорість, наприклад, ламінарію (*Laminaria japonica*), відому як „морська капуста”, рибне борошно чи тканини морських риб. Висушений та розтертий досліджуваний матеріал масою 5г змішують з калій карбонатом і кальцій карбонатом у співвідношенні 1:1:1, вміщують у тигель, змочують водою, висушують у сушильній шафі.

Потім переносять у мікрохвильову чи муфельну піч і озольють при 500°C. Отриманий сухий залишок розчиняють у розведеній нітратній кислоті (1:5), додаючи її по 20см³ на кожний грам наважки. Розчин переносять у колбу, змиваючи дистильованою водою.

До розчину в колбі додають 3см³ розчину AgNO₃ (с=0,1 моль/дм³), одну краплину хлоридної кислоти (1:1), ставлять колбу на плитку, нагрівають розчин до кипіння і кип'ять 1хв. Охолоджують, переносять суспензію в центрифужний стакан (V=100см³). При відсутності такої центрифуги суспензію можна перенести у декілька центрифужних пробірок. Центрифугують при 3000-4000об/хв. протягом 5-7хв. Після центрифугування надосадову рідину зливають. Якщо осади були у декількох пробірках, їх об'єднують. Осад промивають 2 рази розчином алюмокалієвого галуну (ω=0,5%) і один раз водою по 5см³.

До промитого осаду додають 0,5см³ розчину манган сульфату (ω=10%), перемішують скляною паличкою, додають 4см³ розчину натрій гідроксиду (с=0,2 моль/дм³), знову перемішують, ставлять посудину з осадом у гарячу воду і нагрівають 2хв. Осад добре осідає, коли є хоч невеликий надлишок йонів Mn²⁺. Після охолодження осад відділяють центрифугуванням. Розчин, що містить йодид-іони, зливають у чисту центрифужну пробірку. Осад промивають невеликою кількістю гарячої води (близько 3см³), центрифугують і цей центрифугат додають до першого центрифугату. Осад, що містить аргентум, збирають, сушать і використовують для регенерації AgNO₃.

Для окиснення йодид-іонів у йодат-іони до розчину в пробірці додають 1см³ розчину KMnO₄ (с(1/3)=0,1 моль/дм³) і 1см³ розчину NaOH (с=0,2 моль/дм³), перемішують і ставлять пробірку в киплячу воду на 5хв. Розчин повинен мати рожево-фіолетове забарвлення, що свідчить про надлишок калій перманганату. Якщо такого забарвлення немає, то слід додати ще декілька крапель розчину калій пермангана-

ту. Після цього до гарячого розчину додають 1-2 краплі розчину манган сульфату ($w=10\%$), перемішують. Центрифугують, відділяють осад MnO_2 , а розчин зливають у фарфорову чашку. Осад промивають 3см^3 дистильованої води, центрифугують, центрифугат додають до розчину у чашці. Чашку ставлять на водяну баню і випаровують розчин досуха. До сухого залишку додають 1см^3 дистильованої води, перемішують і фільтрують через маленький паперовий фільтр у мірний циліндр на 10см^3 . Чашку і фільтр промивають три рази водою порціями по 1см^3 . Об'єм фільтрату в мірному циліндрі доводять водою до 4см^3 . До цього розчину додають $0,5\text{см}^3$ розчину фосфатної кислоти ($c=4\text{моль/дм}^3$), $0,2\text{см}^3$ розчин калій йодиду ($\omega=20\%$), $0,3\text{см}^3$ розчину крохмалю ($\omega=0,5\%$) і перемішують.

Отриманий розчин синього забарвлення спектрофотометрують (колориметрують) у кюветі з товщиною шару 10мм із світлофільтром з довжиною хвилі 580нм проти розчину, в якому досліджуваний розчин замінений 4см^3 води.

За значенням оптичної густини досліджуваних розчинів знаходять за калібрувальним графіком вміст йоду в мкг/см^3 цих розчинів. Вміст йоду в досліджуваному матеріалі розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot V \cdot 100}{m}; \text{ де}$$

X – вміст Йоду, мкг/100 г сухого досліджуваного матеріалу;

C – концентрація Γ у розчині, який колориметрують, мкг/см^3 ;

m – маса сухого матеріалу, взятого для аналізу, г ;

V – об'єм розчину, який взято для колориметрування, см^3 .

Побудова калібрувального графіка

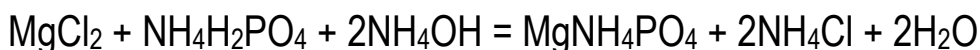
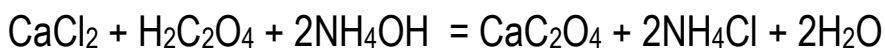
У пробірки вносять $0,2$; $0,4$; $0,6$; $0,8$; $1,2$; $1,6$; $2,0\text{см}^3$ стандартного розчину KIO_3 , що містить $2,5\text{мкг}$ йоду в 1см^3 розчину, доводять дистильованою водою до 4см^3 . Потім у кожен пробірку додають по $0,5\text{см}^3$ розчину фосфатної кислоти ($c=4,0\text{моль/дм}^3$), $0,2\text{ см}^3$ розчину

калій йодиду ($\omega=20\%$), і по $0,3\text{см}^3$ розчину крохмалю ($\omega=0,5\%$), перемішують і визначають оптичну густину розчинів у кюветі з товщиною шару 10мм із світлофільтром з довжиною хвилі 580нм . Розчином для порівняння є розчин, у якому замість розчину KIO_3 міститься 4см^3 дистильованої води і всі інші реактиви. Будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис концентрації Γ в мкг/см^3 , а на осі ординат – оптичну густину розчинів.

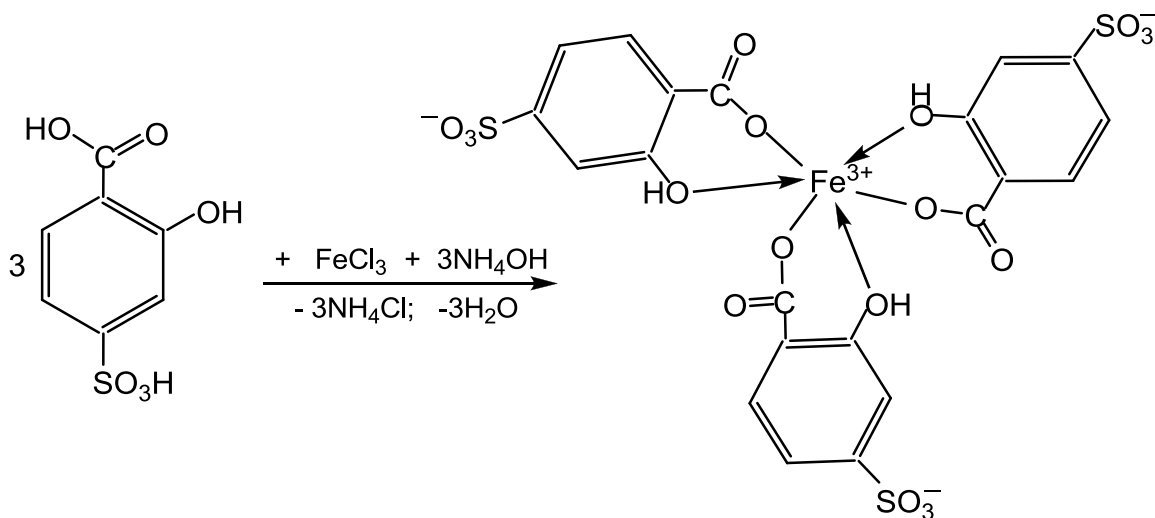
Лабораторна робота 3

Кількісне визначення вмісту Феруму, Магнію і Кальцію в тканинах

Принцип методу. Досліджуваний матеріал висушують, а потім спалюють у мікрохвильовій чи муфельній печі. Отриманий мінеральний залишок розчиняють у хлоридній кислоті. Далі Ca^{2+} осаджують у вигляді кальцій оксалату, а Mg^{2+} – і вигляді магнійамоній фосфату. Розчинність кальцій оксалату менша, ніж кальцій фосфату, а розчинність магнійамоній фосфату менша, ніж магній оксалату.

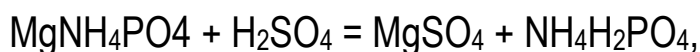


Ферум залишається у розчині у вигляді водорозчинної комплексної сполуки з сульфосаліциловою кислотою:



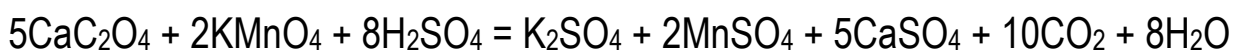
Осади кальцій оксалату і магнійамоній фосфату відділяють фільтруванням і відмивають від домішок. Фільтрат збирають у мірну колбу, доводять до певного об'єму і спектрофотометрують або колориметрують із світлофільтром з довжиною хвилі 440 нм.

Осад переносять у колбу для титрування, нагрівають для видалення надлишку амоніаку і визначають спершу Mg^{2+} , а потім Ca^{2+} об'ємним методом. Для визначення Mg^{2+} осад розчиняють, додаючи відомий об'єм титрованого розчину сульфатної кислоти:



Надлишок сульфатної кислоти відтитровують розчином натрій гідроксиду в присутності комбінованого індикатора, що являє собою суміш метилового червоного з метиленовою синькою. Розчин індикатора готують на дистильованій воді без спирту, оскільки останній буде заважати визначенню Ca^{2+} , взаємодіючи з калій перманганатом.

Після визначення Mg^{2+} у цьому ж розчині визначають Ca^{2+} перманганатометричним методом:



Температура розчину, який титрують, повинна бути 60-70°C.

Мета роботи. Освоїти методики визначення вмісту Ca, Mg, Fe в тканинах тварин. Поглибити знання про роль мінеральних елементів у життєдіяльності організмів.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Сушильна шафа. Мікрохвильова чи муфельна піч. Плитка. Фарфорова чашка. Фарфоровий тигель. Фільтр. Конічна колба на 50см³. Годинникове скло чи лійка, отвір якої закритий зволоженою ватою. Мікробюретка. Мірна колба на 100см³. Щільний фільтр. Скляна паличка. Штатив із пробірками. М'язи тварин. Розчин хлоридної кислоти (1:1). Фосфатно-щавлево-сульфосаліциловий реактив. Концентрований розчин амоніаку. Дистильована вода. Стандартний розчин $NH_4Fe(SO_4)_2$, що містить 0,2мг Fe^{3+} в 1см³ розчину. Розчин амоніаку

(1:10). Аргентум нітрат ($\omega=1\%$). Нітратна кислот. Сульфатна кислота ($c(1/2)=0,1$ моль/дм³). Змішаний індикатор. Натрій гідроксид ($c=0,1$ моль/дм³). Розчин калій перманганату ($c(1/5)=0,05$ моль/дм³).

1. Визначення Феруму

Хід роботи. В досліджуваній пробі повинно міститися від 2 до 15 мг Mg²⁺ і від 3 до 25 мг Ca²⁺.

М'язи тварин масою 20-25г ретельно подрібнюють і висушують у фарфоровій чашці в сушильній шафі при 100°C. Висушений матеріал подрібнюють ще раз, переносять у фарфоровий тигель, поміщають у мікрохвильову чи муфельну піч і спалюють пробу при 450-500°C. Після спалювання до залишку в тиглі додають 1 см³ дистильованої води, висушують і знову прожарюють 15-20хв. до повного згорання. У залишку не повинно бути чорних частинок вугілля. Якщо ж вони є, то знову додають воду, висушують і прожарюють. Коли відбулась повна мінералізація, тигель охолоджують, додають сюди 1 см³ дистильованої води і 2 см³ розчину хлоридної кислоти (1:1), перемішують, фільтрують у конічну колбу на 50 см³, промивають фільтр невеликою кількістю дистильованої води. У фільтраті визначають Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺. Для цього до нього додають 10 см³ фосфатно-щавлево-сульфосаліцилового реактиву, нагрівають до 70-80°C, знімають з плитки і повільно перемішуючи нейтралізують кислоту краплями концентрованим розчином амоніаку до появи помутніння. Потім вміст колби нагрівають протягом 5хв., додають краплями ще 1 см³ концентрованого розчину амоніаку і залишають до тих пір, поки температура знизиться приблизно до 40°C. Потім знову додають 5 см³ концентрованого розчину амоніаку, колбу закривають годинниковим склом чи лійкою, отвір якої закритий зволоженою ватою, і залишають годин на 10 для повного осадження Mg²⁺. Потім вміст колби фільтрують у мірну колбу на 100 см³ через щільний фільтр і промивають фільтр розчином амоніаку (1:10) до тих пір, доки колба не наповниться майже до

риски. Далі розчин у колбі доводять дистильованою водою до риски, перемішують. У розчині знаходиться комплексна сполука Феруму з сульфосаліциловою кислотою. Отриманий розчин спектрофотометрують (колориметрують) із світлофільтром з довжиною хвилі 440нм проти води. На основі отриманого значення оптичної густини за калібрувальним графіком визначають вміст Феруму в пробі і перераховують його вміст в м'язах в мг%. У мірні колби на 100см³ вносять послідовно 1,2,3,5,7,10см³ стандартного розчину залізоамонійного галуни NH₄Fe(SO₄)₂, що містить 0,2мг Fe³⁺ в 1см³ розчину. Потім у кожену колбу додають 10см³ фосфатно-щавлево-сульфосаліцилового реактиву, 6см³ концентрованого розчину амоніаку, доводять дистильованою водою до риски і вимірюють оптичну густину як і в досліді. Будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис вміст Fe³⁺ в пробі, а на осі ординат – оптичну густину розчину.

Чутливість методу – 1,5–15 мкг/см³ Fe³⁺.

2. Визначення Магнію

Хід роботи. Осади магнійамоній фосфату і кальцій оксалату, що знаходяться на фільтрі, промивають розчином амоніаку (1:10) до тих пір, доки у фільтраті не будуть виявлятися йони Cl⁻. Для перевірки на повноту промивання збирають у пробірку 5см³ фільтрату, підкислюють нітратною кислотою і додають 1 краплину аргентум нітрату (ω=1%). При цьому фільтрат не повинен помутніти. Після цього фільтр з осадом виймають із лійки, розривають на частини, поміщають у конічну колбу, в якій проводилось осадження, і сушать до повного видалення вологи і амоніаку. Потім у колбу вносять 20см³ дистильованої води, 20см³ титрованого розчину сульфатної кислоти (с(1/2)=0,1моль/дм³) і нагрівають до кипіння, перемішуючи і розминаючи крупинки осаду скляною паличкою. Після охолодження паличку виймають, ополіскують її водою, вносять у колбу дві краплини розчину змішаного індикатора і надлишок сульфатної кислоти титрують

розчином натрій гідроксиду ($c=0,1$ моль/дм³) до синього забарвлення розчину. Окремо титрують 20 см³ розчину сульфатної кислоти ($c(1/2)=0,1$ моль/дм³) розчином натрій гідроксиду ($c=0,1$ моль/дм³) і визначають об'єм розчину лугу, що було затрачено на титрування даного об'єму сульфатної кислоти. Із отриманих даних розраховують вміст Mg²⁺ в досліджуваному матеріалі за формулою:

$$X = \frac{M \cdot C \cdot (V_1 - V_2) \cdot 100}{m}, \text{ де}$$

X – вміст Mg²⁺ у досліджуваному об'єкті, мг %

C – молярна концентрація еквівалента розчину NaOH, моль/дм³;

V₁ – об'єм розчину NaOH ($c = 0,1$ моль/дм³), затрачений на титрування 20 см³ розчину H₂SO₄ ($c(1/2) = 0,1$ моль/дм³), см³;

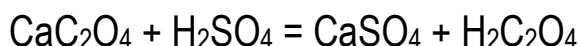
V₂ – об'єм розчину NaOH ($c=0,1$ моль/дм³), затрачений на титрування сульфатної кислоти, що залишилась в досліджуваному розчині після взаємодії з MgNH₄PO₄, см³;

m – маса досліджуваної тканини риби, г;

M – молярна маса еквівалента Mg²⁺ – 12,15 г/моль.

3. Визначення Кальцію

Після визначення Mg²⁺ в той же розчин, який титрували, вносять ще 5 см³ сульфатної кислоти (1:9) для повного розчинення CaC₂O₄:



Розчин нагрівають до 70-75°C і відтитровують щавлеву кислоту розчином калій перманганату ($c(1/5)=0,05$ моль/дм³) із мікробюретки до появи рожевого забарвлення, яке не зникає протягом 10 секунд.

Вміст Ca²⁺ у досліджуваному об'єкті розраховують за формулою:

$$X = \frac{M \cdot C \cdot V \cdot 100}{m} \text{ де}$$

X - вміст Ca²⁺ в досліджуваному матеріалі, мг%;

C – молярна концентрація еквівалента розчину KMnO₄, моль/дм³;

V – об'єм титрованого розчину KMnO₄, затрачений на титрування щавлевої кислоти, см³;

m – маса досліджуваної тканини риби, г;

M – молярна маса еквівалента Ca^{2+} – 20,04 г/моль.

Лабораторна робота 4

Кількісне визначення хлоридів у крові

Принцип методу. Хлорид-іони утворюють з аргентум-іонами малорозчинний аргентум хлорид. Розчинність AgCl у воді складає $1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³. Для визначення йонів Cl^- в біологічних об'єктах цим методом необхідно звільнити їх від білків, вуглеводів, які теж можуть зв'язувати йони Ag^+ . Безбілковий фільтрат крові титрують розчином аргентум нітрату ($c=0,01$ моль/дм³) за наявності у досліджуваному розчині калій хромату як індикатора. Розчинність Ag_2CrO_4 у воді складає $7 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³. При титруванні розчину, в якому містяться йони Cl^- і CrO_4^{2-} , спочатку буде утворюватись осад білого кольору AgCl . Після відтитрування йонів Cl^- навіть зайва крапля розчину AgNO_3 призведе до утворення осаду Ag_2CrO_4 цегляно – червоного кольору.

Мета роботи. Освоїти методику визначення хлоридів у крові. Поглибити знання про роль Хлору у життєдіяльності тварин.

Обладнання та реактиви. Водяна баня. Пробірки. Фільтр. Розчин цинк сульфату ($\omega=0,45\%$). Розчин натрій гідроксиду ($c=0,1$ моль/дм³). Розчин калій хромату ($\omega=5\%$). Розчин аргентум нітрату ($c=0,01$ моль/дм³). Кров. Дистильована вода.

Хід роботи. У дві пробірки (дослідну і контрольну) вносять по 5cm^3 розчину цинк сульфату ($\omega=0,45\%$) і по 1cm^3 розчину натрій гідроксиду ($c=0,1$ моль/дм³). Потім у першу пробірку вносять $0,1\text{cm}^3$ крові. Обидві пробірки ставлять у киплячу водяну баню на 3хв. При цьому в першій пробірці осаджуються білки, а в обох пробірках ще утворюється малорозчинний цинк гідроксид.

Вміст обох пробірок фільтрують, осади на фільтрах промивають два рази по 5cm^3 дистильованої води. До фільтратів додають по дві

краплини розчину калій хромату ($\omega=5\%$) і титрують розчином аргентум нітрату ($c=0,01$ моль/дм³) до появи ледь помітного цегляно-червоного кольору.

Розрахунки вмісту йонів Cl^- у крові розраховують за формулою:

$$C = \frac{(V_1 - V_2) \cdot T \cdot 1000}{V_3 \cdot mM}, \text{ де}$$

C – концентрація хлорид-іонів у крові, ммоль/дм³;

V_1 – об'єм розчину аргентум нітрату ($c=0,01$ моль/дм³), який затрачено на титрування дослідної проби, см³;

V_2 – об'єм розчину аргентум нітрату ($c=0,01$ моль/дм³), який затрачено на титрування контрольної проби, см³;

V_3 – об'єм крові, взятої для аналізу, см³;

T – титр розчину аргентум нітрату ($c=0,01$ моль/дм³) за хлорид-іоном, мг/см³ ($T=0,355$ мг/см³);

mM – мілімолярна маса хлорид-іона (35,5 мг/моль).

Лабораторна робота 5

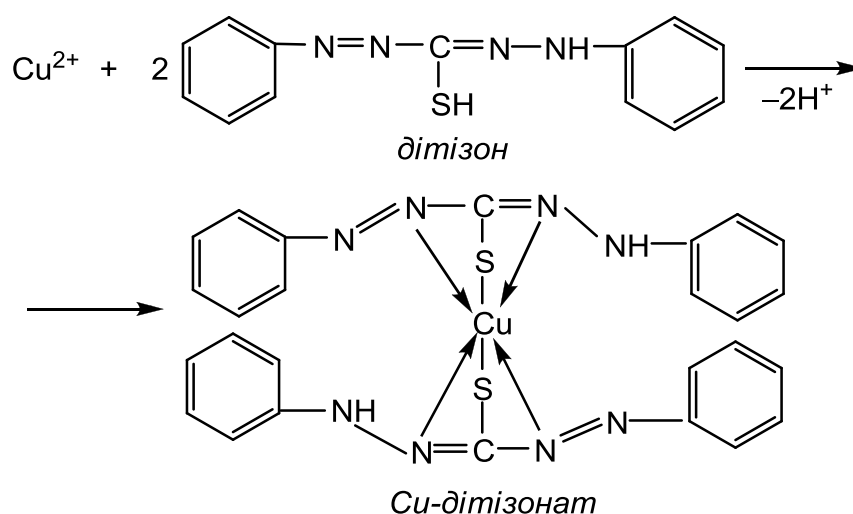
Кількісне визначення Купруму і Цинку

спектрофотометричним методом

Принцип методу. Органічну речовину спалюють у мікрохвильовій чи муфельній печі, мінеральний залишок розчиняють у хлоридній кислоті, ($c=0,05$ моль/дм³). Із отриманого розчину Cu^{2+} екстрагують розчином дітізону в чотирихлористому вуглеці. Екстракт випарюють на водяній бані, а дітізон і купрум дітізонат руйнують нітратною кислотою і гідроген пероксидом. Купрум визначають спектрофотометричним (колориметричним) діетилдітіокарбаматним методом.

У водній фазі після вилучення Cu^{2+} залишається Zn^{2+} , який після залуження розчину амоніаком екстрагується дітізоном. При обробці розчину дітізонату розчином хлоридної кислоти ($c=0,01$ моль/дм³) Zn^{2+}

переходить у водну фазу і визначається спектрофотометрично після повторного екстрагування його дітізоном при рН 4,75.



Для екстрагування можна використати розчини дітізону в хлороформі або чотирьохлористому вуглеці. Останній має переваги, бо менш леткий і менше розчинний у воді. Розчини дітізону в органічних розчинниках мають зелене забарвлення. При перемішуванні розчину дітізону в чотирьохлористому вуглеці або в хлороформі з водним розчином солі металу утворюється комплексна сполука металу з дітізоном – дітізонат, розчинний в органічному розчиннику.

Залежно від того, чи заміщується в дітізоні один, чи два атоми Гідрогену, розрізняють однозаміщені та двозаміщені дітізонати. Здебільшого отримують однозаміщені дітізонати, які у більшості випадків мають червоне або червоно-фіолетове забарвлення.

На утворення дітізонатів впливає концентрація гідроген-іонів у розчині. Цим користуються для розділення металів, які відрізняються за міцністю їх комплексів з дітізоном. Так, Cu^{2+} , який має константу нестійкості дітізонату – $1,1 \cdot 10^{-27}$, взаємодіє з дітізоном у сильно кислому середовищі і повністю екстрагується органічними розчинниками при рН 1,0. Дітізонат Zn^{2+} , константа нестійкості якого становить $81 \cdot 10^{-21}$, при рН 2,0 зовсім не утворюється, але його можна повністю вилучити з ацетатного буферного розчину при рН 4,75.

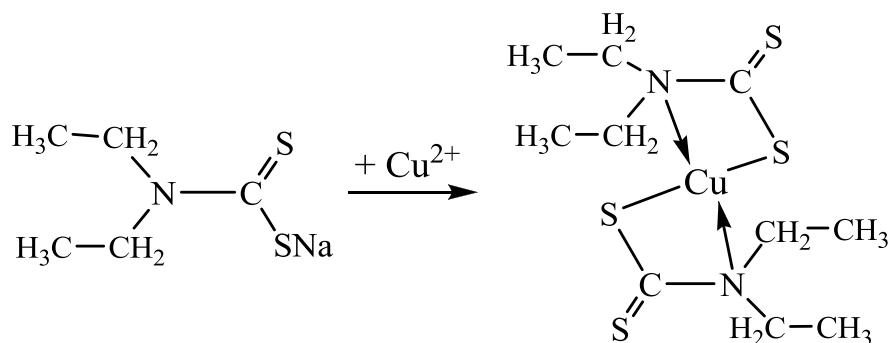
Дітізонати металів майже не розчинні у водних розчинах з певним значенням рН, а розчинність їх в органічних розчинниках більша в 104–107 разів, то величини коефіцієнтів екстракції дуже великі. За допомогою невеликого об'єму розчину дітізону в органічному розчиннику можна вилучити дуже малі кількості йонів металів з великого об'єму водного розчину і таким чином збільшити їх концентрацію в тисячу і більше разів. Швидкість утворення дітізонатів залежить від властивостей органічного розчинника і головним чином від рН водного розчину.

У присутності аніонів, які здатні зв'язувати йони металу в комплексну сполуку, реакція утворення дітізонатів уповільнюється і швидкість екстракції зменшується. Прикладом таких аніонів можуть бути аніони винної, лимонної, інших органічних кислот. Дітізонат, що утворився в органічному розчиннику, можна зруйнувати, перемішуючи його з розчином кислоти. При цьому звільняється дітізон, який залишається в органічному розчиннику, а йон металу переходить у водну фазу. Різні дітізонати можна вибірково розкладати, застосовуючи різні величини рН. Так, дітізонат Zn^{2+} легко розкладається хлоридною кислотою ($c=0,01$ моль/дм³), тоді як дітізонат Cu^{2+} при такій концентрації кислоти не розкладається.

Дітізонати можна розкладати також лугами. При цьому у водну фазу переходять не тільки йони металу, але і дітізон у вигляді дітізонату лужного металу жовтого забарвлення.

Розчини дітізону Zn^{2+} в чотирихлористому вуглеці помітно не розкладаються протягом декількох днів як у темряві, так і на розсіяному світлі. Розчини дітізону в чотирихлористому вуглеці і хлороформі під дією яскравого світла і високої температури розкладаються з утворенням продукту окиснення жовтого кольору. Пряме сонячне світло швидко знебарвлює розчин дітізону.

Йони Cu^{2+} у слабкокислому середовищі або у середовищі амоній гідроксиду реагують з натрій діетилдітіокарбоматом з утворенням комплексного купрум діетилдітіокарбомату, погано розчинного у воді:



Мідний комплекс добре розчиняється у аміловому спирті, амілацетаті, ксилуені, хлороформі, чотирехлористому вуглеці.

Для екстракції мідного комплексу краще застосовувати чотирихлористий вуглець чи хлороформ. Забарвлення екстрактів стійке у темряві. При дії світла на розчин у чотирехлористому вуглеці відбувається знебарвлення розчину, тому всі операції слід проводити при послабленому денному світлі. Максимум світлопоглинання розчину купрум діетилдітіокарбомату знаходиться при 435нм.

Мета роботи. Кількісно визначити вміст Купруму і Цинку в кормах (гичка буряку, тваринне борошно), водоростях. Поглибити знання про роль мінеральних елементів у життєдіяльності тварин, рослин і водоростей та їх значення у вирішенні екологічних проблем.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Термостат. Мікрохвильова або муфельна піч. Азбестовий ковпачок. Електроплитка. Фарфорова чашка. Ексикатор. Аналітичні терези. Водяна баня. Щільний паперовий фільтр. Ділильна лійка. Суха пробірка з корком. Хлорела (*Chlorella pyrenoidosa*) чи інші водорості. Дистильована вода. Хлоридна кислота ($c=1,0$ моль/дм³ та $c=0,01$ моль/дм³). Хлоридна кислота (1:1). Нітратна кислота (1:1).

Дітізон у чотирьохлористому вуглєці ($\omega=0,001\%$). Гідроген пероксид ($\omega=30\%$). Натрій цитрат ($\omega=0,1\%$). Чотирьохлористий вуглєць. Натрій цитрат ($\omega=10\%$). Індикатор крезоловий червоний ($\omega=0,1\%$). Натрій діетилдітіокарбамат ($\omega=0,1\%$). Концентрований розчин амоніаку. Ацетатний буферний розчин (рН 4,75). Натрій тіосульфат ($\omega=10\%$). Ацетатний буферний розчин (рН 4,75). Стандартний розчин солі Цинку.

Хід роботи. Для аналізу можна взяти сінне чи тваринне борошно, чи хлорелу (*Chlorella pyrenoidosa*) або інші водорості.

Повітряно-суху масу досліджуваного зразка висушують у термостаті у фарфоровій чашці протягом двох годин при температурі 100°C . Охолоджують в ексикаторі і зважують на аналітичних терезах 2г матеріалу. Фарфорову чашку із наважкою матеріалу ставлять на електроплитку і нагрівають до обвуглювання матеріалу. Потім чашку переносять у мікрохвильову чи муфельну піч, прикривають чашку азбестовим ковпачком для того, щоб не відбувалось вилітання речовин під час прожарювання, і прожарюють до повного згоряння органічних речовин.

Після охолодження в ексикаторі до залишку в чашці додають 2cm^3 дистильованої води, 2cm^3 нітратної кислоти (1:1), випарюють на водяній бані досуха і прожарюють на електроплитці до припинення виділення NO_2 (бурого кольору). Після охолодження залишку додають у чашку розчин хлоридної кислоти (1:1) об'ємом 1cm^3 , випарюють на водяній бані досуха, вносять розчин хлоридної кислоти ($c=1,0$ моль/ dm^3) об'ємом 2cm^3 , 5cm^3 дистильованої води, перемішують і нагрівають майже до кипіння. Гарячий розчин фільтрують крізь щільний паперовий фільтр, попередньо промитий хлоридною кислотою ($c=0,1$ моль/ dm^3). Чашку і фільтр промивають дистильованою водою об'ємом 25cm^3 . Фільтрат переносять у ділильну лійку, змиваючи залишок 10cm^3 води. Необхідно точно витримувати вказані об'єми води,

щоб у кінці розведення концентрація кислоти була близько $0,05 \text{ моль/дм}^3$.

Для визначення Cu^{2+} до отриманого солянокислого досліджуваного розчину в ділильній лійці додають розчин дітізону в чотирьохлористому вуглеці ($\omega=0,01\%$) об'ємом 2 см^3 і енергійно збовтують протягом 2хв. Дають фазам розділитися і зливають нижню органічну фазу в іншу ділильну лійку. Обробку дітізоном досліджуваного розчину в першій ділильній лійці продовжують до тих пір, доки його забарвлення не перестане змінюватися. Після цього додають 2 см^3 хімічно чистого чотирьохлористого вуглецю і екстрагують залишок дітізону, сполучаючи цього з першими екстрактами. Краплю розчину дітізону в чотирьохлористому вуглеці, що може плавати на поверхні водної фази, видаляють постукуванням по ділильній лійці або її легким струшуванням.

Об'єднані екстракти купрум дітізонату промивають розчином хлоридної кислоти ($c=0,01 \text{ моль/дм}^3$) об'ємом 10 см^3 , струшуючи приблизно 1хв. Фазу чотирьохлористого вуглецю зливають у фарфорову чашку, а водну фазу приєднують до основного розчину в ділильній лійці. Для руйнування дітізону і купрум дітізонату у фарфорову чашку вносять 2 см^3 розчину нітратної кислоти (1:1) і випарюють на водяній бані до видалення чотирьохлористого вуглецю. Всі роботи з чотирьохлористим вуглецем, хлороформом, нітратною кислотою треба виконувати у витяжній шафі, бо ці речовини дуже токсичні.

До залишку нітратної кислоти додають 5 крапель розчину гідроген пероксиду ($\omega=30\%$) і випарюють досуха. До залишку додають $0,5 \text{ см}^3$ нітратної кислоти (1:1), 5 крапель гідроген пероксиду і випарюють досуха повторно. До залишку додають 5 крапель розведеного (1:1) розчину хлоридної кислоти і випарюють на водяній бані досуха. У чашку вносять 2 см^3 розчину натрій цитрату ($\omega=10\%$), розчиняють сухий залишок і переносять розчин у ділильну лійку, а чашку проми-

вають 2 рази дистильованою водою по 5см^3 , виливаючи промивні води в ту ж лійку. До розчину додають розчин натрій діетилдітіокарбамату ($\omega=0,1\%$) об'ємом 1см^3 , перемішують, додають 5см^3 чотирихлористого вуглецю і збовтують протягом 2хв. Дають відстоятися шару органічного розчинника, щоб у ньому не було крапельок води, висушують кінець лійки кусочком фільтрувального паперу, зливають екстракт у суху пробірку і закривають пробкою. Визначають на фотоелектроколориметрі оптичну густину розчину із світлофільтром з $\lambda=440\text{нм}$ у кюветі з товщиною шару 10мм проти води. З отриманого значення оптичної густини за калібрувальним графіком знаходять вміст Cu^{2+} в пробі. Вміст Купруму в досліджуваному матеріалі визначають за формулою:

$$X = \frac{V \cdot C}{m}, \text{ де}$$

X - вміст Купруму, $\text{мкг}/1\text{г}$ досліджуваного матеріалу;

C – концентрація Cu^{2+} у розчині, взятому для колориметрування, $\text{мкг}/\text{см}^3$;

V – об'єм отриманого розчину купрум діетилдітіокарбамату в чотирихлористому вуглеці, який колориметрують;

m – маса абсолютно сухого досліджуваного матеріалу, г.

Для екстракції Zn^{2+} до розчину в ділильній лійці, що залишився після вилучення Cu^{2+} , додають 5см^3 розчину натрій цитрату ($\omega=10\%$), 2 краплі розчину індикатора крезолового червоного ($\omega=0,1$), краплинами концентрований розчин амоніаку до появи червоно-фіолетового забарвлення (рН 9,0). Потім додають розчин дітізону в чотирихлористому вуглеці ($\omega=0,02\%$) об'ємом 5см^3 , енергійно збовтують, дають фазам розділитися і виливають органічну фазу в іншу ділильну лійку. Далі ведуть екстрагування невеликими порціями (по 1см^3) розчину дітізону в чотирихлористому вуглеці доки останні не перестануть забарвлюватися у фіолетовий колір і набудуть зеленого відтінку. Після

цього додають ще 2см^3 чотирьохлористого вуглецю, збовтують 2хв., дають відстоятися і зливають органічну фазу, додаючи її до початкового екстракту. Об'єднані екстракти залишають на одну годину, потім промивають дистильованою водою об'ємом 10см^3 і переносять у чисту ділильну лійку. Сюди ж додають розчин хлоридної кислоти ($c=0,01\text{моль/дм}^3$) об'ємом 10см^3 і збовтують 2хв., щоб перевести Zn^{2+} у водну фазу. Після розділення фаз чотирьохлористий вуглець зливають в іншу ділильну лійку, де збовтують з 5см^3 свіжого розчину хлоридної кислоти ($c=0,01\text{моль/дм}^3$). Кислотні витяжки об'єднують, виливають у мірну колбу на 50см^3 , змиваючи залишки розчину дистильованою водою, доводять до риски і ретельно перемішують. У цьому розчині знаходиться весь Цинк.

З мірної колби на 50см^3 відбирають 5см^3 розчину, що містить Zn^{2+} , переносять у ділильну лійку, додають ацетатний буферний розчин (рН 4,75) об'ємом 5см^3 , розчин натрій тіосульфату ($\omega=10\%$) об'ємом 1см^3 , розчин дітізону в чотирьохлористому вуглеці ($\omega=0,001\%$) об'ємом 5см^3 і збовтують 2хв. Носик ділильної лійки витирають фільтрувальним папером для видалення крапель води і зливають прозорий нижній шар у суху пробірку, закривають корком. До розчину в ділильній лійці знову додають розчин дітізону ($\omega=0,001\%$) в чотирьохлористому вуглеці об'ємом 5см^3 , збовтують і відділяють органічну фазу, приєднуючи її до першого екстракту. В останньому випадку повинен бути деякий надлишок дітізону, що видно по зеленуватому забарвленню. Якщо надлишку дітізону немає (забарвлення червоно-фіолетове), то екстракцію дітізоном повторюють ще раз. Після повного екстрагування об'єднаний екстракт перемішують, вимірюють його об'єм, спектрофотометрують із світлофільтром 490-510нм у кюветі з товщиною шару 5мм. Нульовим розчином є 0,001%-ний розчин дітізону в чотирьохлористому вуглеці. Слід уникати освітлення розчину дітізону і екстракту прямим сонячним світлом.

Із отриманих даних оптичної густини за калібрувальним графіком знаходять вміст Zn^{2+} в пробі і розраховують вміст Цинку в досліджуваному матеріалі за формулою:

$$X = \frac{V \cdot V_2 \cdot C \cdot 100}{V_1 \cdot m}, \text{ де}$$

X – вміст Цинку в досліджуваному матеріалі, мкг/100 г;

V – загальний об'єм кислотного екстракту Zn^{2+} , cm^3 ;

V_1 – об'єм кислотного екстракту Zn^{2+} , взятого для вилучення з нього Zn^{2+} розчином дітізону в чотирихлористому вуглеці, cm^3 ;

V_2 – об'єм розчину цинк дітізонату в чотирихлористому вуглеці, взятий для колориметрування, cm^3 ;

C – концентрація Zn^{2+} , взятого для спектрофотометрії (колориметрування), знайдена за калібрувальним графіком, мкг/ cm^3 ;

m – маса абсолютно сухого досліджуваного матеріалу, г;

100 – перерахунок на 100г абсолютно сухого досліджуваного матеріалу

Побудова калібрувального графіка для визначення Купруму

У серію ділільних лійок вносять послідовно 1, 2, 4, 6, 8, 10 cm^3 робочого стандартного розчину солі Купруму, який містить 2мкг Cu^{2+} в 1 cm^3 , і доводять об'єм дистильованою водою до 20 cm^3 . До розчинів у кожну лійку вносять по 2 cm^3 розчину натрій цитрату ($\omega=10\%$), розчин натрій діетилдітіокарбамату ($\omega=0,1\%$) об'ємом 2 cm^3 і 5 cm^3 чотирихлористого вуглецю, збовтують 2хв. і дають відстоятися. Відділяють органічну фазу в сухі пробірки, які закривають корком. Вимірюють оптичну густину розчинів з світлофільтром із довжиною хвилі 440нм у кюветі з $l=10mm$ проти води. Із отриманих даних будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис вміст Cu^{2+} в

мкг/см³, а на осі ординат – оптичну густину розчину купрум діетилдітіокарбамату в чотирхлористому вуглеці.

Побудова калібрувального графіка для визначення Цинку

У ділильну лійку ємністю 100см³ вносять 15см³ ацетатного буферного розчину (рН4.75), додають 5см³ розчину дітізону ($\omega=0,001\%$) в чотирхлористому вуглеці. Збовтують 2хв. для видалення слідів металів, які реагують з дітізоном. Дають фазам розділитися і органічну фазу відкидають. Таким чином звільняють ацетатний буферний розчин від можливої наявності в ньому йонів металів. Потім послідовно вносять в ділильну лійку 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0см³ стандартного розчину солі Цинку, що містить 2мкг Zn^{2+} в 1см³. Спочатку в ділильну лійку з 15см³ очищеного ацетатного буферного розчину вносять 0,5см³ стандартного розчину солі Цинку, додають 10см³ розчину дітізону ($\omega=0,001\%$) в чотирхлористому вуглеці, збовтують 2хв. Залишають на деякі час для розділення фаз. Носик ділильної лійки витирають фільтрувальним папером, зливають прозорий екстракт цинк дітізонату в чотирхлористому вуглеці в суху пробірку і закривають пробірку корком. До буферного розчину, що залишився у ділильній лійці, вносять черговий розчин солі Цинку (1,0см³), додають 10см³ розчину дітізону ($\omega=0,001\%$) в чотирхлористому вуглеці, збовтують, дають відстоятися і зливають органічну фазу в наступну суху пробірку. Потім до буферного розчину, що залишився у ділильній лійці, вносять наступний розчин солі Цинку (1,5см³) і проводять операції, як і з попередніми. Так поступають з усіма стандартними розчинами солі Цинку, приготованими для побудови калібрувального графіка. Після цього вимірюють оптичну густину всієї серії забарвлених розчинів цинк дітізонату в чотирхлористому вуглеці при довжині хвилі 490–510нм у кюветі з товщиною шару 5мм. Розчином для порівняння є розчин дітізону($\omega=0,001\%$) в чотирхлористому вуглеці. З отриманих даних будують калібрувальний графік. На осі абсцис відкладають

концентрацію Zn^{2+} в мкг/см^3 , а на осі ординат – оптичну густину розчину.

При виконанні роботи слід мати на увазі, що всі реактиви набирати у піпетки слід тільки за допомогою гумових груш, небезпечно попадання реактивів в органи дихання, систему травлення, очі.

Примітка. При збовтуванні фаз у ділильній лійці і наступним розділенням фаз часто буває, що крапелька чотирихлористого вуглецю тримається вгорі на поверхні водної фази і не опускається донизу. Для видалення її з поверхні слід злегка постукати по лійці у верхній частині.

Лабораторна робота 6

Кількісне визначення Купруму в тканинах тварин

за допомогою йон-селективних електродів

Принцип методу. Потенціометричний метод заснований на вимірюванні електрохімічного потенціалу зануреного в досліджуваний розчин зворотного електрода. В йонометрії безпосередньо за величиною потенціалу визначають концентрацію йонів у розчині. Вимірювання потенціометричним методом проводяться при використанні електродів, які допомагають встановити процес перенесення або розділення зарядів, що виникають на межі розділу фаз. При зануренні такого електрода у розчин електроліту, який містить однойменний з металом йон, виникає різниця потенціалів між електродом і розчином, яка залежить від активності йона металу. Якщо електрод вкрити тонким шаром важкорозчинної сполуки (наприклад $Ag/AgCl$), яка занурена у розчин з однойменним аніоном, то різниця потенціалів буде залежати від активності відповідного аніону в розчині. Якщо шар важкорозчинної сполуки містить другий катіон, який утворює з аніоном також важкорозчинну сполуку, але з більшою розчинністю, ніж розчинність сполуки металу електрода (наприклад $Ag/Ag_2S/CuS$),

то різниця потенціалів буде залежати від активності другого катіона в розчині. Такі електроди дозволяють селективно визначати будь-який йон в присутності інших йонів; їх називають іон-селективними електродними.

Цей вид електродів виготовляється на основі напівпроникності мембран, які характеризуються підвищеною вибірковістю до певного типу йонів. Мембрана може бути гомогенною (монокристал, скло) і гетерогенною. В останньому випадку кристалічна речовина міститься в плівці полімеру.

Мембрани на основі сульфідів двозарядних металів для електродів отримують із суміші аргентум сульфідного відповідного металу.

Мета роботи: Визначити вміст Купруму в біологічних об'єктах. З'ясувати роль Купруму у процесах метаболізму.

Обладнання та реактиви. Колба К'ельдаля. Мірна пробірка. Невеликий стакан. Йон-селективний до Cu^{2+} електрод. Електрод порівняння. Тканини риб, ракоподібних, моллюсків, водорості. Сульфатна кислота ($d=1,84\text{г/см}^3$). Пергідроль. Розчин NaOH ($\omega=30\%$). Фенолфталеїн.

Хід роботи. Для вивільнення зв'язаного Купруму біологічний матеріал мінералізують. У колбу К'ельдаля вносять 2см^3 сироватки крові (чи відповідний об'єм гомогенату іншої тканини), додають 10-12 крапель сульфатної кислоти ($d=1,84\text{г/см}^3$), колбу нагрівають у витяжній шафі до появи у колбі білого диму. Маса набуває чорного кольору. Колбу охолоджують, додають 15-20 крапель пергідроллю і знову сильно нагрівають до повного знебарвлення вмісту колби. При необхідності вносять у охолоджену колбу додатково пергідроль, якщо при першому внесенні не відбулось знебарвлення. Після повної мінералізації кислоту нейтралізують розчином NaOH ($\omega=30\%$) за фенолфталеїном. Вміст колби переносять у мірну пробірку, доводять об'єм водою до 5см^3 . Розчин переносять у невеликий стакан, занурюють у

розчин йон-селективний до Cu^{2+} електрод і електрод порівняння. Електроди приєднують до рН-метра-мілівольтметра і вимірюють величину електродної функції. За калібрувальним графіком знаходять концентрацію Cu^{2+} в мкмоль/дм³. Роблять перерахунки на вміст Купруму в мкмоль/дм³ сироватки крові, або в мкмоль/100г досліджуваної тканини.

Лабораторна робота 7

Кількісне визначення Фосфору в сироватці крові

Принцип методу. Метод заснований на повній мінералізації тканини та переходу фосфору і пірофосфатну кислоту. Визначають ортофосфат за методом Фіске-Суббароу

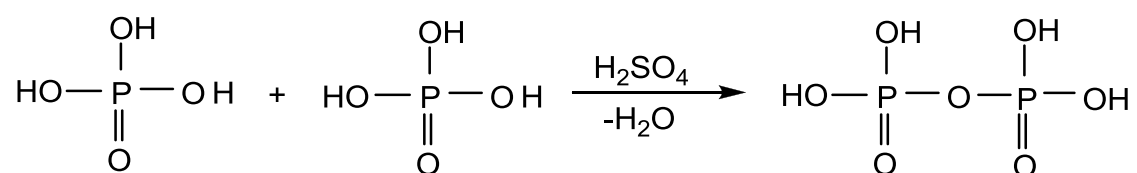
Мета роботи. Кількісно визначити вміст Фосфору в тканинах. Поглибити знання про участь Фосфору в процесах життєдіяльності.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Колба К'ельдаля. Піщана баня, або газовий пальник. Конічна колба. Мірна колба на 50см³. Сироватка крові. Концентрована сульфатна кислота ($d=1,84$). Пергідроль ($\omega=33\%$). Натрій гідроксид ($\omega=10\%$). Фенолфталеїн. Сульфатна кислота ($\omega=5-10\%$). Розчин амоній молібдату ($\omega=2,5\%$). Сульфатна кислота ($c(1/2)=5,0$ моль/дм³). Кристалічна аскорбінова кислота.

Хід роботи. Сироватку крові об'ємом 0,1см³ (або певні об'єми екстрактів чи маси тканин) вносять у колбу К'ельдаля для спалювання, додають 10–12 крапель концентрованої сульфатної кислоти ($d=1,84$) і колбу сильно нагрівають на піщаній бані або полум'ї газового пальника у витяжній шафі. Маса у колбі чорніє, тканина обвуглюється. Слід досягти максимального обвуглювання, тому що за подальшої обробки тканина мінералізуватися вже не буде у присутності води. Колбу трохи охолоджують, додають близько 20 крапель пергідролю ($\omega=33\%$), знову сильно нагрівають. Пергідроль розкладається,

кисень, який виділяється, доокиснює органічні речовини, зокрема до CO_2 , вміст у колбі світлішає. Якщо весь пергідроль використано, а вміст колби не знебарвився, колбу знову трохи охолоджують, додають дещо меншу, ніж першого разу, до повного знебарвлення вмісту кількість пергідролу і також сильно нагрівають. Так повторюють інколи декілька разів до повного знебарвлення вмісту колби. Коли вміст вже знебарвився, але продовжують виділятися бульбашки кисню, треба ще нагрівати до повного розкладу пергідролу. Якщо це не зробити, пергідроль, що залишився у колбі, заважатиме відновленню фосфорномолібденової кислоти.

Після повної мінералізації тканини Фосфор буде знаходитись у формі пірофосфатної кислоти, оскільки мінералізація відбувалась за участі концентрованої сульфатної кислоти:



Щоб гідролізувати пірофосфат в ортофосфат, до вмісту колби додають близько 5см^3 води і кип'ятять.

Далі в розчині визначають ортофосфат за методом Фіске-Суббароу. Сильнокисле середовище в колбі переводять у слабкокисле.

Для цього в колбу вносять розчин натрій гідроксиду ($\omega=10\%$) та індикатор фенолфталеїн. Луг додають до блідо-рожевого забарвлення рідини. Потім переводять у слабкокисле середовище, додаючи кілька крапель розведеної сульфатної кислоти ($\omega=5-10\%$). Вміст з колби К'єльдаля переносять у мірну колбу на 50см^3 , додають $5-7\text{см}^3$ розчину амоній молібдату ($\omega=2,5\%$) у сульфатній кислоті ($c(1/2)=5,0\text{моль/дм}^3$). Розчин забарвлюється у слабкий жовто-зелений колір унаслідок утворення фосфорномолібденової кислоти. Таке забарвлення не контрастне і малоприслатне для спектрофотометрії. Для одержання контрастного синього забарвлення фосфорномолібденову кислоту відновлюють,

вносячи в колбу 20-30мг кристалічної аскорбінової кислоти, перемішують перевертанням колби, доводять водою до риски. Переносять вміст мірної колби у конічну колбу і нагрівають до 40-50 °С протягом близько 10хв. Розвивається сине забарвлення рідини. Забарвлений синій розчин спектрофотометрують проти контролю на реактиви і з світлофільтром, що має довжину хвилі пропускання 590нм. Контроль на реактиви містить усі компоненти, крім фосфату.

Для кількісного визначення Фосфору будують калібрувальний графік. Готують вихідний розчин фосфату (KH_2PO_4 чи Na_2HPO_4), який містить в 1см^3 0,1мг Фосфору. У ряд пронумерованих мірних колб на 50см^3 вносять послідовно 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 см^3 вихідного розчину фосфату, додають по 5-7 см^3 молібденового реактиву і кристалічну аскорбінову кислоту, як і в дослідній пробі, перемішують, доводять дистильованою водою до риски, переносять з мірних колб у іншу посудину, нагрівають при 40-50 °С протягом 10хв., потім спектрофотометрують. На осі абсцис відкладають вміст Фосфору (в мг) в 1см^3 стандартних розчинів фосфатів, на осі ординат-оптичну густину відповідних розчинів. Вміст Фосфору в стандартних розчин становить: 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08 мг/ см^3 відповідно.

За калібрувальним графіком знаходять вміст Фосфору (в мг) в 1см^3 досліджуваного розчину, отриманого після мінералізації сироватки крові. Далі розраховують вміст Фосфору в досліджуваному біологічному матеріалі за формулою:

$$X = \frac{C \cdot 100}{V}, \text{ де}$$

X – вміст Фосфору в досліджуваній сироватці крові, мг%;

C – вміст Фосфору в досліджуваній пробі, знайдений за калібрувальним графіком, мг/ см^3 ;

V – об'єм сироватки крові, взятий для дослідження, см^3 .

ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ВОДА І МІНЕРАЛЬНІ РЕЧОВИНИ”

1. Вміст Купруму в гемоціаніні різних видів тварин наступний: рак – 0,32 %; омар – 0,34 %; восьминіг – 0,38 %; равлик – 0,29 %; мечохвіст – 0,173 %. Визначіть і порівняйте мінімальні відносні молекулярні маси гемоціанінів різного походження.
2. Іон якого металу:
 - а) необхідний для перетворення D-молочної кислоти у піровиноградну за участі лактатдегідрогенази;
 - б) сприяє активації вищих жирних кислот при взаємодії їх з АТФ і КоА за наявності ацил-КоА-синтетази;
 - в) активує фосфоліпазу *c*, яка каталізує реакцію гідролізу фосфатидилхоліну і диацилгліцеролу;
 - г) є незамінним у реакції ферментативного окиснення фенілаланіну в тирозин?
3. Обґрунтуйте твердження:
 - а) приєднання флавінового коферменту до апоферменту здійснюється за участі йонів Феруму, Молібдену, Купруму, Цинку;
 - б) Cu^{2+} є інгібітором енолази і піруваткінази.
4. Із наведених тверджень виберіть правильні:
 - а) ступінь насичення водою мітохондрій не впливає на інтенсивність окиснювального фосфорилування, що відбувається у них;
 - б) будучи складовою частиною субклітинних структур, вода у значній мірі здатна регулювати їх функціональну активність;
 - в) вода є безпосереднім учасником численних хімічних реакцій у клітині.

4. Як змінюється активність ферменту рибонуклеази за участі йонів Ca^{2+} і Zn^{2+} ?
5. Де більше міститься йоду – у зольному залишку тваринних тканин, чи у зольному залишку морських водоростей за умови, що маса золи в обох випадках однакова?
6. Обґрунтуйте твердження:
 - а) роль Mg^{2+} при дії кіназ зводиться до того, що він взаємодіє з АТФ, утворюючи комплекс, який і є істинним субстратом реакції і зв'язується з ферментом;
 - б) йони K^+ ефективно впливають на реакції гліколізу;
 - в) розпад як простих, так і складних ліпідів активується йонами Mg^{2+} ;
 - г) майже усі ферменти циклу Кребса активуються йонами Mg^{2+} .
7. Із наведених тверджень виберіть правильні:
 - а) у реакціях розпаду і синтезу нуклеїнових кислот Mg^{2+} активує ДНК- і РНК-полімерази, нуклеотидазу, полінуклеотидфосфорилазу, рибонуклеазу, дезоксирибонуклеазу;
 - б) у біосинтезі метіоніну беруть участь Co^{2+} , у біосинтезі серину і цитруліну – Mg^{2+} і Mn^{2+} ;
 - в) йони металів у багатьох випадках сприяють становленню ферментів-мультимерів

11. БІОЛОГІЧНЕ ОКИСНЕННЯ. ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ОБМІН

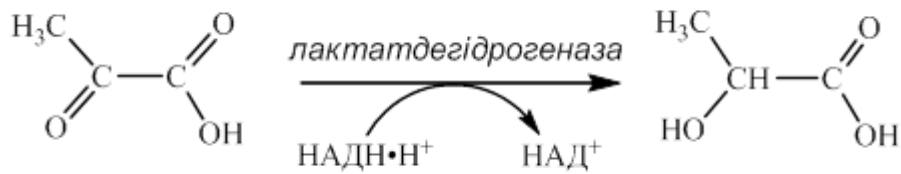
11.1. Участь молочної кислоти у процесах біологічного окиснення

Молочна кислота в організмі є кінцевим продуктом гліколізу та глікогенолізу – анаеробних процесів окиснення глюкози і глікогену.

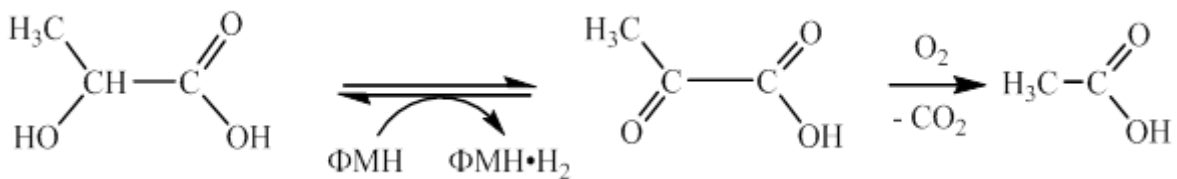
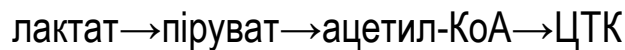
Коли м'язові клітини вищих організмів у моменти надзвичайно сильного м'язового навантаження функціонують в анаеробних умовах, з м'язів у кров надходить велика кількість лактату. Втомлюваність м'язів і їх біль обумовлюється частково розвитком ацидозу у м'язах, тобто зміщенням рН в кислу зону за рахунок накопичення молочної кислоти.

Значна частина лактату, що утворюється в м'язах, переноситься з кров'ю у печінку і до серцевого м'яза, де окиснюється. Через деякий час максимальної роботи м'язів у ссавців спостерігається підвищення частоти дихання і, як наслідок, підсилене у порівнянні із станом спокою споживання кисню. Надлишок кисню, що споживається у відновний період, називається кисневою заборгованістю і використовуються на окиснення в тканинах печінки і серця певної частини надлишку молочної кислоти, що утворився в період максимальної м'язової активності. Інша частина надлишку молочної кислоти, що накопичилась у крові під час фізичного навантаження, перетворюється в печінці в глікоген. За рахунок тієї частини молочної кислоти, яка окиснюється через цикл трикарбонних кислот в печінці, утворюється необхідний надлишок АТФ.

У процесі гліколізу лактат утворюється в результаті відновлення пірувату НАДН·Н⁺ за участі ферменту лактатдегідрогенази:



Положення рівноваги лактатдегідрогеназної реакції сильно зміщено у бік утворення молочної кислоти, а не продуктів її окиснення. У зв'язку з цим гліколіз відбувається з накопиченням двох молів лактату з одного молю глюкози. Лактат по суті є глухим кутом у метаболізмі; утворившись, він не може перетворюватись інакше, як шляхом зміни напрямку лактатдегідрогеназної реакції і утворення знову пірвіноградної кислоти в аеробних умовах:



За участі ферменту лактатмонооксигенази, який виявлено тільки в *Mycobacterium*, лактат відновлює ФМН ферменту, окиснюючись до пірвату. У присутності O_2 піруват далі окиснюється до ацетату і CO_2 .

На відміну від фосфорильованих проміжних продуктів гліколізу, лактат і піруват легко виходять з клітин, де вони синтезуються. Лактат дифундує з м'язових клітин, де активно йде гліколіз, і переноситься в печінку з током крові. Активність лактатдегідрогенази в м'язах і печінці перевищує активність всіх інших ферментів гліколізу. У процесі глюконеогенезу з молочної кислоти утворюється глюкоза. Перетворення лактату в глюкозу відбувається тільки в аеробному процесі.

Добре відомо, що коли факультативно анаеробні клітини використовують глюкозу в анаеробних умовах з утворенням лактату, то швидкість окиснення глюкози набагато вища її окиснення в цих же

клітинах в аеробних умовах. При анаеробному гліколізі окиснення одної молекули глюкози спряжено з синтезом двох молекул АТФ, в той час як при повному аеробному окисненні одної молекули глюкози синтезується 36 молекул АТФ. Таким чином, для того щоб синтез АТФ в анаеробній клітині відбувався з такою ж швидкістю, як і в аеробній, необхідно, щоб анаеробна клітина використовувала в 18 разів більше глюкози у розрахунку на одиницю маси і за одиницю часу. Власне тому факультативно анаеробна клітина, яка функціонує в анаеробних умовах, використовує дуже великі кількості глюкози. Якщо ж ввести у суспензію таких анаеробних клітин, що живуть на глюкозі, кисень, то клітини зразу почнуть його поглинати і рівень використання глюкози різко знизиться. Накопичення лактату знижується у присутності кисню до нульового рівня, оскільки в процесі дихання лактат не утворюється і глюкоза повністю окиснюється через цикл Кребса і дихальний ланцюг ферментів до CO_2 і H_2O .

Явище зниження використання глюкози і припинення накопичення лактату у зв'язку з початком дихання має назву ефекту Пастера. При аеробному диханні не відбувається накопичення лактату тому, що необхідний для відновлення пірувату в лактат $\text{НАДН}\cdot\text{H}^+$, який утворюється в результаті окиснення тріоз, знову окиснюється, але не піруватом, а через ланцюг дихальних ферментів, які мають більшу спорідненість до $\text{НАДН}\cdot\text{H}^+$, ніж лактатдегідрогеназа.

Саме тому в процесі дихання піруват здебільшого не відновлюється до лактату, а окиснюється безпосередньо до ацетил-КоА і CO_2 . Відповідальним за припинення утворення лактату в аеробних умовах є гліцерофосфатний човниковий механізм.

У більшості клітин організму тварин при достатньому забезпеченні киснем молочна кислота майже не утворюється. Виключенням є еритроцити, які не містять мітохондрій і ферментів дихального

ланцюга і тому не можуть окиснювати глюкозу до CO_2 і H_2O , а також сітківка ока, ембріональні і злоякісні клітини .

Було виявлено, що у тріски *Salmo gairdnerii* після тривалого плавання вміст молочної кислоти зростає у хвостовій частині м'язів. Проте цей факт не пов'язується як показник підвищеної м'язової активності хвостових м'язів. У *Auxis tapeinosoma*, яка загинула після тривалого опору під час вилову, високий вміст молочної кислоти було відмічено не у хвостовій, а в середній частині філе. Цілком імовірно, що хвостова мускулатура у деяких риб більше зв'язана з тривалим повільним плаванням, ніж з різкими кидками, що потребують великих затрат енергії.

У деяких видів риб вміст молочної кислоти в червоних м'язах нижчий, ніж у білих, хоча в інших, наприклад *Gadus morhua*, молочна кислота в червоних і білих м'язах міститься в однакових кількостях.

Високий вміст молочної кислоти в білих м'язах риб свідчить про інтенсивну роботу цих м'язів в умовах дефіциту кисню. Червоні м'язи розглядають як такі, що близькі за своїми функціями до внутрішніх органів. З іншої точки зору, червоні м'язи порівнюють із м'язом серця, який здатний працювати протягом тривалого періоду, тому в пелагічних риб, вимушених плавати без перерви, червоні м'язи добре розвинені. Численні дослідження показали, що червоні м'язи характеризуються аеробним метаболізмом із використанням ліпідів як основного палива, тоді як білі м'язи мають анаеробний тип обміну і використовують як енергетичний матеріал глікоген, який у процесі гліколізу окиснюється до молочної кислоти. Під час інтенсивного плавання в м'язах відбувається різке зниження глікогену і збільшується вміст молочної кислоти, в той час як у печінці – основному депо глікогену – його запаси при цьому практично не змінюються, а в деяких випадках навіть збільшуються. Помітне зменшення вмісту глікогену в печінці спостерігається лише в тому випадку, коли тривалість

безперервного плавання складає понад 24 години. Було встановлено, наприклад, що молочна кислота продовжує накопичуватись у крові *Gadus aeglefinus* після вилову її тралом і при наступному утримуванні її в акваріумі і лише потім кількість лактату в крові повертається до початкового рівня. Молочна кислота не є продуктом метаболізму вуглеводів самої крові, а всмоктується в кров з інших тканин.

Якщо рибу вийняти з води, затримка у збільшенні вмісту молочної кислоти в крові є ще більш помітною. В дослідях із *Gadus morhua* було виявлено, що коли рибу після вилову залишати на декілька хвилин на повітрі, частота серцевих скорочень різко знижується, вміст молочної кислоти в м'язі значно збільшується, але через різке зменшення циркуляції крові молочна кислота в кров майже не переходить. Це явище є своєрідним захистом проти асфіксії, під час якої м'язи використовують резерв анаеробної енергії; високий же рівень молочної кислоти в крові може вбити рибу.

Дуже сильний стрес, наприклад коли риба попадає в трал, може бути причиною її смерті через накопичення в тканинах молочної кислоти. Молочна кислота сама по собі не отруйна. Причиною загибелі є зниження рН крові до 6,8-6,9 за рахунок молочної кислоти. Так, смертність кіжуча *Oncorhynchus kisutch* після вилову тралом складала 34-52%, а період максимальної смертності співпадав з періодом максимального вмісту молочної кислоти в крові.

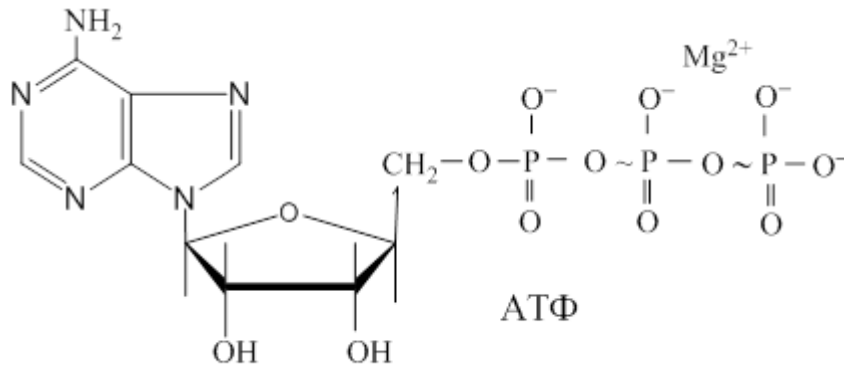
Після того, як рибу знову поміщають у воду, нормальний кровообіг відновлюється, молочна кислота проникає в кров і завдяки нормальному диханню швидко розкладається до вуглекислого газу, який виводиться через зябра. Також було встановлено, що активна риба, поміщена у воду з низьким вмістом кисню, має порушений вуглеводний обмін, в її тканинах накопичується молочна кислота.

11.2. Будова та роль АТФ у процесах метаболізму

Уперше аденозинтрифосфат (АТФ) виділили з кислих екстрактів м'язів в 1929р. Фіске і Суббароу. Пізніше було вивчено його структуру, а потім, в 1948р., структура була підтверджена хімічним синтезом, який здійснили Тодд із співробітниками. В 1939-1941 роках Ліпман довів, що АТФ служить головним переносником хімічної енергії в клітині. АТФ присутній в клітинах в досить значних кількостях не тільки в розчинній фракції цитоплазми, але і в деяких органелах, зокрема в мітохондріях і ядрах.

При рН 7,0 АТФ являє собою аніон з високим зарядом. Трифосфатна група молекули АТФ містить чотири йонізовані ОН-групи. Три з них мають низькі значення pK' (між 2 і 3) і при рН 7,0 повністю дисоціюють; pK' четвертої ОН-групи дорівнює 6,5; тому при рН 7,0 ця група дисоціює приблизно на 75%. Висока концентрація від'ємних зарядів на трифосфатній групі АТФ є важливим фактором, що обумовлює високо енергетичну природу аденозинтрифосфату. В інтактній клітині лише дуже невелика кількість АТФ міститься у вигляді вільних аніонів; в основному має місце комплекс $MgATP^{2-}$ або $MnATP^{2-}$. Утворення таких комплексів обумовлено сильно вираженою здатністю пірофосфатних груп зв'язуватися з двозарядними катіонами, а також високою концентрацією йонів Mg^{2+} у внутрішньоклітинній рідині. У більшості ферментативних реакцій, в яких АТФ виступає у ролі донора фосфату, бере участь активна форма АТФ, а саме комплекс $MgATP^{2-}$.

АТФ виявляє максимум поглинання в ультрафіолетовій області спектра при 260нм, що обумовлено аденіновою частиною молекули. При кип'ятінні в розчині хлоридної кислоти ($c=1,0$ моль/дм³) протягом 7 хвилин дві кінцеві фосфатні групи АТФ відщеплюються; естерний зв'язок між фосфатом, що залишився, і рибозою при такій обробці не руйнується.



АТФ є основним носієм хімічної енергії в клітині. Він слугує для перенесення високоенергетичних фосфатних груп і є зв'язуючою ланкою між процесами, які супроводжуються виділенням енергії і процесами, які протікають з використанням енергії. АДФ і АМФ, що утворюються в результаті дефосфорилування АТФ, знову фосфорилуються до АТФ в процесі дихання. Пара АТФ–АДФ є головною системою перенесення фосфату. Але для перенесення чи розподілення енергії фосфатного зв'язку використовуються також і інші нуклеозидтрифосфати. АТФ і інші нуклеозидтрифосфати є високоенергетичними попередниками мононуклеотидних одиниць при ферментативному синтезі ДНК і РНК.

Зміна стандартної вільної енергії гідролізу АТФ при рН 7,0 і 37°C за наявності надлишку йонів Mg^{2+} становить – 32,9кДж/моль.

Аденозинтрифосфат є термодинамічно нестійкою молекулою і гідролізується з утворенням АДФ чи АМФ. Саме це визначає АТФ як переносника хімічної енергії, яка необхідна для забезпечення більшої частини енергетичних потреб клітин, в тому числі і енергією, що необхідна для м'язової роботи.

За участі АТФ у м'язах у стані спокою утворюється креатинфосфат, який слугує резервом високоенергетичного фосфату для синтезу АТФ із АДФ при активній м'язовій роботі. У стані спокою вміст креатинфосфату в 4-5 разів більший, ніж АТФ. При переході від спокою до

роботи м'язи спершу використовують АТФ, який утворюється в реакції: Фосфокреатин + АДФ ↔ АТФ + креатин.

Фосфоангідридний (пірофосфатний) зв'язок у молекулі АТФ утворюється шляхом сполучення АДФ і активного неорганічного фосфату, що відбувається в ході ряду специфічних реакцій фосфорилювання. Найбільш важливими з них є реакції, що протікають у фотосинтезуючих мембранах хлоропластів, а також реакції окиснювального фосфорилювання в мембранах бактерій і мітохондрій, що супроводжуються використанням кисню. Перетворення АМФ в АДФ здійснюється шляхом перенесення кінцевої фосфорильної групи з АТФ на АМФ в ході реакції, яка каталізується надзвичайно активним ферментом аденілаткіназою, що міститься у всіх клітинах.

11.3. Білки м'язів та енергетика м'язового скорочення

Головним білком поперечносмугастих м'язів є міозин. Він складає основу товстих ниток саркомера. Інший білок – актин – є головною складовою частиною тонких ниток.

Молекули міозину мають форму дуже довгих ниток розміром ~ 160x2нм. Вміст міозину в поперечносмугастих м'язах становить 25-40%.

Комплекс актину і міозину відповідальний за скорочення м'язу. Вже приблизно в 1929 році було встановлено, що джерелом енергії при м'язовому скороченні є АТФ, але тільки через 10 років В.О. Енгельгард і М.М. Любимова показали, що виділені з м'язу препарати міозину каталізують гідроліз АТФ, доказавши цим, що ензиматичні механізми, які забезпечують використання вільної енергії, що звільняється при гідролізі АТФ, зв'язані з основними білками, які утворюють м'язові волокна. Пізніше А. Сент-Дьордьї показав, що для гідролізу АТФ, який стимулюється йонами Mg^{2+} (АТФ-азна активність), необхідний комплекс двох білків – актину і міозину (актоміозин).

Міозин нерозчинний у сольових розчинах низької йонної сили, розчинний у слабколужному розчині калій хлориду (0,4-0,5 моль/дм³). Відносна молекулярна маса міозину становить 470-480 кДа. Міозини з м'язів різних типів відрізняються за амінокислотним складом і за імунологічними властивостями. При короткочасній обробці міозину трипсином або хімотрипсином розщеплюються певні пептидні зв'язки і утворюються два фрагменти, які розчиняються в розчинах із низькою йонною силою, названі мероміозинами: важкий мероміозин із відносною молекулярною масою 340 кДа і легкий мероміозин із відносною молекулярною масою 120-160 кДа.

Високоочищені препарати міозину каталізують гідроліз кінцевої фосфатної групи АТФ. Вони активні також за відношенням до ГТФ, ІТФ і ЦТФ. АТФ-азна активність міозину характеризується тим, що вона стимулюється йонами Ca²⁺, сильно залежить від концентрації калій хлориду, має два оптимуми рН (6,0 і 9,5).

АТФ-азна активність міозину залежить від наявних в молекулі сульфгідрильних груп двох типів. Якщо блокувати найбільш чутливі SH-групи першого типу, то АТФ-азна активність міозину зростає. Отже, наявність цих сульфгідрильних груп перешкоджає проявленню активності ферменту. При титруванні другого типу сульфгідрильних груп АТФ-азна активність зникає. Тому можна допустити, що другий тип SH-груп необхідний для процесу гідролізу АТФ. Ті самі сульфгідрильні групи молекули міозину, які важливі для його АТФ-азної активності, необхідні також для зв'язування актину. Відомо, що при зв'язуванні з актином АТФ-азна активність міозину значно змінюється. Якщо для АТФ-азної активності чистого міозину необхідні йони Ca²⁺, а йони Mg²⁺ інгібують його активність, то АТФ-азна активність актоміозину стимулюється йонами Mg²⁺. Активність м'язової аденозинтрифосфатази, яка звільняє хімічну енергію для м'язового скорочення, у малорухливих риб нижча, ніж у активних.

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

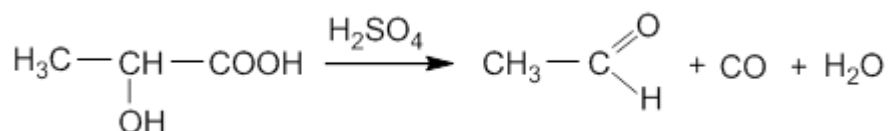
Біологічне окиснення. Енергетичний обмін

Лабораторна робота 1

Кількісне визначення молочної кислоти

у сироватці крові спектрофотометричним методом

Принцип методу. Молочна кислота при нагріванні з сульфатною кислотою перетворюється в оцтовий альдегід, який взаємодіє з гідрохіноном. Утворюється сполука червоно-коричневого кольору.



Мета роботи. Освоїти методику спектрофотометричного визначення молочної кислоти в тканинах тварин. Поглибити знання про участь молочної кислоти у процесах метаболізму.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Мірна пробірка на 10-15см³ з притертим скляним корком. Сироватка крові. Центрифуга або фільтр. Скляні палички. Водяна баня. Метафосфатна кислота. Купрум сульфат (ω=20% та ω=6%). Кальцій гідроксид. Концентрована сульфатна кислота. Льодяна вода. Безводний цинк лактат. Спиртовий розчин гідрохінону (ω=20%).

Хід роботи. У мірну пробірку на 10-15см³ з притертим скляним корком вносять 1см³ сироватки крові, близько 5см³ води, 1см³ метафосфатної кислоти для осадження білків. Доливають водою до 10см³, перемішують. Через декілька хвилин центрифугують або фільтрують.

Для осадження вуглеводів до фільтрату додають 1см³ розчину купрум сульфату (ω=20%), приблизно 1г кальцій гідроксиду і відразу сильно струшують. Якщо при цьому не з'явиться світло-голубе забарвлення, обумовлене утворенням Cu(OH)₂, то слід додати ще

$\text{Ca}(\text{OH})_2$. Суміш залишають стояти 30хв., зрідка струшуючи, а потім центрифугують або фільтрують.

Відбирають 1см^3 надосадової рідини чи фільтрату у мірну пробірку з притертим скляним корком, додають $0,1\text{см}^3$ розчину купрум сульфату ($\omega=6\%$), краплинами вносять рівно 6см^3 концентрованої сульфатної кислоти при охолодженні льодяною водою і перемішуванні скляною паличкою. Закрити корком пробірку вміщують на 5 хвилин в киплячу водяну баню, а потім охолоджують в холодній воді до $10-15^\circ\text{C}$. В обов'язково охолоджений розчин вносять $0,1\text{см}^3$ спиртового розчину гідрохінону ($\omega=20\%$), добре перемішують і ставлять пробірку у киплячу водяну баню на 15 хвилин. Після цього вміст пробірки охолоджують до кімнатної температури і спектрофотометрують (колориметрують) із світлофільтром з довжиною хвилі 465нм (синій світлофільтр) у кюветах з товщиною оптичного шару 10мм проти води.

Для кількісного визначення молочної кислоти в пробі будують калібрувальний графік. Для цього спочатку готують вихідний розчин молочної кислоти. Розчиняють $1,3516\text{г}$ безводного цинк лактату або іншої солі в 10см^3 води, додають $0,5\text{см}^3$ концентрованої сульфатної кислоти і доливають водою до 1дм^3 . Для приготування стандартного розчину молочної кислоти відбирають 10см^3 вихідного розчину і доводять водою до 1000см^3 . В 1см^3 цього розчину міститься 10мкг молочної кислоти.

У пробірки вносять $0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2\text{см}^3$ стандартного розчину лактату, що відповідає вмісту молочної кислоти $2; 4; 6; 8; 10; 12\text{мкг}$ і обробляють так, як і проби з сироваткою крові. Будують калібрувальний графік відкладаючи на осі абсцис вміст лактату в пробі стандартного розчину, а на осі ординат - значення оптичної густини. За калібрувальним графіком визначають вміст молочної кислоти в досліджуваній пробі сироватки крові.

Вміст лактату в сироватці крові визначають за формулою:

$$X = \frac{a \cdot 1000}{V \cdot \text{mM}}, \text{ де}$$

X - вміст молочної кислоти в сироватці крові, ммоль/дм³;

a- вміст молочної кислоти в пробі сироватки крові, взятій для аналізу, мг;

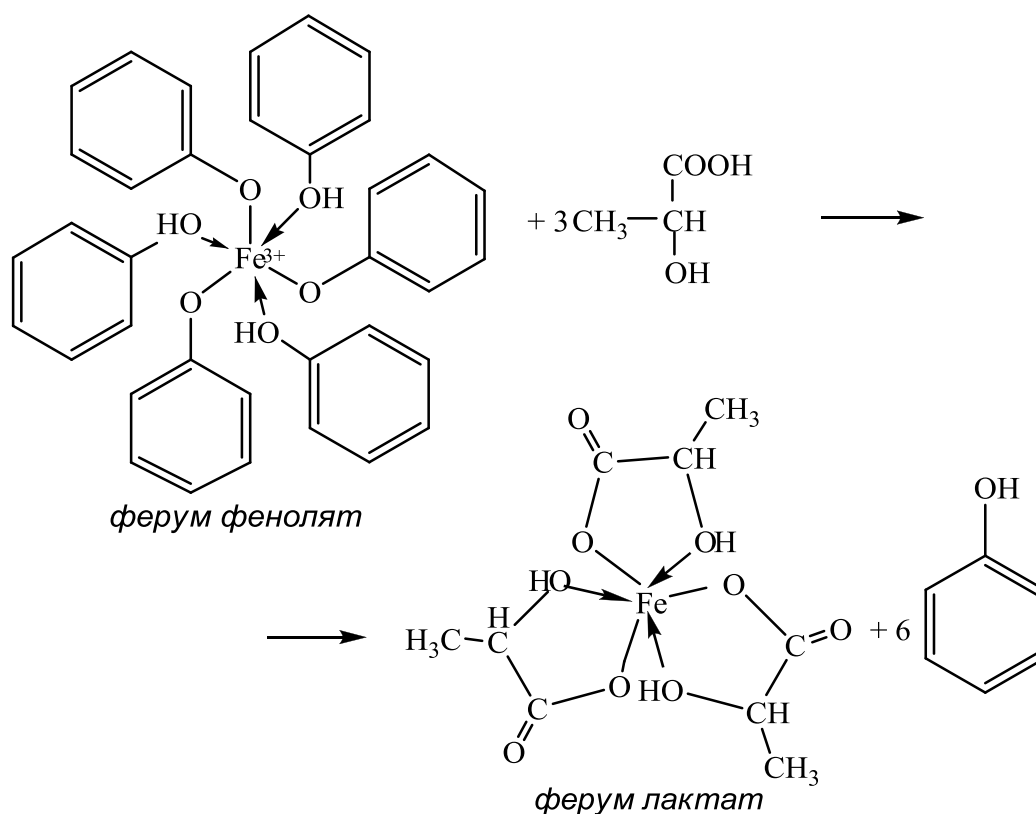
V - об'єм сироватки крові, взятий для аналізу, см³;

mM - мілімолярна маса молочної кислоти, мг/моль.

Лабораторна робота 2

Виявлення молочної кислоти в м'язах

Принцип методу. При взаємодії комплексного ферум феноляту фіолетового забарвлення з молочною кислотою утворюється комплексний ферум лактат жовто-зеленого кольору.



Мета роботи. Освоїти методику якісного виявлення молочної кислоти у м'язах тварин. Поглибити знання про участь молочної кислоти у процесах метаболізму.

Обладнання та реактиви. М'ясорубка. Фарфорова ступка. Марля. Складчастий паперовий фільтр. Штатив із пробірками. Водний розчин фенолу ($\omega=1\%$). Розчин ферум(III) хлориду. Розчин молочної кислоти ($\omega=0,5\%$). Вода дистильована. М'язова тканина.

Хід роботи. М'язову тканину подрібнюють за допомогою м'ясорубки, потім 2-3г її розтирають з 5-7см³ води у фарфоровій ступці. Отриману м'язову кашку фільтрують через подвійний шар марлі. Фільтрат кип'ятять протягом 1хв., охолоджують, фільтрують крізь складчастий паперовий фільтр.

У три пробірки вносять по 5см³ водного розчину фенолу ($\omega=1\%$) і в кожна з них додають краплинами розчин ферум(III) хлориду до появи інтенсивного фіолетового забарвлення. Потім у першу пробірку вносять 1см³ розчину молочної кислоти ($\omega=0,5\%$), у другу – витяжку із м'язової тканини, а в третю – 1см³ води. Вміст пробірок перемішують. У першій і другій пробірці фіолетове забарвлення переходить у жовто-зелене, що вказує на наявність молочної кислоти; у третій пробірці забарвлення розчину не змінюється.

Лабораторна робота 3

Кількісне визначення АТФ у біологічному матеріалі

Принцип методу. З безбілкового екстракту з біологічного матеріалу виділяють АТФ у вигляді ртутної солі, проводять її гідроліз у середовищі хлоридної кислоти протягом 7хв. при 100°С. В гідролізаті визначають приріст неорганічного фосфату, який визначають за методом Фіске-Суббароу.

Інші фосфатні естери, що присутні в безбілковому екстракті, не заважають визначенню АТФ, тому що при обробці меркурій ацетатом екстракту вони залишаються в розчині і відділяються від нерозчинної ртутної солі АТФ.

Мета роботи. Виділити АТФ з біологічного матеріалу і кількісно визначити вміст за фосфатом, що утворився внаслідок гідролізу аденозинтрифосфату. Поглибити знання про роль АТФ у процесах метаболізму.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Центрифуга. Водяна баня. Мірна колба на 25см³. Мірна колба на 1дм³. Штатив із пробірками. Конічна колба. Кров (чи кислотні, водні і спиртові витяжки з тканин). Холодний розчин трихлороцтової кислоти ($\omega=10\%$). Розчин меркурій ацетату ($\omega=20\%$ та $\omega=0,5\%$). Хлоридна кислота ($c=0,1$ моль/дм³ та $c=2,0$ моль/дм³). Розчин фенолфталеїну. Розчин натрій гідроксиду ($c=5,0$ моль/дм³). Сульфатна кислота ($\omega=5-10\%$). Розчин амоній молібдату ($\omega=2,5\%$) в розчині сульфатної кислоти ($c(1/2)=5,0$ моль/дм³). Кристалічна аскорбінова кислота. Кристалічний КН₂РО₄. Дистильована вода.

Хід роботи. До 1см³ крові (чи кислотних, водних і спиртових витяжок з тканин) додають 1см³ холодного розчину трихлороцтової кислоти ($\omega=10\%$) для осадження білків. Якщо роботу проводять з кислоторозчинною фракцією тканини, то цю операцію опускають. Через 30 хвилин осад білка відділяють центрифугуванням при 3000об/хв. протягом 10хв. До надосадової рідини додають 0,5см³ розчину меркурій ацетату ($\omega=20\%$), добре перемішують і через 15хв. центрифугують. Надосадову рідину зливають і відкидають, а осад 2 рази промивають 1-2см³ розчину меркурій ацетату ($\omega=0,5\%$). Потім осад розчиняють в 1см³ розчину хлоридної кислоти ($c=0,1$ моль/дм³), доводять водою до 3см³ і добре перемішують. З розчину відбирають по 1см³ у дві пробірки. В одну пробірку додають 1см³ розчину хлоридної кислоти ($c=2,0$ моль/дм³), нагрівають протягом 7хв. на киплячій водяній бані. Охолоджують, додають краплю розчину фенолфталеїну і нейтралізують розчином натрій гідроксиду ($c=5,0$ моль/дм³) до слабо рожевого забарвлення. Нейтралізований розчин кількісно переносять у мірну

колбу на 25см^3 , пробірку декілька разів ополіскують невеликими порціями дистильованої води, яку зливають у цю ж мірну колбу. Вміст колби переводять у слабкокислое середовище додаванням декількох крапель розведеної сульфатної кислоти ($\omega=5-10\%$), вносять $5-7\text{см}^3$ розчину амоній молібдату ($\omega=2,5\%$) в розчині сульфатної кислоти ($c(1/2)=5,0$ моль/дм³), 20-30мг кристалічної аскорбінової кислоти, перемішують перевертанням колби, доводять водою до мітки, переносять розчин з мірної колби у конічну і нагрівають до $40-50^\circ\text{C}$ на водяній бані для розвитку забарвлення. Забарвлений синій розчин спектрофотометрують (колориметрують) проти контролю на реактиви з світлофільтром з довжиною хвилі 590нм. Контроль на реактиви містить всі компоненти крім екстракту з біологічного матеріалу.

У другій пробірці, де не відбувався гідроліз ртутної солі АТФ, визначають можливі залишки неорганічного фосфату, захоплені осадом ртутної солі АТФ, як описано вище. Приріст неорганічного фосфату внаслідок гідролізу АТФ визначають як різницю між вмістом неорганічного фосфату після проведення гідролізу АТФ і без проведення гідролізу, тобто фосфату, що був захоплений ртутним осадом. Для визначення неорганічного фосфату готують стандартний розчин фосфату. Кристалічний K_2HPO_4 масою 0,1099г розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі на 1дм^3 і доводять водою до мітки. В 1см^3 цього розчину міститься 0,025мг Фосфору.

У колби на 25см^3 вносять 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; $4,0\text{см}^3$ стандартного розчину фосфату і обробляють так, як і дослідні проби. Будують калібрувальний графік, відкладаючи на осі ординат оптичну густину, а на осі абсцис – вміст Фосфору в пробі. За калібрувальним графіком знаходять вміст Фосфору в досліджуваних пробах.

Вміст АТФ в досліджуваному матеріалі визначають із співвідношення:

$$\frac{m(AT\Phi)}{m(P)} = \frac{M(AT\Phi)}{2 \cdot M(P)}; \quad m(AT\Phi) = \frac{M(AT\Phi) \cdot m(P)}{2 \cdot M(P)}, \quad m(P) = m_1 - m_2, \text{ де}$$

m_1 – маса Фосфору в пробі після кислотного гідролізу АТФ, мкг;

m_2 – маса Фосфору в пробі без проведення гідролізу АТФ, мкг;

$$C = \frac{m(P) \cdot 1000 \cdot M(AT\Phi)}{V \cdot 2M(P) \cdot \mu M}, \text{ де}$$

C – концентрація АТФ в досліджуваному екстракті, мкмоль/дм³;

$m(P)$ – маса Фосфору в пробі, мкг;

$M(AT\Phi)$ – молярна маса АТФ, г/моль;

$M(P)$ – молярна маса Фосфору, г/моль;

V – об'єм екстракту, взятий для аналізу, см³;

1000 – перерахунок на 1 дм³ екстракту з біологічного матеріалу;

μM – мікромольна маса АТФ, мкг/моль.

Лабораторна робота 4

Визначення активності аденозинтрифосфатази із м'язів

Принцип методу. Міозин проявляє аденозинтрифосфатазну активність, каталізуючи гідроліз АТФ з утворенням АДФ і неорганічного фосфату: $AT\Phi + H_2O \rightarrow AD\Phi + H_3PO_4$.

АТФ-азна активність міозину проявляється лише за наявності солей. Найбільший вплив на АТФ-азну активність міозину мають йони Ca^{2+} і Mg^{2+} . Значна роль легких ланцюгів міозину у забезпеченні ферментативної активності. Вважається, що йони Ca^{2+} є алостеричними регуляторами і підвищують АТФ-азну активність міозину, тоді як йони Mg^{2+} пригнічують її.

АТФ-азну активність міозину визначають за кількістю неорганічного фосфату, що створюється при гідролізі АТФ. Неорганічний фосфат визначають за методом Фіске-Суббароу.

Мета роботи. Визначити АТФ-азну активність міозину м'язів тварин або риб, поглибити знання про механізми м'язового скорочення.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Фільтри. Свіжа м'язова тканина тварин чи риб. Розчин сахарози ($c = 0,25$ моль/дм³). Мірні пробірки. Трихлороцтова кислота ($\omega = 20\%$). Буферна суміш (рН 7,4). Магній сульфат ($c = 0,05$ моль/дм³). Натрій аденозинтрифосфат ($c = 0,02$ моль/дм³). Вода дистильована. Амоній молібдат ($\omega = 2,5\%$) у сульфатній кислоті ($c(1/2) = 5,0$ моль/дм³). Свіжовиготовлений розчин аскорбінової кислоти ($\omega = 0,4\%$). Стандартний розчин фосфату (KH_2PO_4 або Na_2HPO_4), що містить 0,025 мг Фосфору в 1 см³.

Хід роботи. Свіжу м'язову тканину тварин чи риб масою 100 мг ретельно подрібнюють і гомогенізують з 5 см³ розчину сахарози ($c = 0,25$ моль/дм³).

У дві мірні пробірки (дослідну і контрольну) вносять по 2 см³ отриманого гомогенату. У контрольну пробірку відразу ж додають 1 см³ розчину трихлороцтової кислоти ($\omega = 20\%$). У обидві пробірки вносять по 1 см³ буферної суміші (рН 7,4), по 1 краплині розчину магній сульфату ($c = 0,05$ моль/дм³), по 0,25 см³ розчину натрій аденозинтрифосфату ($c = 0,02$ моль/дм³), інкубують протягом 30 хвилин. Після інкубації в дослідну пробірку для зупинки ферментативної реакції зразу ж додають 1 см³ трихлороцтової кислоти ($\omega = 20\%$). Об'єм рідини в пробірках доводять водою дистильованою водою до 5 см³, перемішують і фільтрують у інші пробірки.

Для визначення неорганічного фосфату, що утворився в процесі гідролізу АТФ під дією АТФ-ази, у мірні пробірки на 10 см³ переносять по 1 см³ фільтрату, додають по 2 см³ розчину амоній молібдату ($\omega = 2,5\%$) у сульфатній кислоті ($c(1/2) = 5,0$ моль/дм³) і по 1 см³ свіжовиготовленого розчину аскорбінової кислоти ($\omega = 0,4\%$). Об'єм проб до-

водять до 10см^3 , перемішують і через 30 хвилин спектрофотометрують (колориметрують) із світлофільтром з $\lambda=590\text{нм}$ у кюветах з $\ell=10\text{мм}$ проти контролю на реактиви. Контроль містить всі інгредієнти суміші, крім розчину натрій аденозинтрифосфату.

Вміст Фосфору неорганічного фосфату в дослідній і контрольній пробах визначають за калібрувальним графіком. Для його побудови у серію пробірок вносять відповідно 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; $5,0\text{см}^3$ стандартного розчину фосфату (KH_2PO_4 або Na_2HPO_4), що містить $0,025\text{мг}$ Фосфору в 1см^3 . А далі проводять операції утворення фосфорномолібденової сині як і при визначенні неорганічного фосфату, який утворюється при гідролізі АТФ. На осі абсцис відкладають вміст Фосфору в стандартних пробах, а на осі ординат – оптичну густину розчинів фосфорномолібденової сині.

АТФ-азну активність м'язів виражають кількістю мікромолів АТФ, яку може гідролізувати фермент, що міститься в 1г тканини, за 1 хвилину.

Розрахунки ведуть за формулою: $E = \frac{(a-b) \cdot V}{m \cdot t \cdot \mu M}$, де E – активність

актоміозинової АТФ-ази, мкмоль Р/г/1хв;

a – вміст Фосфору в дослідній пробі, знайдений за калібрувальним графіком, $\text{мкг}/\text{см}^3$;

b - вміст Фосфору в контрольній пробі, знайдений за калібрувальним графіком, $\text{мкг}/\text{см}^3$;

V – об'єм фільтрату після проведення ферментативної реакції, см^3 ;

μM – мікромольна маса Фосфору, $\text{мкг}/\text{моль}$;

m – маса м'язової тканини, взята для дослідження, г ;

t – час проведення ферментативної реакції, хв .

ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „БІОЛОГІЧНЕ
ОКИСНЕННЯ. ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ОБМІН”

1. Складіть схему окиснення лимонної кислоти в циклі три- і дикарбонових кислот за умови, що сукцинатдегідрогеназа повністю інгібована малоновою кислотою.
2. Скільки молекул АТФ утворюється при повному окисненні до CO_2 і H_2O таких сполук: а) фосфоенолпірувату; б) ацетил-КоА; в) гліцеральдегід-3-фосфату; г) гліцеролу?
3. Визначить число молекул АТФ, що утворюється у процесі окиснення треоніну до CO_2 , H_2O і сечовини.
4. Який атом Карбону α -кетоглутарової кислоти буде міченим після окиснення у тканинах тварин міченого аланіну $\text{CH}_3\text{—CH—COOH}$?
$$\begin{array}{c} | \\ \text{NH}_2 \end{array}$$
5. Із запропонованих тверджень виберіть правильні:
 - а) гліцерофосфат в організмі окиснюється у діоксиацетонфосфат;
 - б) коферментом гліцерофосфатдегідрогенази є ФАД;
 - в) вищі жирні кислоти в організмі окиснюються переважно шляхом β -окиснення;
 - г) коферментом ацил-КоА-дегідрогенази є НАД.
6. Радіоактивну глюкозу, мічену Карбоном ^{14}C у положеннях 3 і 4, інкубували в анаеробних умовах з безклітинним гомогенатом печінки. У яких положеннях буде містити ^{14}C лактат, що при цьому утворився?
7. Напишіть рівняння реакції перетворення сукцинату у фумаролу кислоту. Назвіть фермент, що каталізує цю реакцію.

Складіть схему перенесення атомів Гідрогену від сукцинату на убіхінон.

8. Скільки молекул АТФ може бути синтезовано при окисненні у клітині пальмітинової кислоти до CO_2 і H_2O ? Наведіть відповідні розрахунки.
9. Яка з наведених речовин є найбільшим енергетичним субстратом дихального ланцюга: а) CoQH_2 ; НАДН· H^+ ; б) сукцинат; в) ФАДН₂; г) аскорбат
10. Визначить позицію мітки у молекулі яблучної кислоти, якщо $^{14}\text{C}(6)$ -фруктозо-6-фосфат окиснювався через цикл трикарбонових і дикарбонових кислот.
11. Напишіть рівняння реакцій перетворення вільного гліцеролу в лактат, включаючи всі стадії фосфорилування.
12. Визначить, який атом Карбону глутамінової кислоти буде міченим, якщо карбоксилування пірувату здійснюється $^{14}\text{CO}_2$, причому оксалоацетат, що утворюється, вступає у цикл трикарбонових і дикарбонових кислот, а α -кетоглутарат перетворюється в глутамінову кислоту за участі аміотрансферази?
13. Із запропонованих тверджень виберіть правильні:
 - а) від рівня розпаду вуглеводів у клітині залежить обсяг біосинтезу нуклеозидтрифосфатів;
 - б) АТФ синтезується в мітохондріях у результаті фосфорилування АДФ тільки спряжено з окисненням компонентів циклу трикарбонових і дикарбонових кислот;
 - в) ацетил-КоА, що утворюється у процесі обміну вуглеводів, ліпідів, амінокислот може бути окисненим за участі циклу трикарбонових і дикарбонових кислот;
 - г) спряжено з окисненням вуглеводів і ліпідів постійно відновлюються запаси АТФ.

14. У процесі гліколізу на 1 моль глюкози вивільняється 199080Дж, при спиртовому бродінні на 1 моль глюкози, що розпалася, вивільняється 235620Дж. У кожному випадку 61200Дж вивільненої енергії запасується в макроергічних зв'язках 2 молів АТФ. Розрахуйте коефіцієнти корисної дії спиртового бродіння і гліколізу.
15. Скелетні м'язи містять близько $5 \cdot 10^{-6}$ моль АТФ і $30 \cdot 10^{-6}$ моль фосфокреатину на 1г сирової маси. Розрахуйте роботу (у Дж), яку теоретично може виконати м'яз масою 40г при використанні тільки своїх власних високоенергетичних фосфатних сполук, якщо гліколіз і дихання пригнічені.
16. Повне окиснення одного моля ацетил-КоА у циклі трикарбонових і дикарбонових кислот супроводжується вивільненням 903,84 кДж енергії. У разі спряження процесу окиснення ацетил-КоА з фосфорилуванням звільняється вільної енергії 516,26 кДж/моль. Розрахуйте кількість енергії, яка акумульована в макроергічних зв'язках АТФ. Знайдіть кількість синтезованих молів АТФ. Визначіть частку енергії, яка звільняється при повному окисненні одного моля ацетил-КоА.
17. У печінці відбувається окиснювальне перетворення глутамінової кислоти, міченої ^{14}C по другому атому Карбону і ^{15}N по аміногрупі. В яких атомах названих метаболітів виявляється кожна з міток:
- а) сечовина; б) сукцинат; в) аргінін;
 - г) цитрулін; д) орнітин; е) аспартат.

12. БІОХІМІЯ КРОВІ

12.1. Загальна характеристика крові

Кров – особлива біологічна рідина, яка виконує в організмі цілу низку важливих фізіолого-біохімічних функцій: дихальну, поживну, транспортну, екскреторну, регуляторну, захисну та ін. Всі ці функції забезпечуються наявністю у плазмі та формених елементах крові неорганічних та органічних речовин.

Кількість крові в організмі дорослої людини у середньому складає 1/13 маси тіла (5 – 6 л), ссавців і птахів – 6–15 %, а риб – 1–2%. У костистих риб вона коливається від 0,9 до 3,7%; у морських риб – близько 4,15%, у прісноводних – 2,7%. В активних пелагічних риб кількість крові досягає 7,3%, а у малорухомих донних риб – від 0,9 до 1,9% до маси тіла.

Як відомо, до складу крові входять білки, ліпіди, вуглеводи, вітаміни, гормони, макро- та мікроелементи, а також продукти обміну речовин. Проте слід звернути увагу, що хімічний склад крові може суттєво змінюватись під дією стресових і асфіксичних явищ, які призводять до нагромадження в організмі карбонатної та молочної кислот, глюкози, кортикоїдних гормонів і адреналіну, а також до зміни гематологічних показників і сольового складу плазми крові.

Плазма крові являє собою колоїдно–полімерний розчин, розчинником у якому є вода, розчинними речовинами – солі і низькомолекулярні органічні сполуки; колоїдним компонентом – білки та їх комплекси. До складу плазми входить 92% води, 6–7% органічних та 1,3 – 1,8% неорганічних речовин. Щільність крові коливається у вузьких межах і залежить в основному від вмісту у ній формених елементів, білків, ліпідів. Щільність крові становить 1,032–1,060г/см³. Щільність плазми коливається у межах від 1,022 до 1,029г/см³. Плазма крові є

розчином, що включає речовини в колоїдному стані і солі. Показниками, що характеризують стан колоїдів, є в'язкість і поверхневий натяг; солі забезпечують осмотичний тиск (гідростатичний тиск, який необхідно прикласти до розчину, щоб затримати осмос). Осмос – це одnobічна дифузія молекул розчинника через напівпроникну мембрану до розчину. Велика в'язкість крові у порівнянні з водою залежить від колоїдів, що містяться у ній. Солі, що входять до складу рідкої частини крові, у незначній мірі впливають на її в'язкість.

Осмотичний тиск крові забезпечується розчиненими у ній речовинами. Це електроліти, неелектроліти (сечовина, глюкоза, тощо) та колоїди. Цей показник має дуже велике значення для водного обміну між клітинами та внутрішнім середовищем організму, а також для водного обміну між організмом і навколишнім середовищем. Тому він повинен підтримуватися на постійному рівні. Пластинчастозяброві риби та латимерія проблеми осморегуляції вирішують за рахунок високого вмісту сечовини і триметиламіну у крові (більше 100 ммоль/дм^3) і м'язах (більш 200 ммоль/дм^3). Костисті риби підтримують свої осмотичні концентрації на рівні приблизно у три або чотири рази нижче, ніж у морській воді. У цілому показники осмотичної концентрації для морських і прісноводних риб близькі, хоча у морських є тенденція до дещо більш високих концентрацій. Під час зниження температури середовища у прісноводних риб дещо зменшується концентрація йонів у сироватці крові; у морських риб – навпаки, зростає. Осмотичну активність у біологічних середовищах вимірюють, виходячи із зниження точки замерзання рідини (депресія). Депресія (Δ) на 1°C відповідає осмотичному тиску у 1215 кПа . У костистих морських риб Δ крові у середньому дорівнює $0,761$. Одним із найбільш надзвичайних прикладів пристосування до низьких температур є висока депресія у нототневих риб ($\Delta=2,2$), що пояснюється наявністю у їх крові глікопротеїнів із молекулярною масою від $2,6$ до $33,7 \text{ кДа}$. У прісноводних риб

$\Delta = 0,425 \dots 0,521$. У риб різних видів рН крові коливається у середньому від 7,52 до 7,71. Це пояснюється меншою, ніж у ссавців буферністю крові та малим лужним резервом.

Серед органічних речовин крові найбільш важливими є білки. Кількість білків у плазмі крові ссавців коливається у межах 6 – 8%, а в сироватці крові риб – 2,5–7%. Вміст білків різних фракцій у крові залежить від багатьох факторів, у першу чергу від пори року та умов живлення. Так, у коропів, що харчується природним кормом, у сироватці крові міститься більше глобулінів, ніж у коропів, що харчуються сумішшю природних кормів з зерновими відходами. Співвідношення вмісту альбумінів до глобулінів (білковий коефіцієнт) у риб коливається у межах від 0,223 до 0,770, коня – 0,6, великої рогатої худоби – 0,7-1, вівці – 0,7-0,9, свині – 0,7 – 1.

Вміст вуглеводів у крові різних видів риб коливається у широких межах. У хрящових риб вміст вуглеводів достатньо низький. У акул і скатів він підтримується на рівні 20-40мг%. Найменш рухливі риби мають у середньому менший вміст вуглеводів у крові (від 15,4 до 31 мг%). У активно плаваючих пелагічних морських риб вміст вуглеводів коливається від 59,0 до 90,7%. У прісноводних костистих риб рівень вуглеводів значно коливається у залежності від видової належності риб. У коропа, озерної форелі, лосося вміст вуглеводів у нормі дорівнює 30-50 мг%, а у ляща, судака, сига – від 122,0 до 230,0 мг%.

11.2. Загальні відомості про гемоглобін

Найпростіші організми забезпечуються киснем, необхідним для процесів метаболізму, шляхом дифузії його з навколишнього середовища. Активний метаболізм у тканинах, розташованих у внутрішніх частинах тварин, можливий лише за наявності механізму доставки кисню і виділення CO_2 .

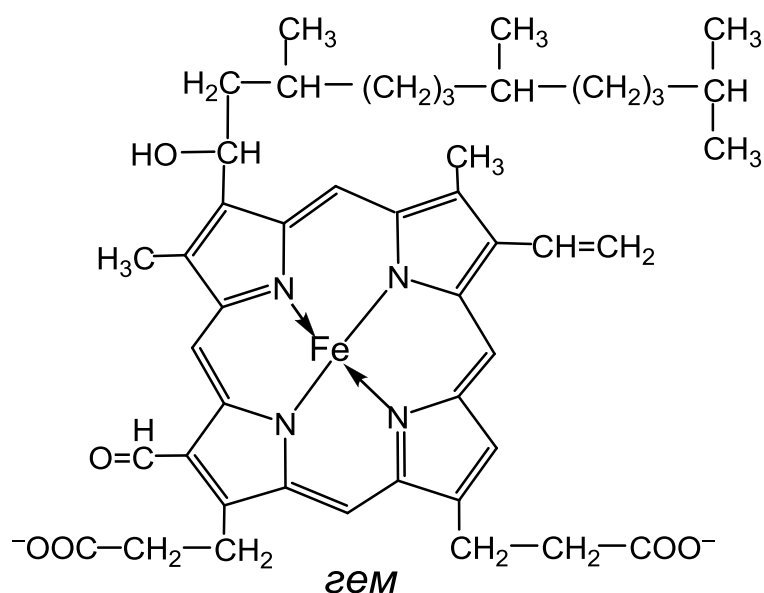
Кисень переноситься кров'ю у двох формах: розчинений у плазмі крові і зв'язаний з гемоглобіном еритроцитів. Обмежена розчинність кисню у воді дозволяє транспортувати в розчиненому стані тільки $0,3\text{см}^3 \text{O}_2/100\text{см}^3$ крові, і навіть при значному підвищенні роботи серця кількість розчиненого кисню не може задовольнити метаболічні потреби. Оскільки кожен грам гемоглобіну може приєднати $1,34\text{см}^3 \text{O}_2$, а вміст гемоглобіну в нормальній крові складає близько $15\text{г}/100\text{см}^3$, то в повністю окисненої крові кількість O_2 , зв'язаного з гемоглобіном, може перевищувати кількість розчиненого кисню в 70 разів.

Гемоглобін – складний білок, простетичною групою якого є гем. Молекула гемоглобіну має чотири субодиниці: дві ідентичні α - і дві ідентичні β -субодиниці. Кожна субодиниця складається з поліпептидного ланцюга і небілкової частини – гема.

Амінокислотна послідовність α -ланцюга гемоглобіну в різних організмах може бути дещо різною. Так, послідовність амінокислот у α -субодиницях гемоглобіну людини, горили, коропа відрізняється, хоч всі ці гемоглобіни є переносниками Оксигену і мають субодиничну структуру $\alpha_2\beta_2$, мають подібну конформацію молекул і однакову біологічну функцію.

Синтез α - і β -ланцюгів гемоглобіну обумовлений генами, що знаходяться в різних хромосомах.

Гемоглобіни різних видів відрізняються за формою кристалів, розчинністю, спорідненістю до O_2 , спектрами поглинання, але всі вони складаються з безбарвного білку - глобіну, зв'язаного нековалентно з феропротопорфірином (гемом). Відмінності у властивостях гемоглобінів обумовлені виключно відмінностями у послідовності амінокислот і конформації глобіну; гем однаковий, або майже однаковий, у всіх гемоглобінів хребетних тварин і у більшості безхребетних.



Феріпротопорфірин, або гемін, містить Fe^{3+} , має сумарний позитивний заряд і приєднує додатковий ліганд (п'ятий). Вільний гем нестійкий і швидко окиснюється до геміну.

Гемоглобін, не зв'язаний з киснем, який містить гем з Fe^{2+} , називається дезоксигемоглобіном, ферогемоглобіном або відновленим гемоглобіном і позначається *Hb*. Ферум кожного з чотирьох гемів молекули гемоглобіну може оборотно зв'язувати молекулу O_2 . Повністю окисгенований *Hb*, який називається оксигемоглобіном (HbO_2), містить чотири молекули O_2 на молекулу гемоглобіну. Гемоглобін може також сполучатися з чотирма молекулами CO з утворенням CO^- гемоглобіну або карбоксигемоглобіну (HbCO). Деякі окисники, зокрема пероксиди, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, хінони можуть окиснювати Fe^{2+} в гемоглобіні до Fe^{3+} з утворенням метгемоглобіну (MetHb), який не приєднує ні O_2 , ні CO . Він утворюється *in vivo* в нормі, але в невеликих кількостях, і ферментативно відновлюється до *Hb*. Fe^{3+} в MetHb може взаємодіяти з багатьма аніонами, наприклад, з OH^- , Cl^- . MetHb взаємодіє з CN^- , утворюючи ціанметгемоглобін.

Гем приєднується до білка глобіну координаційним зв'язком між атомом Феруму гему і атомом Нітрогену гістидинових залишків у молекулі глобіну.

Унікальною особливістю гемоглобіну є його здатність оборотно зв'язувати O_2 , утворюючи стабільний комплекс, без окиснення гемового Fe^{2+} у Fe^{3+} .

На гемоглобін дуже схожий міоглобін м'язів хребетних тварин. У вигляді оксиміоглобіну MbO_2 він є резервуаром O_2 в скелетних м'язах, які перебувають у стані спокою, а при м'язовій активності звільняє O_2 . Тільки 30 залишків амінокислот міоглобінів гомологічні амінокислотним залишкам α - або β -ланцюгів гемоглобінів хребетних, однак третинні структури міоглобінів і ланцюгів гемоглобінів дуже подібні. В розведених розчинах Mb знаходиться у вигляді мономера.

Міоглобін може акцептувати O_2 від HbO_2 , зберігати його в м'язовій клітині і забезпечувати киснем цитохромоксидазу - кінцевий фермент у ланцюзі ферментів клітинного дихання, коли поступлення O_2 виявляється обмеженим.

У процесі скорочення м'язів, коли потреба в O_2 максимальна і внутрішньоклітинний парціальний тиск O_2 знижується, O_2 дисоціює з комплексу з міоглобіном і стає доступним для окиснювальних процесів.

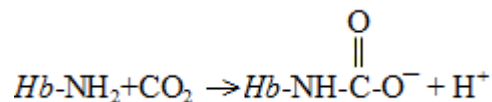
Велика кількість міоглобіну міститься в серцевому м'язі. Особливо великий вміст міоглобіну в м'язах пірнаючих ссавців. Це, можливо, полегшує занурення їх у воду на довгий час. М'язи дельфінів і тюленів містять 3,5 і 7,7% міоглобіну відповідно; ці концентрації приблизно корелюють з тривалістю перебування цих тварин під водою. У нервових клітинах різних безхребетних також є міоглобіноподібні пігменти. В усіх м'язах міоглобін виступає як внутрішньоклітинний транспортний засіб, що полегшує процес перенесення кисню зважаючи на те, що розчинність і константа дифузії вільного кисню обмежує

його здатність проходити відстані між стінкою м'язового капіляра і віддаленими частинами клітини, де він використовується.

Зв'язування гемоглобіном O_2 залежить не тільки від парціального тиску кисню, але і від рН, концентрації CO_2 , 2,3-діфосфогліцерату в еритроцитах і деяких аніонів, таких, як Cl^- . Збільшення концентрації CO_2 або 2,3-діфосфогліцерату знижує спорідненість *Hb* до O_2 при постійному рН. Процеси зв'язування O_2 , H^+ , CO_2 , 2,3-діфосфогліцерату з *Hb* взаємозалежні; зміна концентрації однієї з цих речовин впливає на зв'язування *Hb* з іншими.

При зміні парціального тиску CO_2 у середовищі навколо еритроциту змінюється рівновага системи *Hb*- O_2 . Це явище відоме як ефект Бора. Цей ефект має велике фізіологічне значення. Коли артеріальна кров попадає в зону тканин, CO_2 дифундує в еритроцити, понижуючи рН і спорідненість *Hb* до O_2 . Втрата CO_2 в органі, де відбувається газообмін, в результаті якої міг би потенціально збільшитися рН, підвищує спорідненість *Hb* до O_2 і, як наслідок, сприяє насиченню гемоглобіну киснем в умовах відносно низького парціального тиску O_2 .

CO_2 також зв'язується з *Hb* з утворенням карбаміногемоглобіну:



Реакція оборотна і кількість утвореного карбаміногемоглобіну визначається парціальним тиском CO_2 . Зв'язують CO_2 тільки N-кінцеві α -аміногрупи амінокислот поліпептидних ланцюгів гемоглобіну. Спорідненість до CO_2 α -аміногрупи β -ланцюгів *Hb* приблизно в три рази більша, ніж спорідненість α -аміногрупи α -ланцюгів. У ідентичних умовах більше CO_2 зв'язується з аміногрупами поліпептидних ланцюгів *Hb*, ніж *HbO₂*.

Специфічна пристосованість різних переносників O_2 до виконання функції в тих організмах, в яких вони знаходяться, краще всього

ілюструється двома їх характеристиками: ступенем вираженості в них ефекту Бора і ступенем їх насичення O_2 в артеріальній крові.

У морських костистих риб (*Teleosts*), які ведуть активне життя в океанських водах, добре насичених киснем і які майже не містять CO_2 , ефект Бора виражений особливо сильно. Він менш виражений у тварин, які живуть у прісній воді, а у тих видів, що живуть у середовищі з низьким вмістом O_2 і великим вмістом CO_2 , ефект Бора може взагалі бути відсутнім або навіть діяти в протилежному напрямку.

Риба з холодних швидких ручаїв не відчуває нестачі кисню, у той час як у стоячих водоймах має місце дефіцит і більш значні коливання вмісту кисню. Ставкова риба більш ефективно використовує кисень при його низьких концентраціях. У холодній воді кисню розчиняється більше, ніж у теплій, отже, при низьких температурах рибі треба менше гемоглобіну.

У риб, які перебувають у найбільш активній фазі міграції і одночасно інтенсивно харчуються, рівень гемоглобіну підвищений. Хоча кров малоактивних риб має низьку здатність транспортувати кисень, все ж вони більш ефективно використовують кисень води і можуть жити в умовах більш низького рівня кисню, ніж активні риби. Активні риби, поміщені у воду з низьким вмістом кисню, не можуть забезпечити нормальний вуглеводний обмін; в їх тканинах накопичується молочна кислота.

М'язи і нервова тканина активних видів риб потребують значного забезпечення киснем. У крові деяких антарктичних риб, наприклад *Chaenocephalus aceratus*, взагалі не міститься гемоглобіну, такі риби мають зябра білого кольору. Слід зазначити, що риби з білою кров'ю не є малорухливими, а деякі види ведуть пелагічний спосіб життя і утворюють стадні скупчення. Поверхня зябр у цих риб дуже велика, що сприяє газообміну, значна частина якого відбувається, можливо, і через шкіру. Вміст Феруму в крові в них менше $1\text{мг}\%$ і фактично ця

кров являє собою плазму з помірним вмістом білих кров'яних елементів. У ній міститься 0,7% кисню (за об'ємом) у порівнянні з 6% у видів, які мають еритроцити і живуть у цьому ж районі. Вважають, що багато видів риб, які знаходяться в стані спокійного плавання, отримують весь необхідний кисень з плазми крові і тільки під час прискорених рухів використовують кисень з гемоглобіну. Можливо, що гемоглобін таким риbam взагалі не потрібний. Але є риби, наприклад *Scomber scombrus*, які не здатні навіть дихати, якщо вони не рухаються вперед. У таких видів необхідний рівень вентиляції зябр без поступального руху практично неможливий.

При електрофорезі гемоглобін часто розділяється на фракції, які рухаються з різною швидкістю (поліморфізм), співвідношення яких може бути використано для ідентифікації різних рас або стад у складі одного виду. Фракційний склад гемоглобіну змінюється з віком риби, його вміст у крові збільшується з ростом риби. Проте, поліморфізм гемоглобінів, пов'язаний з ростом риби, не є загальним явищем.

У досліджах на лососевих було виявлено, що вміст гемоглобінів у крові не має відмінностей у залежності від статі риби.

Гемоглобін присутній у крові майже всіх костистих риби і еласмобранхій, але у круглоротих у крові міститься еритрокруорин, пігмент, що містить Ферум і переносить кисень, характерний для безхребетних. Пігменти крові круглоротих займають проміжне положення між міоглобінами і гемоглобінами вищих тварин. Гемоглобін целоканта латимерії також вважається примітивним. Вміст Феруму в крові еласмобранхій нижчий, ніж у більшості костистих риби. Генезис еритроцитів у еласмобранхій більш схожий з генезисом еритроцитів круглоротих, ніж костистих риби. Вміст гемоглобіну в крові риби зменшується при голодуванні.

12.3. Техніка взяття крові у риб

Якщо у різних видів тварин техніку взяття крові детально описано у багатьох посібниках, то у риб вона подається рідше. Бажано брати кров у голодної риби, витриманої у добре аерованій воді протягом 5-10хв. після відлову. Якщо це зробити неможливо, то спійману рибу слід відразу помістити у ємність із водою з водоймища у співвідношенні 1:10, яка містить релаксуючу концентрацію одного з анестетиків: пропоксат (0,6-0,8мг/дм³), хінальдин (25-30 мг/дм³), діетиловий етер (1-1,5%). Вода, в якій знаходиться анестезована риба, повинна постійно аеруватись.

Кров у риб можна брати декількома способами: із серця, зябрової вени, підшкірної артерії, шляхом відсічення хвостового стебла (каудоектомія).

Це залежить від розміру об'єкта, необхідної для дослідження кількості крові, оснащеності і навичок. Із цією метою використовують шприц із ін'єкційною голкою або пастерівську піпетку. Інструменти попередньо обробляють водними розчинами антикоагулянтів: натрій цитрату або оксалату у концентрації 2мг/см³, гепарином—1000МО/см³ або $\approx 8\text{мг/см}^3$. 1 одиниця сухого гепарину = 0,0077мг. Наприклад, розчин гепарину, який знаходиться у продажу з вихідною концентрацією 5000 МО/см³, розводять у 5 разів. Перед взяттям крові шприц і голку ополіскують прокип'яченим 0,65%-ним розчином NaCl. За будь-якого способу взяття крові необхідно дотримуватись певних правил: місце пункції після зняття луски обробляють 70%-ним спиртом і висушують ватним тампоном для видалення слизу, багатого тромбокіназою. Місце взяття крові не можна стискувати з метою запобігання попадання тканинної рідини, яка може викликати помилку у результатах досліджень.

Повторно брати кров із одного і того ж місця не рекомендується. Кров, що використовується для аналізу, повинна бути свіжовзятою,

рідкою. З метою запобігання руйнації еритроцитів (гемолізу), кров випускають у підготовлені пробірки (або годинникове скло) обережно по стінці.

ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Біохімія крові

Лабораторна робота 1

Способи взяття крові у риб

Мета роботи. Оволодіти методами взяття крові у риб.

Обладнання та реактиви Риба. Пристрій для фіксації риби. Шприц із порожнистою голкою або пастерівська піпетка. Марля. Рушник. Ватно-марлеві тампони. Антикоагулянти.

Хід роботи. Перед дослідженням рибу обережно виловлюють сачком із води, загортають у чисту марлю або рушник і відразу ж приступають до взяття крові. Місце, звідки планують брати кров, очищають від слизу і надлишку вологи за допомогою ватно-марлевого тампона. Проби крові можна отримати різними методами.

Взяття крові із серця. Рибу за допомогою марлі або рушника надійно фіксують спиною вниз. Порожнисту голку або пастерівську піпетку вводять, попередньо проколовши шкіру препарувальною голкою, в точку, яка знаходиться у райдужної форелі посередині лінії, яка сполучає основи правого і лівого грудних плавців, у коропа – дещо ближче до голови. Голку або піпетку вводять у серце під кутом 30-45° до фронтальної площини тіла риби. Сильна кровотеча свідчить про правильне влучення голки в порожнину серця. Якщо потрібно отримати стерильну кров, місце уколу слід ретельно очистити від слизу, продезінфікувати і припекти розпеченим шпателем. Кров можна також взяти безпосередньо із серця після розтину навколосерцевої сумки.

Взяття крові із хвостової артерії

Метод 1. Рибу фіксують так само, як у попередньому випадку. Кров відбирають порожнистою голкою або пастерівською піпеткою, які вводять із черевного боку повільним обертальним зануренням їх

по медіальній лінії за анальним плавцем під кутом 45° до упору в хребет риби. Шкіру в місці уколу проколюють спочатку металевою голкою, а в отвір, що утворився, вводять пастерівську піпетку. Легким рухом вправо і вліво проколюють артерію і набирають кров шляхом обережного підсмоктування. Для отримання стабілізованої крові, кров, яка витікає з кровоносної судини, змішують із натрій цитратом або оксалатом у розрахунку 0,15г натрій оксалату або 0,3г натрій цитрату на 100см^3 крові або 3,8%-ного розчину, яким споліскують пробірку. Гепарин використовують у кількості 100 одиниць на 1см^3 крові (близько 2-5 крапель нерозбавленого гепарину на 10см^3 крові).

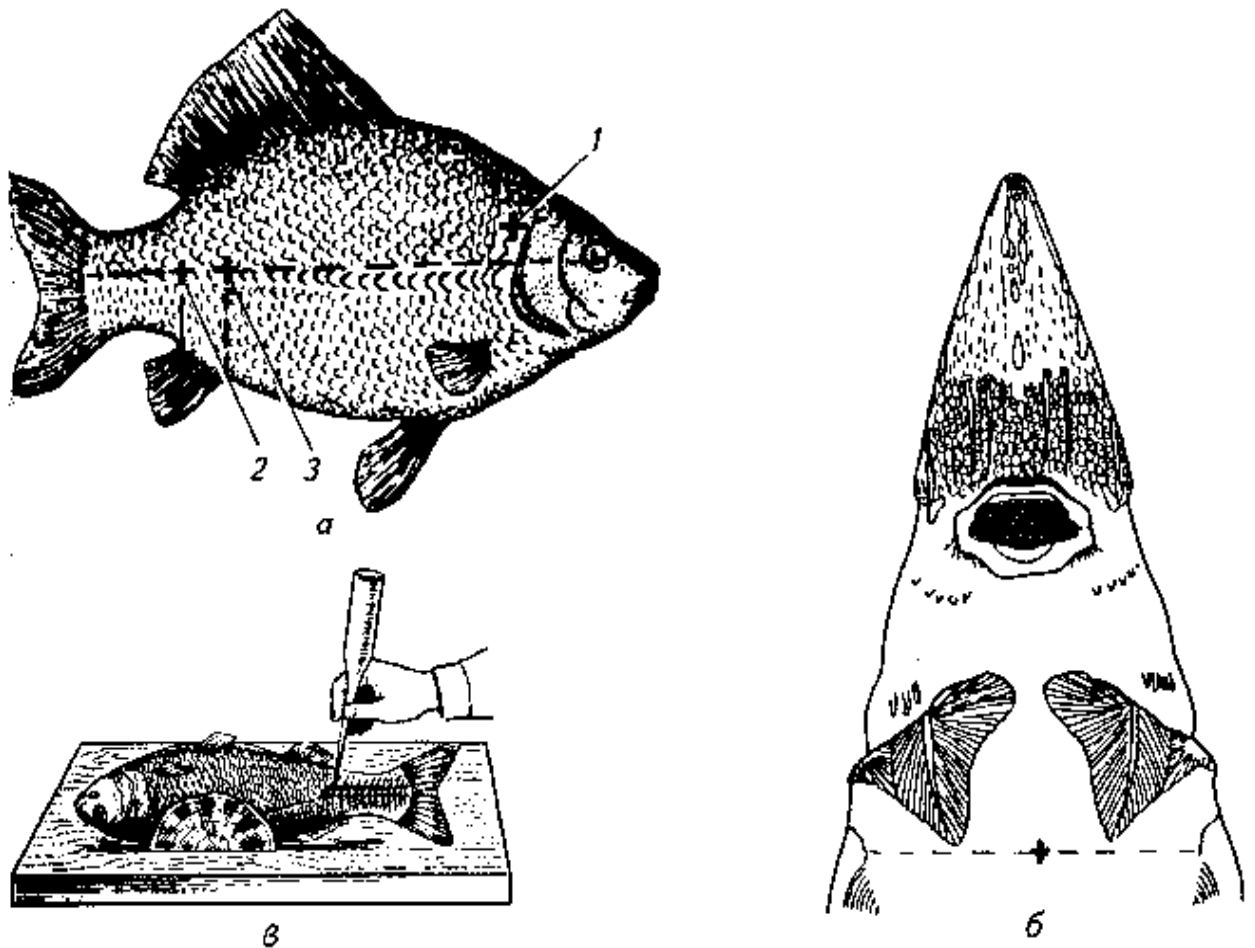


Рис. 11. Місця взяття крові у корошових (а), осетрових (б) риб та один із способів взяття крові (в): 1 – із зябрової артерії; 2, 3 – з хвостової артерії

Метод 2. Інший спосіб взяття крові з хвостової артерії полягає у наступному. Процес проводять відрізанням хвоста риби ножицями або ножом. У великих риб хвіст відтинають сокирою. Кров збирають у скляну посудину. У невеликих риб кров беруть із місця кровотечі з кукси стебла хвоста. Кров збирають, тримаючи рибу головою вверх. Але даний спосіб не виключає надходження в кров тканинної рідини, внаслідок чого результати можуть виявитись недостовірними. Враховуючи це, для дослідження беруть другу-третю краплю крові.

Взяття крові із підшкірної артерії. Рибу фіксують на боці. Точка введення голки або пастерівської піпетки знаходиться у цьоголіток приблизно на 1-1,5мм нижче пересічення бічної лінії і перпендикулярної до неї, уявно опущеної від анального отвору. У більш великих риб - в точці перетину від задньої межі анального плавця.

Взяття крові з попередньо препарованої аорти. У риби, що знаходиться у фіксованому положенні, ножицями з тупими кінцями надрізають шкіру в ділянці серця з боку зябрових дуг, потім пінцетом розсовують тканини, звільняючи аорту, підводять під неї дві лігатури і, притримуючи судину однієї з них, беруть шприцом кров (голка має бути спрямована до серця проти течії крові). Під час взяття крові слід стежити, щоб стінки судини не торкалися отвору голки. Якщо необхідно призупинити потік крові із серця, судини злегка затягують за допомогою другої лігатури. Щоб уникнути зсідання крові, голки, шприци, пробірки, які призначені для взяття крові, споліскують антикоагулянтом (4-5 крапель гепарину на 10см³ дистильованої води).

Лабораторна робота 2

Отримання сироватки та плазми крові

Принцип методу. Метод заснований на розподіленні крові на фракції за допомогою центрифугування.

Мета роботи. Навчитися отримувати плазму та сироватку крові. Пояснити різницю між плазмою та сироваткою крові.

Обладнання та реактиви. Центрифуга. Чисті сухі центрифужні пробірки. Термостат. Тонка пружна проволока. Кров. Гепарин, синтетичний препарат, ($\omega=1\%$). Розчин ЕДТА (трилон Б), $\omega=10\%$). Натрій цитрат. Натрій оксалат.

Хід роботи. Для одержання сироватки взяту кров переливають у чисті сухі центрифужні пробірки, які розміщують у термостаті при температурі 37°C на 1-2 год. для зсідання, або залишають при кімнатній температурі до кінцевого виділення сироватки. Після утворення згустку його відділяють від стінок пробірки шляхом обвідки тонкою пружною проволокою, кінець якої занурений до дна пробірки. Після цього для швидкого отримання сироватки кров відразу ж центрифугують протягом 15хв. при 2000-3000об/хв. Прозору сироватку наливають у чисті пробірки і зберігають для досліджень на холоді: одну-дві доби – при $4-6^{\circ}\text{C}$, 1-2 тижні - при температурі від -10 до -18°C , та до 6 місяців у рідкому азоті (-196°C). У коропа сироватка не має кольору або слабкожовтого кольору. Пробірки з сироваткою крові для тривалого зберігання закривають квадратним шматочком лейкопластиру. Досить зручно сироватку можна зберігати в морозильній камері холодильника. Проте повторні заморожування і відтаювання сироватки не рекомендуються. В польових умовах, де відсутній холодильник, для короткочасного зберігання і доставки проб зручно користуватись широкогорлим термосом з льодом.

Отримання плазми. Враховуючи те, що процес утворення згустку з білка крові фібриногену потребує певного часу, протягом якого можуть змінитись деякі біохімічні показники у сироватці, в останній час найчастіше практикують процедуру отримання та використання плазми крові - сироватки, яка містить фібриноген. Основною передумовою отримання плазми крові є запобігання її згортання. З цією метою у

пробірку для одержання плазми крові попередньо вносять антикоагулянт. На 5-20см³ крові беруть наступні кількості антикоагулянтів: 1-2 краплі (0,05-0,1см³) розчину гепарину (синтетичний препарат), ($\omega=1\%$), 3-4 краплі розчину ЕДТА (трилон Б, $\omega=10\%$), 15-20мг, натрій цитрату або 15-20мг натрій оксалату. Проби крові з антикоагулянтом центрифугують 20-30хв. при 2000-3000об/хв. Прозора рідина жовто - солом'яного кольору у верхній частині пробірки і є плазмою крові. Зберігають та використовують плазму крові так само, як і сироватку. Всі етапи отримання плазми крові проводять за температури нижче 10°C, що сприяє сталості більшості її біохімічних показників.

Лабораторна робота 3

Виявлення гемі в гемоглобіні крові за реакцією з бензидином і гваяколом

Принцип методу. Метод ґрунтується на окисненні бензидину обо гваяколу гідроген пероксидом за участі гемі. Утворюються забарвлені продукти реакцій.

Мета роботи. Навчитись виявляти сліди крові за допомогою бензидинової проби.

Обладнання та реактиви. Розчин бензидину в льодяній оцтовій кислоті ($\omega=5\%$). Розчин гваякової смоли в етанолі ($\omega=2\%$). Етиловий спирт 95% -ний. Розчин Н₂О₂ ($\omega=3\%$). Дефібринована кров.

Хід роботи. Декілька крапель дефібринованої крові розводять водою до 5см³. Отриманий розчин ділять на дві частини.

До одної з них додають рівний об'єм розчину бензидину ($\omega=5\%$) в льодяній оцтовій кислоті.

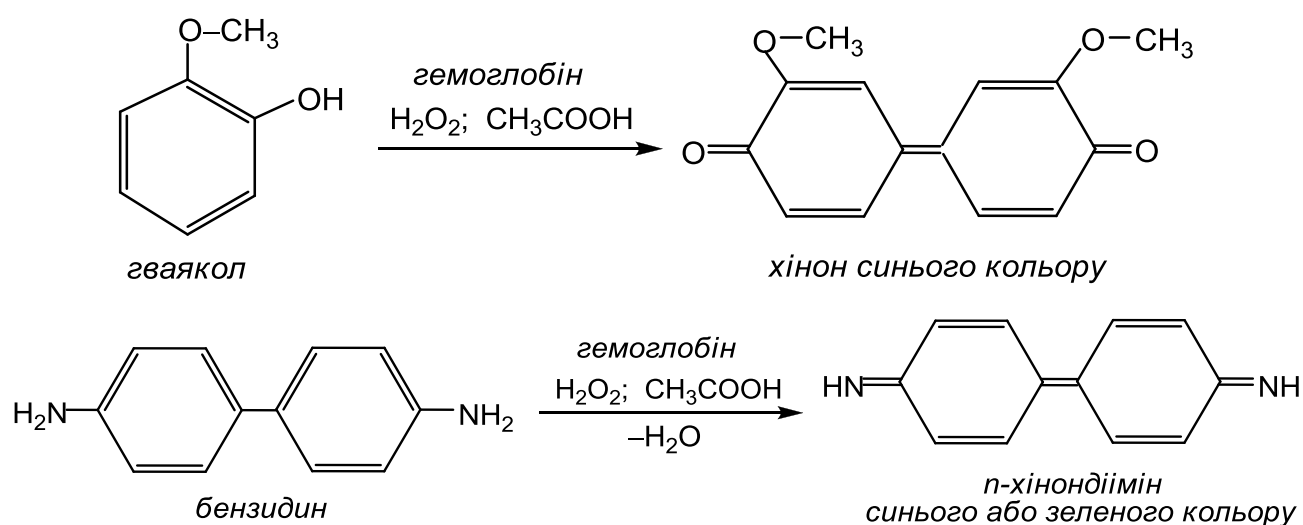
До другої частини додають рівний об'єм розчину гваякової смоли ($\omega=2\%$) в 95%-ному етанолі.

Перемішують і в кожному з проб вносять по декілька крапель розчину гідроген пероксиду ($\omega=3\%$).

У обох випадках розвивається синє або зелене забарвлення.

Розвиток забарвлення обумовлений окисненням бензидину або гваяколу гідроген пероксидом. Гем у цих реакціях виступає у ролі каталізатора у складі каталази еритроцитів, яка каталізує розклад H_2O_2 на H_2O та O_2 .

Замість розчину гваякової смоли краще взяти спиртовий розчин чистого гваяколу.



Гваякол – моноетиловий етер пірокатехіну. Міститься у смолі тропічного гваякового („залізного”) дерева – бакаута.

Ці реакції дуже чутливі і під назвою бензидинової або гваякової проби на кров застосовуються для виявлення слідових кількостей крові.

Лабораторна робота 4

Кількісне визначення гемоглобіну крові

Принцип методу. Гемоглобін окиснюється калій гексаціано(III) фератом до метгемоглобіну, який утворює з ацетонціангідрином забарвлений ціанметгемоглобін, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту гемоглобіну.

Мета роботи. Визначити вміст гемоглобіну в крові тварин (або риб) колориметричним методом, поглибити знання про будову і фізіологічну роль гемоглобіну, з'ясувати особливості вмісту гемоглобіну в крові різних тваринних організмів.

Обладнання та реактиви. Спектрофотометр або фотоелектроколориметр. Штатив із пробірками. Мікропіпетки. Робочий розчин для визначення гемоглобіну об'ємом 5см^3 , який містить ацетонціангідрин, калій гексаціано-(III) ферат, натрій гідрокарбонат. Кров.

Хід роботи. У пробірку вносять робочий розчин для визначення гемоглобіну об'ємом 5см^3 , який містить ацетонціангідрин, калій гексаціано(III)ферат, натрій гідрокарбонат. У цей розчин за допомогою мікропіпетки вносять $0,02\text{см}^3$ крові, добре перемішують. Спектрофотометрують (колориметрують) через 10хв. при довжині хвилі 540нм у кюветі з товщиною шару 10мм проти робочого розчину для визначення гемоглобіну. Стандартний розчин гемоглобінціаніду застосовують нерозведеним. Оптичну густину вимірюють за тих самих умов, що й дослідну пробу. Вміст гемоглобіну визначають за калібрувальним графіком. Із стандартного розчину гемоглобінціаніду готують розведення за табличними даними (табл. 25).

Таблиця 30. Розведення стандартного розчину гемоглобінціаніду

Стандартний розчин гемоглобіну, см^3	Робочий розчин для визначення гемоглобіну, см^3	Концентрація гемоглобіну в крові, г/дм^3	Екстинкція
-	6	Контроль	
2	4	50	
4	2	100	
6	-	150	

ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „БІОХІМІЯ КРОВІ”

1. Охарактеризуйте буферні системи крові.
2. Поясніть механізм дії гемоглобінового буфера.
3. Охарактеризуйте осмотичну активність у біологічних середовищах.
4. Які є правила забору крові?
5. Поясніть різницю між сироваткою і плазмою крові.
6. Дайте характеристику гемоглобіну. Які потреби риб у гемоглобіні?
7. Які особливості міоглобіну м'язів у різних тварин?.
8. Що таке ефект Бора?

13. СТАНДАРТИ І СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

За даними словника «стандарт» (*standard*) – це 1) норма, зразок, мірило, основа; 2) типовий вигляд виробів, що задовольняє певні умови по відношенню якості, хімічного складу, фізичних властивостей, міри, ваги і т.д. Слово «стандартизація» означає 1) встановлення в директивному (загальнодержавному чи відомчому) порядку строго визначених норм якості, форм і розмірів виробів, обов'язкових для виробників і споживачів; 2) зведення багатьох виробів до невеликого числа типових, що дозволяє більш раціонально організувати виробництво. Стандартизація має величезне значення для підвищення продуктивності праці, для зниження собівартості і кращої організації виробництва. Звідси вираз «стандартний» означає «той, що відповідає стандарту, тобто задовольняє його умови або – типовий».

Особливої уваги питанням стандартів і стандартизації надається сьогодні в усіх галузях народного господарства, в тому числі і в науці та в експериментальних дослідженнях. Значних успіхів у цьому напрямі досяг Національний університет біоресурсів і природокористування України. За ініціативою ректора університету академіка Д.О.Мельничука було створено УЛЯБП АПК – Українську лабораторію якості і безпеки продукції АПК (Розпорядження Кабінету Міністрів України від 2 жовтня 2003 року № 584 – р.) Вона атестована Всеукраїнським Державним науково-виробничим центром стандартизації метрології, сертифікації та захисту прав споживачів (Укрметртестстандарт), що свідчать про відповідність критеріям атестації вимірювальних лабораторій державної метрологічної системи.

Система управління якістю вказаної лабораторії побудована згідно вимог ДСТУ ISO/IEC 17025:2006, що є ідентичним до

міжнародного стандарту ISO/IEC 17025:2005. У 2007 році Атестатом акредитації Національне агентство з акредитації України засвідчило компетентність лабораторії відповідно до вимог ДСТУ ISO/IEC 17025, а в 2010 році вона успішно підтвердила компетентність і, крім того, розширила галузь акредитації.

Принципи та засади побудови лабораторії у частині вимог до управління формування з урахуванням вимог міжнародного стандарту ISO 9001:2000. Відповідно до наказу МАП України та УААН від 29 грудня 2007 року № 966/141 НУБіП України було присвоєно статус підприємство (лабораторія) генетичного контролю – єдиної в Україні.

На даний час лабораторія здатна виконувати більше 500 видів різноманітних досліджень. Дослідження здійснюються у найрізноманітніших напрямках і дають змогу провести аналіз рослинницької і тваринницької продукції від початкових стадій її отримання до готового продукту, що потрапляє на стіл споживача.

Завдяки функціонуванню УЛЯБП АПК НУБіП України як позавідомчої державної лабораторії, в Україні створюються умови формування ринку безпечної та якісної продукції як для українського споживача, так і для забезпечення проведення експортно-імпортних торгових операцій. Лабораторія уповноважена проводити державні випробовуваному захисту рослин та агрохімікатів з метою їх реєстрації в Україні. Всі співробітники установи пройшли навчання щодо вимог міжнародних стандартів до діяльності дослідницьких лабораторій і постійно удосконалюють майстерність та кваліфікацію на навчальних курсах, семінарах, стажуваннях як в Україні, так і за її межами (Японія, Німеччина, Франція, США та ін.) Їхній досвід дозволяє запропонувати виробникам також й індивідуальні комплексні вирішення лабораторного супроводу виробництва якісної і безпечної продукції від вхідного контролю до контролю готового продукту.

14. ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ У БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРНІЙ ПРАКТИЦІ

14.1. Вуглеводи (*Carbohydrates*)

ISO 11292:1995 Instant coffee -- *Determination of free and total carbohydrate contents -- Method using high-performance anion-exchange chromatography* (Визначення вмісту вільних вуглеводів та загального вмісту вуглеводів. – Метод використання високо роздільної аніонообмінної хроматографії)

ДСТУ ISO 6865:2004 Корми для тварин. Визначення вмісту сирової клітковини методом проміжного фільтрування (ISO 6865:2000, IDT)

ДСТУ ISO 5498:2004 Продукти сільськогосподарські харчові. Загальний метод визначення вмісту сирової клітковини (ISO 5498:1981, IDT)

ДСТУ 3945-2000 (ГОСТ 12575-2001) Цукор. Методи визначення редукувальних речовин

Крохмаль (*Starch*)

ДСТУ 2211-93 Крохмаль та крохмалепродукти. Терміни та визначення

ДСТУ ISO 5554:2005 Продукти м'ясні. Метод визначення вмісту крохмалю (контрольний метод) (ISO 5554:1978, IDT)

ISO 5554:1978 Meat products -- *Determination of starch content (Reference method)* (М'ясні продукти--Визначення вмісту крохмалю)

ISO 6493:2000 Animal feeding stuffs -- *Determination of starch content -- Polarimetric method.* (Корми для тварин – Визначення вмісту крохмалю – Поляриметричний метод)

ISO 10520:1997 *Native starch -- Determination of starch content -- Ewers polarimetric method.* (Нативний крохмаль – Визначення вмісту крохмалю – Поляриметричний метод Еверса)

ISO 15914:2004 *Animal feeding stuffs -- Enzymatic determination of total starch content* (Корми для тварин. – Ензиматичне визначення загального вмісту крохмалю)

ISO 1666:1996 *Starch -- Determination of moisture content -- Oven-drying method* (Крохмаль – Визначення вмісту вологи—Метод висушування в печі))

ДСТУ ISO 5381-2001 Продукти гідролізу крохмалю. Метод визначання вмісту води. Модифікована методика Карла Фішера (ISO 5381:1983, IDT)

ISO 5381:1983 *Starch hydrolysis products -- Determination of water content -- Modified Karl Fischer method* (Продукти гідролізу крохмалю - - Визначення вмісту води – Модифікований метод Карла Фішера)

ISO 12779:2011 (IDF 227) *Lactose -- Determination of water content -- Karl Fischer method* (Лактоза – Визначення вмісту води- Метод Карла Фішера)

ISO 11214:1996 *Modified starch -- Determination of carboxyl group content of oxidized starch* (Модифікований крохмаль – Визначення вмісту карбоксильних груп окисненого крохмалю)

ISO 11213:1995 *Modified starch -- Determination of acetyl content -- Enzymatic method* (Модифікований крохмаль – Визначення вмісту ацетильних груп)

ДСТУ ISO 5377-2001 Продукти гідролізу крохмалю. Визначання відновлювальної здатності і декстрозного еквівалента. Метод Лейна і Ейнона з постійним титром (ISO 5377:1981, IDT)

ISO 5377:1981 *Starch hydrolysis products -- Determination of reducing power and dextrose equivalent -- Lane and Eynon constant titre method* (Продукти гідролізу крохмалю – Визначення відновлюючої здатності – Метод сталого титру за Лейном і Ейноном)

ДСТУ ISO 10504:2004 Продукти гідролізу крохмалю. Визначання складу глюкозних сиропів, фруктозних і гідрогенізованих глюкозних сиропів методом рідинної хроматографії високороздільної здатності (ISO 10504:2000, IDT)

ISO 10504:1998 *Starch derivatives -- Determination of the composition of glucose syrups, fructose syrups and hydrogenated glucose syrups -- Method using high-performance liquid chromatography* (Похідні крохмалю – Визначення складу таких сиропів, як: глюкозного, фруктозного та гідрогенізованої глюкози -- Метод з використанням високороздільної рідинної хроматографії)

ISO 11215:1998 *Modified starch -- Determination of adipic acid content of acetylated di-starch adipates -- Gas chromatographic method*. (Модифікований крохмаль – Визначення вмісту адипінової кислоти ацетильованих дикрохмальних адипатів – Метод газової хроматографії)

ISO 11216:1998 *Modified starch -- Determination of content of carboxymethyl groups in carboxymethyl starch*. (Модифікований крохмаль – Визначення вмісту карбоксиметильних груп у карбоксиметильованому крохмалі)

ISO 13965:1998 *Meat and meat products -- Determination of starch and glucose contents -- Enzymatic method* (М'ясо і м'ясні продукти – Визначення вмісту крохмалю і глюкози – Ензиматичний метод)

ISO 11543:2000 *Modified starch -- Determination of hydroxypropyl content -- Method using proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectrometry* (Модифікований крохмаль – Визначення вмісту гідроксопро-

пільних груп – Метод з використанням протонноядерномагнітнорезонансної спектроскопії)

Сахароза (*Sucrose*)

ДСТУ 3661-97 (ГОСТ 12571-98) Цукор. Метод визначення сахарози

ISO 2911:2004 (IDF 35: 2004) *Sweetened condensed milk -- Determination of sucrose content -- Polarimetric method* (Підсолоджене конденсоване молоко – Визначення вмісту сахарози-- Поляриметричний метод)

Глюкоза (*Glucose*)

ISO 15197:2003 *In vitro diagnostic test systems -- Requirements for blood-glucose monitoring systems for self-testing in managing diabetes mellitus* (Діагностичні тест-системи in vitro – Вимоги до моніторингових систем для самостійного визначення інсулін-залежними хворими на діабет)

ISO/IEEE 11073-10417:2010 *Health informatics -- Personal health device communication -- Part 10417: Device specialization -- Glucose meter* (Інформатика в охороні здоров'я - Особистий пристрій для визначення стану здоров'я - частина 10417: Пристрій спеціалізації – Глюкозометр)

ISO 1742:1980 *Glucose syrups -- Determination of dry matter -- Vacuum oven method* (Глюкозний сироп - Визначення сухої речовини - Метод вакуумної печі)

ISO 1743:1982 *Glucose syrup -- Determination of dry matter content -- Refractive index method* (Глюкозний сироп - Визначення вмісту сухої речовини - Метод показник заломлення)

ДСТУ ISO 5765-1:2005 (IDF 79-1:2002) Молоко сухе, суміші для морозива сухі та плавлений сир. Визначення вмісту лактози. Частина 1. Ферментний метод з використанням глюкозного компоненту лактози (ISO 5765-1:2002, IDT; IDF 79-1:2002)

ISO 5765-1:2002 (IDF 79-1: 2002) *Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese -- Determination of lactose content -- Part 1: Enzymatic method utilizing the glucose moiety of the lactose* (Сухе молоко сухі суміші для морозива і виготовлюваний сир – Визначення вмісту лактози – Частина 1: Ензиматичний метод утилізації залишку лактози – глюкози)

Лактоза (*Lactose*)

ДСТУ ISO 5765-2:2005 (IDF 79-2:2002) Молоко сухе, суміші для морозива сухі та плавлений сир. Визначення вмісту лактози. Частина 2. Ферментний метод з використанням галактозного компонента лактози (ISO 5765-2:2002, IDT; IDF 79-2:2002, IDT)

ISO 5765-2:2002 (IDF 79-2: 2002) *Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese -- Determination of lactose content -- Part 2: Enzymatic method utilizing the galactose moiety of the lactose* (Сухе молоко сухі суміші для морозива і виготовлюваний сир – Визначення вмісту лактози – Частина 2: Ензиматичний метод утилізації залишку лактози – галактози)

ISO 22662:2007 (IDF 198: 2007) *Milk and milk products -- Determination of lactose content by high-performance liquid chromatography* (Reference method) (Молоко і молочні продукти – Визначення вмісту лактози з допомогою високо роздільної рідинної хроматографії)

ISO 5548:2004 (IDF 106:2004) *Caseins and caseinates -- Determination of lactose content -- Photometric method* (Казеїни і казеїнати – Визначення вмісту лактози – Фотометричний метод)

ISO 26462:2010 (IDF 214:2010) *Milk -- Determination of lactose content -- Enzymatic method using difference in pH* (Молоко – Визначення вмісту лактози – Ензиматичний метод за використання відмінності в рН)

14.2. Жири (*Fats*)

ДСТУ 4349:2004 Олії. Методи відбирання проб (ISO 5555:1991, NEQ)

ДСТУ ISO 5555-2003 Жири тваринні і рослинні та олії. Відбирання проб (ISO 5555:1991, IDT)

ДСТУ ISO 542:2006 Насіння олійних культур. Методи відбирання проб (ISO 542:1990, IDT)

ДСТУ ISO 661:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Готування випробного зразка (ISO 661:2003, IDT)

ДСТУ ISO 664:2007 Насіння олійне. Виділення дослідного зразка з лабораторної проби (ISO 664:1990, IDT)

ДСТУ ISO 659:2007 Насіння олійне. Визначення вмісту олії (контрольний метод) (ISO 659:1998, IDT)

ДСТУ ISO 7302:2003 Зерно і зернові продукти. Визначання загального вмісту жиру (ISO 7302:1982, IDT)

ISO 2450:2008 (IDF 16: 2008) *Cream -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)* (Крем - Визначення вмісту жиру - Гравіметричний метод (контрольний метод))

ISO 8381:2008 (IDF 123: 2008) *Milk-based infant foods -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)* (Продукти дитячого харчування на основі молока - Визначення вмісту жиру - Гравіметричний метод (контрольний метод))

ДСТУ ISO 5543:2005 Казеїни та казеїнати. Гравіметричний метод визначення вмісту жиру (контрольний метод) (ISO 5543:1986, IDT)

ISO 5543:2004 (IDF 127: 2004) *Caseins and caseinates -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)* (Казеїн і казеїнати - Визначення вмісту жиру—Гравіметричний метод (контрольний метод))

ISO 17189:2003 (IDF 194: 2003) *Butter, edible oil emulsions and spreadable fats -- Determination of fat content (Reference method)* (Масло, харчові олії і жири (що намащуються) – Визначення вмісту жиру (контрольний метод))

ISO 1735:2004 (IDF 5: 2004) *Cheese and processed cheese products -- Determination of fat content -- Gravimetric method (Reference method)* (Сир і продукти переробки сиру - Визначення вмісту жиру - Гравіметричний метод (контрольний метод))

ДСТУ ISO 6320-2001 Жири та олії тваринні і рослинні. Визначення показника заломлення (ISO 6320:2000, IDT)

ISO 1739:2006 (IDF 7: 2006) *Butter -- Determination of the refractive index of the fat (Reference method)* (Масло вершкове - Визначення показника заломлення жиру (контрольний метод))

ДСТУ 3697-98 (ГОСТ 30588-98) (ISO 592:1981) Олії ефірні. Визначення оптичної активності

ДСТУ ISO 5511:2006 Насіння олійне. Визначення вмісту олії. Спектрометричний метод ядерного магнітного резонансу низької здатності з використанням безперервної хвилі (Швидкий метод) (ISO 5511:1992, IDT)

ДСТУ ISO 6800-2001 Жири та олії тваринні і рослинні. Визначення складу жирних кислот у 2-й позиції тригліцеридних молекул (ISO 6800:1997, IDT)

ДСТУ ISO 3961:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначання йодного числа (ISO 3961:1996, IDT)

ДСТУ 4569:2006 Жири тваринні і рослинні та олії. Методи визначання йодного числа

ISO 23065:2009 (IDF 211: 2009) *Milk fat from enriched dairy products -- Determination of omega-3 and omega-6 fatty acid content by gas-liquid chromatography* (Молочний жир зі збагачених молочних продуктів - Визначення вмісту омега-3 і омега-6 жирних кислот за допомогою газо-рідинної хроматографії)

ДСТУ ISO 7847:2006 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначання поліненасичених жирних кислот з цис-, цис-1,4-дієновою кислотою (ISO 7847:1987, IDT)

ISO 15884:2002 (IDF 182: 2002) *Milk fat -- Preparation of fatty acid methyl esters* (Жир молока – Виділення метилових естерів жирних кислот)

ISO 15885:2002 (IDF 184: 2002) *Milk fat -- Determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography* (Жир молока – Визначення жирнокислотного складу за допомогою газо-рідинної хроматографії)

ДСТУ 2727-94 (ГОСТ 30144-94) Олії ефірні та продукти ефіро-олійного виробництва. Метод визначення ефірного числа

ДСТУ ISO 1241-2002 Олії ефірні. Визначання ефірного числа до та після ацетилювання та оцінювання вмісту вільних і загальних спиртів (ISO 1241:1996, IDT)

ДСТУ ISO 875-2002 Олії ефірні. Оцінювання змішуваності з етанолом (ISO 875:1999, IDT)

ДСТУ ISO 1388-5:2004 Етанол для промислового використання. Методи випробування. Частина 5. Візуальний колориметричний метод. Визначання вмісту альдегідів (ISO 1388-5:1981, IDT)

ДСТУ ISO 1388-5:2004 Етанол для промислового використання. Методи випробування. Частина 5. Візуальний колориметричний метод. Визначання вмісту альдегідів (ISO 1388-5:1981, IDT)

ДСТУ ISO 1279:2006 Олії ефірні. Визначення карбонільного числа потенціометричними методами з використанням гідрохлориду гідроксиламіну (ISO 1279:1996, IDT)

ДСТУ ISO 1614-2003 Гліцерин технічний. Відбирання проб і методи випробування. Загальні вимоги (ISO 1614:1976, IDT)

ДСТУ ISO 1066:2004 Мило. Визначення вмісту гліцерину титриметричним методом (ISO 1066:1975, IDT)

ДСТУ ISO 3657:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення числа омилення (ISO 3657:2002, IDT)

ДСТУ ISO 1067:2004 Мило. Визначення неомильних, неомилених та омильних неомилених речовин (ISO 1067:1974, IDT)

ISO 28198:2009 *Vegetable fats and oils -- Determination of toluene insoluble matter* (Овочеві жири та олії – Визначення толуеннерозчинної речовини)

ДСТУ ISO 6799-2002 Жири та олії тваринні і рослинні. Визначення складу стеринової фракції. Газохроматографічний метод (ISO 6799:1991, IDT)

ДСТУ ISO 3594-2001 Жир молочний. Виявлення рослинного жиру методом газорідинної хроматографії стеринів (контрольний метод) (ISO 3594:1976, IDT)

ISO 12078:2006 (IDF 159: 2006) *Anhydrous milk fat -- Determination of sterol composition by gas liquid chromatography (Reference method)* (Безводний молочний жир - Визначення стерольного складу методом газо-рідинної хроматографії (контрольний метод))

ISO 18252:2006 (IDF 200: 2006) *Anhydrous milk fat -- Determination of sterol composition by gas liquid chromatography (Routine method)* (Безводний молочний жир - Визначення стерольного складу методом газо-рідинної хроматографії (стандартний метод))

ДСТУ 4570:2006 Жири рослинні та олії. Метод визначання пероксидного числа

ДСТУ ISO 3960-2001 Жири і олії тваринні і рослинні. Визначання пероксидного числа (ISO 3960:1998, IDT)

ДСТУ ISO 3976-2001 Жир молочний зневоднений. Визначання пероксидного числа (контрольний метод) (ISO 3976:1977, IDT)

ISO 3976:2006 (IDF 74: 2006) *Milk fat -- Determination of peroxide value* (Молочний жир - визначення пероксидного числа)

ДСТУ 4783:2007 Олії ефірні. Методи визначення перекисного числа

ДСТУ ISO 6886-2003 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначання стійкості до окиснювання (Прискорена проба на окиснюваність) (ISO 6886:1996, IDT)

ISO 27107:2008 *Animal and vegetable fats and oils -- Determination of peroxide value -- Potentiometric end-point determination* (Тваринні та рослинні жири і масла - Визначення перекисного числа - Потенціометричне визначення кінцевої точки)

ISO 3960:2007 *Animal and vegetable fats and oils -- Determination of peroxide value -- Iodometric (visual) endpoint determination* (Тваринні та рослинні жири і масла - Визначення перекисного числа - Йодометричне (візуальне) визначення кінцевої точки)

ДСТУ ISO 1740:2005 (IDF 6:2004) Жир молочний та масло. Визначення кислотності жиру (контрольний метод) (ISO 1740:2004, IDT; IDF 6:2004, IDT)

ISO 1740:2004 (IDF 6: 2004) *Milkfat products and butter -- Determination of fat acidity (Reference method)* (Молочні продукти і вершкове масло - Визначення кислотності жиру (контрольний метод))

ДСТУ ISO 729:2005 Насіння олійних культур. Визначення кислотності олії (ISO 729:1988, IDT)

ДСТУ 4350:2004 Олії. Методи визначання кислотного числа (ISO 660:1996, NEQ)

ДСТУ 2728-94 (ГОСТ 30143-94) Олії ефірні та продукти ефіро-олійного виробництва. Метод визначення кислотного числа

ISO/TS 22113:2012 (IDF RM 204) *Milk and milk products -- Determination of the titratable acidity of milk fat* (Молоко і молочні продукти - Визначення відтитрованої кислотності молочного жиру)

ISO 14156:2001 (IDF 172: 2001) *Milk and milk products -- Extraction methods for lipids and liposoluble compounds* (Молоко і молочні продукти - Екстракційні методи ліпідів і жиророзчинних сполук)

ISO/TS 17764-1:2002 *Animal feeding stuffs -- Determination of the content of fatty acids -- Part 1: Preparation of methyl esters* (Корми для тварин - Визначення вмісту жирних кислот - Частина 1: Підготовка метилових ефірів)

ISO/TS 17764-2:2002 *Animal feeding stuffs -- Determination of the content of fatty acids -- Part 2: Gas chromatographic method* (Корми для тварин - Визначення вмісту жирних кислот - Частина 2: Метод газової хроматографії)

ДСТУ ISO 9832:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення залишкового вмісту технічного гексану (ISO 9832:2002, IDT)

ISO 9832:2002 *Animal and vegetable fats and oils -- Determination of residual technical hexane content* (Тваринні та рослинні жири і масла - Визначення залишкового технічного вмісту гексану)

ДСТУ ISO 5508-2001 Жири та олії тваринні й рослинні. Аналізування методом газової хроматографії метилових ефірів жирних кислот (ISO 5508:1990, IDT)

ДСТУ ISO 5509-2002 Жири та олії тваринні і рослинні. Приготування метилових ефірів жирних кислот (ISO 5509:2000, IDT)

ISO 12966-3:2009 *Animal and vegetable fats and oils -- Gas chromatography of fatty acid methyl esters -- Part 3: Preparation of methyl esters using trimethylsulfonium hydroxide (TMSH)* (Тваринні та рослинні жири і масла - Газова хроматографія метилових ефірів жирних кислот - Частина 3: Виділення метилових ефірів за використання триметилсульфонія гідроксиду (TMSH))

ДСТУ ISO 5558:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначення та ідентифікування антиоксидантів. Метод тонкошарової хроматографії (ISO 5558:1982, IDT)

ISO 16532-1:2008 *Paper and board -- Determination of grease resistance -- Part 1: Permeability test* (Папір і картон - Визначення жирорезистентності - Частина 1: Тест на проникність)

14.3. Вітаміни (*Vitamins*)

ISO 12080-1:2009 (IDF 142-1:2009) *Dried skimmed milk -- Determination of vitamin A content -- Part 1: Colorimetric method* (Сухе знежирене молоко - Визначення вмісту вітаміну А – Частина 1: Колориметричний метод)

ISO 12080-2:2009 (IDF 142-2:2009) *Dried skimmed milk -- Determination of vitamin A content -- Part 2: Method using high-performance liquid chromatography* (Сухе знежирене молоко - Визначення вмісту вітаміну А – Частина 2: Метод з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії)

ISO 14565:2000 *Animal feeding stuffs -- Determination of vitamin A content -- Method using high-performance liquid chromatography* (Корми для тварин - Визначення вмісту вітаміну А – Метод з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії)

ДСТУ ISO 6558-2:2004 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначання вмісту каротину. Частина 2. Стандартні методи (ISO 6558-2:1992, IDT)

ISO 14892:2002 (IDF 177: 2002) *Dried skimmed milk -- Determination of vitamin D content using high-performance liquid chromatography* (Сухе знежирене молоко - Визначення вмісту вітаміну D з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії)

ISO 6867:2000 *Animal feeding stuffs -- Determination of vitamin E content -- Method using high-performance liquid chromatography* (Корми для тварин - Визначення вмісту вітаміну Е – Метод з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії)

ДСТУ ISO 9936:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначання вмісту токоферолів і токотриєнолів. Метод вискоєфективної рідинної хроматографії (ISO 9936:1997, IDT)

ДСТУ ISO 6867:2005 Корми для тварин. Методи визначення вмісту вітаміну Е з використанням вискоєфективної рідинної хроматографії (ISO 6867:2000, IDT)

ДСТУ 4687:2006 Комбікорми, премікси, вітамінні препарати, продукція птахівництва. Методи визначення вітамінів А, Е, В2 та каротиноїдів

ДСТУ 2117-93 Продукти переробки овочів та фруктів. Метод визначення вітаміну РР

14.4. Амінокислоти (*Amino acids*)

ISO/ASTM 51607:2004 *Practice for use of the alanine-EPR dosimetry system* (Практика використання системи аланін-EPR дозиметрії) (Аланін /*Alanine*)

ISO 13903:2005 *Animal feeding stuffs -- Determination of amino acids content* (Корми для тварин - Визначення вмісту амінокислот) (Аланін/ *Alanine*)

ДСТУ EN 1141:2005 Соки фруктові та овочеві. Визначення вмісту проліну спектрометричним методом (EN 1141:1994, IDT)

ДСТУ ISO 5510:2003 Корми для тварин. Визначання вмісту доступного лізину

ISO 5510:1984 *Animal feeding stuffs -- Determination of available lysine* (Корми для тварин. Визначання вмісту доступного лізину)

ISO 13903:2005 *Animal feeding stuffs -- Determination of amino acids content* (Корми для тварин - Визначення вмісту амінокислот) (*Leucine* / Лейцин)

ISO 13903:2005 *Animal feeding stuffs -- Determination of amino acids content* (Корми для тварин - Визначення вмісту амінокислот) (*Serine* / Серин)

ISO 13903:2005 *Animal feeding stuffs -- Determination of amino acids content* (Корми для тварин - Визначення вмісту амінокислот) (*Tyrosine* / Тирозин)

14.5. Протеїни (*Proteins*)

ISO 15323:2002 (IDF 173: 2002) *Dried milk protein products -- Determination of nitrogen solubility index* (Білкові продукти сухого молока - Визначення показника розчинності нітрогену)

ISO 12243:2003 *Medical gloves made from natural rubber latex -- Determination of water-extractable protein using the modified Lowry method* (Медичні рукавички з натурального гумового латексу - Визначення вмісту водорозчинного білка, який екстрагується водою, за допомогою модифікованого методу Лоурі)

ISO 21572:2004 *Foodstuffs -- Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products -- Protein based methods* (Продукти харчування - Методи виявлення генетично модифікованих організмів і похідних продуктів – Методи на основі досліджень білків)

ДСТУ ISO 8968-2:2005 (IDF 20-2:2001) Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 2. Метод із використанням блоку для спалювання (макрометод) (ISO 8968-2:2001, IDT; IDF 20-2:2001, IDT)

ДСТУ ISO 8968-3:2005 (IDF 20-3:2001) Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 3. Метод із використанням блоку для спалювання (прискорений напівмікрометод) (ISO 8968-3:2004, IDT; IDF 20-3:2004, IDT)

ДСТУ ISO 8968-4:2005 (IDF 20-4:2001) Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 4. Метод визначення небілкового азоту (ISO 8968-4:2001, IDT; IDF 20-4:2001, IDT)

ISO 8968-4:2001 (IDF 20-4: 2001) *Milk -- Determination of nitrogen content -- Part 4: Determination of non-protein-nitrogen content* (Молоко - Визначення вмісту азоту - Частина 4: Визначення вмісту небілкового азоту)

ДСТУ ISO 8968-5:2005 (IDF 20-5:2001) Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 5. Метод визначення білкового азоту (ISO 8968-5:2001, IDT; IDF 20-5:2001, IDT)

ISO 8968-5:2001 (IDF 20-5: 2001) *Milk -- Determination of nitrogen content -- Part 5: Determination of protein-nitrogen content* (Молоко - Визначення вмісту азоту - Частина 5: Визначення вмісту білкового азоту)

ДСТУ ISO 1871:2003 Продукти харчові сільськогосподарські. Загальні настанови щодо визначання вмісту азоту методом К'єльдаля (ISO 1871:1975, IDT)

ДСТУ ISO 8968-1:2005 (IDF 20-1:2001) Молоко. Визначення вмісту азоту. Частина 1. Метод К'єльдаля (ISO 8968-1:2001, IDT; IDF 20-1:2001, IDT)

ДСТУ ISO 937:2005 М'ясо та м'ясні продукти. Визначення вмісту азоту (контрольний метод) (ISO 937:1978, IDT)

ISO 20541:2008 (IDF 197: 2008) *Milk and milk products -- Determination of nitrate content -- Method by enzymatic reduction and molecular-absorption spectrometry after Griess reaction* (Молоко і молочні продукти - Визначення вмісту нітратів - Метод ферментативного відновлення і молекулярно-абсорбційної спектрометрії після реакції Грісса)

ДСТУ ISO 1594-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначання вмісту золи (ISO 1594:1977, IDT)

ДСТУ ISO 6654:2005 Корми для тварин. Визначення вмісту сечовини (ISO 6654:1991, IDT)

ДСТУ ISO 1592-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначання вмісту азоту. Титрометричний метод після дистилювання (ISO 1592:1977, IDT)

ДСТУ ISO 6655:2004 Корми для тварин. Визначення вмісту розчинного азоту після оброблення пепсином у розведеній соляній кислоті (ISO 6655:1997, IDT)

ДСТУ ISO 4274-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначання вмісту біурету. Методи полуменевої атомної та фотометричної абсорбції (ISO 4274:1977, IDT)

ДСТУ ISO 2754-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначання вмісту біурету. Фотометричний метод (ISO 2754:1973, IDT)

ДСТУ ISO 5983:2003 Корми для тварин. Визначання вмісту азоту і обчислювання вмісту сирого білка. Метод К'ельдаля (ISO 5983:1997, IDT)

ISO 5983-1:2005 *Animal feeding stuffs -- Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content -- Part 1: Kjeldahl method* (Корми для тварин. Визначання вмісту азоту і обчислювання вмісту сирого білка. Частина 1. Метод К'ельдаля)

ISO 20483:2006 *Cereals and pulses -- Determination of the nitrogen content and calculation of the crude protein content -- Kjeldahl method* (Зернові і бобові - Визначення вмісту азоту і розрахунок вмісту сирого протеїну – Метод К'ельдаля)

ISO 5983-1:2005 *Animal feeding stuffs -- Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content -- Part 1: Kjeldahl method* (Корми для тварин - Визначення вмісту азоту і розрахунок вмісту сирого протеїну - Частина 1: Метод К'ельдаля)

ISO/TS 17837:2008 (IDF/RM 25: 2008) *Processed cheese products -- Determination of nitrogen content and crude protein calculation -- Kjeldahl method* (Плавлені сирні продукти - Визначення вмісту азоту і підрахунок сирого протеїну - Метод К'єльдаля)

ISO 5983-2:2009 *Animal feeding stuffs -- Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content -- Part 2: Block digestion and steam distillation method* (Корми для тварин - Визначення вмісту азоту і розрахунок вмісту сирого протеїну - Частина 2: Блок травлення і метод перегонки з водяною парою)

ISO 5549:1978 *Caseins and caseinates -- Determination of protein content (Reference method)* (Казеїни і казеїнати - Визначення вмісту білка (контрольний метод))

ISO 17129:2006 (IDF 206: 2006) *Milk powder -- Determination of soy and pea proteins using capillary electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-CE) -- Screening method* (Сухе молоко - Визначення білка з сої та гороху за допомогою капілярного електрофорезу в присутності додецилсульфату натрію (SDS-CE) - Метод скринінгу)

14.6. Ензими (*Enzymes*)

ISO 14675:2003 (IDF 186: 2003) *Milk and milk products -- Guidelines for a standardized description of competitive enzyme immunoassays -- Determination of aflatoxin M1 content* (Молоко і молочні продукти - Вказівки щодо стандартизованого опису конкурентного ферментного імунологічного аналізу - Визначення вмісту афлатоксину М1)

ISO/TS 22939:2010 *Soil quality -- Measurement of enzyme activity patterns in soil samples using fluorogenic substrates in micro-well plates* (Якість ґрунту - Вимірювання спектру ензимної активності в пробах ґрунту з використанням флуорогенних субстратів у (мікро-лункових) мікропланшетних пластинах)

ISO 23893-1:2007 *Water quality -- Biochemical and physiological measurements on fish -- Part 1: Sampling of fish, handling and preservation of samples* (Якість води - Біохімічні та фізіологічні вимірювання на рибах – Частина 1: Приготування проб з риб, користування ними та їх збереження)

ISO/TS 23893-2:2007 *Water quality -- Biochemical and physiological measurements on fish -- Part 2: Determination of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)* (Якість води - Біохімічні та фізіологічні вимірювання на рибах - Частина 2: Визначення етоксирезоруфін-О-діетилази (EROD))

ISO 18153:2003 *In vitro diagnostic medical devices -- Measurement of quantities in biological samples -- Metrological traceability of values for catalytic concentration of enzymes assigned calibrators and control materials* (Медичне обладнання для діагностики *in vitro* - Вимірювання кількісних величин у біологічних пробах - Метрологічна простежуваність значень каталітичної концентрації ферментів, що є калібраторами і контрольними матеріалами)

ISO 18330:2003 (IDF 188: 2003) *Milk and milk products -- Guidelines for the standardized description of immunoassays or receptor assays for the detection of antimicrobial residues* (Молоко і молочні продукти - Вказівки щодо стандартизованого опису імунологічних або рецепторних аналізів для детекції антимікробних залишків)

ДСТУ ISO 5944:2005 (IDF 60:2001) Молоко і продукти на основі молока. Визначення кількості коагулазопозитивних стафілококів методом найімовірнішого числа (ISO 5944:2001, IDT; IDF 60:2001, IDT)

ISO 8870:2006 (IDF 83: 2006) *Milk and milk-based products -- Detection of thermonuclease produced by coagulase-positive staphylococci* (Молоко і молочні продукти - Виявлення термонуклеази, продукуюваної коагулазо-позитивними стафілококами)

ДСТУ IDF 83:2003 Молоко і молочні продукти. Стандартний метод визначання термонуклеази, продукованої коагулазопозитивними стафілококами у молоці та молочних продуктах (IDF 83:1978, IDT)

ISO 9308-2:2012 *Water quality -- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 2: Most probable number method* (Якість води - Перелік кишкової палички і бактерій групи кишкової палички - частина 2: Метод найбільш ймовірного числа)

ДСТУ ISO 5506-2003 Продукти з бобів сої. Визначання активності уреази (ISO 5506:1988, IDT)

14.7. Нуклеїнові кислоти (*Nucleic Acids*)

ДСТУ 2217-93 (ГОСТ 30130-94) Дезоксирибонуклеїнова кислота з тимусу молодняка великої рогатої худоби. Технічні умови

ISO 21569:2005 *Foodstuffs -- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- Qualitative nucleic acid based methods* (Продукти харчування - Методи аналізу для виявлення генетично модифікованих організмів і похідних продуктів - Якісні методи, засновані на дослідженнях нуклеїнової кислоти)

ISO 21571:2005 *Foodstuffs -- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- Nucleic acid extraction* (Продукти харчування - Методи аналізу для виявлення генетично модифікованих організмів і похідних продуктів – Екстракція нуклеїнових кислот)

ДСТУ 4517:2006 Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи виявлення контамінації сторонніми вірусами

ISO 22174:2005 *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens*

-- *General requirements and definitions* (Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин - Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) для виявлення харчових патогенних мікроорганізмів - Загальні вимоги та визначення)

ISO 24276:2006 *Foodstuffs -- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- General requirements and definitions* (Продукти харчування - Методи аналізу для виявлення генетично модифікованих організмів і похідних продуктів - Загальні вимоги та визначення)

ISO 20838:2006 *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens -- Requirements for amplification and detection for qualitative methods* (Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин - полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для виявлення харчових патогенних мікроорганізмів - Вимоги для ампліфікації і детекції якісними методами)

ISO 22119:2011 *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens -- General requirements and definitions* (Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин - У режимі реального часу полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) для виявлення харчових патогенних мікроорганізмів - Загальні вимоги та визначення)

ISO 22118:2011 *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of food-borne pathogens -- Performance characteristics* (Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин - полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для виявлення та кількісного визначення харчових патогенів - Технічні характеристики)

ISO 21570:2005 *Foodstuffs -- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products -- Quantitative*

nucleic acid based methods (Продукти харчування - Методи аналізу для виявлення генетично модифікованих організмів і похідних продуктів - Кількісні методи, засновані на дослідженні нуклеїнової кислоти)

ISO/TS 21098:2005 *Foodstuffs -- Nucleic acid based methods of analysis of genetically modified organisms and derived products -- Information to be supplied and procedure for the addition of methods to ISO 21569, ISO 21570 or ISO 21571* (Продукти харчування - Методи аналізу генетично модифікованих організмів і похідних продуктів (засновані на дослідженні нуклеїнової кислоти) – Інформація надається і вона є додатковою методикою для виконання ISO 21569, ISO 21570 або ISO 21571)

14.8. Вода і мінеральні речовини

ДСТУ ISO 3696-2003 Вода для застосовування в лабораторіях. Вимоги та методи перевіряння (ISO 3696:1987, IDT)

ДСТУ 4869:2007 Метрологія. Державна повірочна схема для засобів вимірювання рН

ДСТУ 4077-2001 Якість води. Визначання рН (ISO 10523:1994, MOD)

ДСТУ ISO 2917-2001 М'ясо та м'ясні продукти. Визначання рН (контрольний метод) (ISO 2917:1999, IDT)

ДСТУ EN 1132:2005 Соки фруктові та овочеві. Визначення рН (EN 1132:1994, IDT)

ДСТУ ISO 2365:2004 Амонію нітрат технічний. Визначання значень рН потенціометричним методом (ISO 2365:1972, IDT)

ДСТУ ISO 2752-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Вимірювання змінення рН у присутності формальдегіду. Потенціометричний метод (ISO 2752:1973, IDT)

ДСТУ ISO 5546:2005 Казеїн та казеїнати. Визначення рН (контрольний метод) (ISO 5546:1979, IDT)

ДСТУ EN 1262:2007 Речовини поверхнево-активні. Метод визначення рН розчинів чи дисперсій (EN 1262:2003, IDT)

ДСТУ ISO 2751-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначання буферної місткості. Потенціометричний метод (ISO 2751:1973, IDT)

ДСТУ ISO 1593-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначання лужності. Титрометричний метод (ISO 1593:1977, IDT)

ДСТУ ISO 5520:2007 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Методи визначення лужності загальної та водорозчинної золи (ISO 5520:1981, IDT)

ДСТУ ISO 9963-1:2007 Якість води. Визначення лужності. Частина 1. Визначення загальної та часткової лужності (ISO 9963-1:1994, IDT)

ДСТУ ISO 9963-2:2007 Якість води. Визначення лужності. Частина 2. Визначення карбонатної лужності (ISO 9963-2:1994, IDT)

ДСТУ ISO 1388-2:2003 Етанол для промислового використання. Методи випробовування. Частина 2. Визначання лужності та кислотності за допомогою фенолфталеїну (ISO 1388-2:1981, IDT)

ДСТУ ISO 6091:2007 Молоко сухе. Визначання титрованої кислотності (контрольний метод) (ISO 6091:1980, IDT)

ДСТУ ISO 6092:2007 Молоко сухе. Визначення титрової кислотності (рутинний метод) (ISO 6092:1980, IDT)

ДСТУ ISO 6632-2001 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначання легкої кислотності (ISO 6632:1981, IDT)

ДСТУ EN 1134:2005 Соки фруктові та овочеві. Визначення вмісту натрію, калію, кальцію та магнію спектрометричним методом атомної абсорбції (EN 1134:1994, IDT)

ДСТУ ISO 1738:2005 (IDF 12:2004) Масло вершкове. Визначення вмісту солі (контрольний метод) (ISO 1738:2004, IDT; IDF 12:2004, IDT)

ДСТУ ISO 6490-1:2004 Корми для тварин. Визначання вмісту кальцію. Частина 1. Титрометричний метод (ISO 6490-1:1985, IDT)

ДСТУ ISO 6058-2003 Якість води. Визначання кальцію. Титрометричний метод із застосуванням етилендіамінтетраоцтової кислоти (ISO 6058:1984, IDT)

ДСТУ ISO 2482-2001 Натрію хлорид технічний. Визначання вмісту кальцію та магнію. ЕДТА-комплексометричні методи (ISO 2482:1973, IDT)

ДСТУ ISO 6059-2003 Якість води. Визначання сумарного вмісту кальцію та магнію. Титрометричний метод із застосуванням етилендіамінтетраоцтової кислоти (ISO 6059:1984, IDT)

ДСТУ ISO 5517:2007 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту заліза фотометричним методом із застосуванням 1,10-фенантроліну (ISO 5517:1978, IDT)

ДСТУ ISO 6332:2003 Якість води. Визначання заліза. Спектрометричний метод із використанням 1,10-фенантроліну (ISO 6332:1988, IDT)

ДСТУ ISO 983-2001 Натрію гідроксид технічний. Фотометричний метод визначення вмісту заліза із застосуванням 1,10-фенантроліну

ДСТУ ISO 9526:2004 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначання вмісту заліза. Спектрометричний метод полуменевої атомної абсорбції (ISO 9526:1990, IDT)

ДСТУ ISO/R 1595-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначання вмісту заліза. Фотометричний метод із застосуванням 2,2'-біпіридилу (ISO/R 1595:1970, IDT)

ДСТУ ISO 8294:2004 Жири тваринні і рослинні та олії. Визначання вмісту міді, заліза і нікелю. Метод атомної абсорбції з використанням графітової печі (ISO 8294:1994, IDT)

ДСТУ ISO 7952:2004 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту міді спектрометричним методом полуменевої атомної абсорбції (ISO 7952:1994, IDT)

ДСТУ ISO 7110:2004 Амонію бікарбонат (амонію гідрокарбонат) технічний (зокрема для харчової промисловості). Визначання вмісту свинцю методом полуменевої атомної абсорбції (ISO 7110:1985, IDT)

ДСТУ ISO 6633-2001 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначання вмісту свинцю. Спектрометричний метод безполуменевої атомної абсорбції (ISO 6633:1984, IDT)

ISO 11212-3:1997 *Starch and derived products -- Heavy metals content -- Part 3: Determination of lead content by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization* (Крохмаль і його похідні. Вміст важких металів—Частина 3. Визначення вмісту свинцю за допомогою атомної абсорбційної спектрометрії з електротермальною атомізацією)

ДСТУ ISO 6561:2004 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначання вмісту кадмію. Спектрометричний метод безполуменевої атомної абсорбції (ISO 6561:1983, IDT)

ISO 11212-4:1997 *Starch and derived products -- Heavy metals content -- Part 4: Determination of cadmium content by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization* (Крохмаль і його похідні. Вміст важких металів—Частина 4. Визначення вмісту кадмію за допо-

могою атомної абсорбційної спектрометрії з електротермальною атомізацією)

ДСТУ ISO 6637-2001 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначання вмісту ртуті. Спектрометричний метод безполуменевої атомної абсорбції (ISO 6637:1984, IDT)

ISO 11212-2:1997 *Starch and derived products -- Heavy metals content -- Part 2: Determination of mercury content by atomic absorption spectrometry* (Крохмаль і його похідні. Вміст важких металів—Частина 2. Визначення вмісту ртуті за допомогою атомної абсорбційної спектрометрії)

ДСТУ ISO 6634:2004 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту миш'яку спектрометричним методом із застосуванням діетилдитіокарбамату (ISO 6634:1982, IDT)

ISO 11212-1:1997 *Starch and derived products -- Heavy metals content -- Part 1: Determination of arsenic content by atomic absorption spectrometry*. (Крохмаль і його похідні. Вміст важких металів—Частина 1. Визначення вмісту Арсену за допомогою атомної абсорбційної спектрометрії)

ДСТУ ISO 2447:2004 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначання вмісту олова (ISO 2447:1998, IDT)

ДСТУ ISO 6636-1:2007 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту цинку. Частина 1. Полярографічний метод (ISO 6636-1:1986, IDT)

ДСТУ ISO 6636-2:2004 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту цинку. Частина 2. Спектрометричний метод атомної абсорбції (ISO 6636-2:1981, IDT)

ДСТУ ISO 6636-3-2001 Продукти перероблення фруктів і овочів. Визначання вмісту цинку. Частина 3. Спектрометричний метод із застосуванням дитизону (ISO 6636-3:1983, IDT)

ДСТУ ISO 10304-1:2003 Якість води. Визначання розчинених фторид-, хлорид-, нітрит-, ортофосфат-, бромід-, нітрат- і сульфат-іонів методом рідкої хроматографії. Частина 1. Метод для слабкозабруднених вод (ISO 10304-1:1992, IDT)

ДСТУ ISO 10304-2:2003 Якість води. Визначання розчинених аніонів методом рідинного іонного хроматографування. Частина 2. Визначання броміду, хлориду, нітрату, нітриту, ортофосфату та сульфату в стічних водах (ISO 10304-2:1995, IDT)

ДСТУ ISO 10304-3:2003 Якість води. Визначання розчинених аніонів методом рідинного іонного хроматографування. Частина 3. Визначання хромату, йодиду, сульфїту, тіоціанату і тіосульфату (ISO 10304-3:1997, IDT)

ДСТУ ISO 2481-2001 Натрію хлорид технічний. Визначання галогенів у перераховуванні на хлор. Меркуриметричний метод (ISO 2481:1973, IDT)

ДСТУ ISO 10304-4:2003 Якість води. Визначання розчинених аніонів методом рідинного іонного хроматографування. Частина 4. Визначання хлорату, хлориду і хлориту у воді з низьким рівнем забрудненості (ISO 10304-4:1997, IDT)

ДСТУ ISO 9297:2007 Якість води. Визначення хлоридів. Титрування нітратом срібла із застосуванням хромату як індикатора (метод Мора) (ISO 9297:1989, IDT)

ДСТУ ISO 3695:2004 Амонію нітрат технічний. Визначання вмісту іонів хлориду потенціометричним методом (ISO 3695:1977, IDT)

ДСТУ ISO 5943/IDF 88:2007 Сир та сири плавлені. Визначення вмісту хлориду. Метод потенціометричного титрування (ISO 5943:2004, IDT)

ДСТУ ISO 457:2007 Мила. Визначення вмісту хлориду титрометричним методом (ISO 457:1983, IDT)

ДСТУ ISO 1841-1:2004 М'ясо та м'ясні продукти. Визначання вмісту хлоридів. Частина 1. Метод Волхарда (ISO 1841-1:1996, IDT)

ДСТУ ISO 1841-2:2004 М'ясо та м'ясні продукти. Визначання вмісту хлоридів. Частина 2. Потенціометричний метод (ISO 1841-2:1996, IDT)

ДСТУ ISO 7393-1:2003 Якість води. Визначання незв'язаного хлору та загального хлору. Частина 1. Титрометричний метод із застосуванням N,N-діетил-1,4-фенілендіаміну (ISO 7393-1:1985, IDT)

ДСТУ ISO 7393-2:2004 Якість води. Визначання незв'язаного та загального хлору. Частина 2. Колориметричний метод із застосуванням N,N-діетил-1,4-фенілендіаміну для поточного контролювання (ISO 7393-2:1985, IDT)

ДСТУ ISO 7393-3:2004 Якість води. Визначення незв'язаного хлору та загального хлору. Частина 3. Метод йодометричного титрування для визначення загального хлору (ISO 7393-3:1990, IDT)

ДСТУ ISO 6495:2005 Додатки кормові для тварин. Методи визначення вмісту водорозчинних хлоридів (ISO 6495:1999, IDT)

ДСТУ ISO 981:2001 Натрію гідроксид технічний. Меркуриметричний метод визначення вмісту хлоридів

ДСТУ ISO 979:2001 Натрію гідроксид технічний. Метод визначення лужності

ДСТУ ISO 6468:2002 Якість води. Визначення вмісту окремих хлорорганічних інсектицидів, поліхлорованих біфенілів та хлорбен-

золів. Метод газової хроматографії після екстракції типу "рідина-рідина" (ISO 6468:1996, IDT)

ДСТУ ISO 6635:2004 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту нітратів та нітритів спектрометричним методом молекулярної абсорбції (ISO 6635:1984, IDT)

ДСТУ ISO 7890-1:2003 Якість води. Визначання нітрату. Частина 1. Спектрометричний метод із застосуванням 2,6-диметилфенолу (ISO 7890-1:1986, IDT)

ДСТУ ISO 7890-2:2003 Якість води. Визначання нітрату. Частина 2. Спектрометричний метод із застосуванням перегнаного 4-фторофенолу (ISO 7890-2:1986, IDT)

ДСТУ ISO 2918:2005 М'ясо та м'ясні продукти. Метод визначення загального вмісту нітриту (контрольний метод) (ISO 2918:1975, IDT)

ДСТУ ISO 6777:2003 Якість води. Визначання нітритів. Спектрометричний метод молекулярної абсорбції (ISO 6777:1984, IDT)

ДСТУ ISO 7150-1-2003 Якість води. Визначання амонію. Частина 1. Ручний спектрометричний метод (ISO 7150-1:1984, IDT)

ДСТУ ISO 7150-2-2003 Якість води. Визначання амонію. Частина 2. Автоматичний спектрометричний метод (ISO 7150-2:1986, IDT)

ДСТУ ISO 6778:2003 Якість води. Визначання амонію. Потенціометричний метод (ISO 6778:1984, IDT)

ДСТУ ISO 6703-1:2007 Якість води. Визначення ціанідів. Частина 1. Визначення загального вмісту ціанідів (ISO 6703-1:1984, IDT)

ДСТУ ISO 6703-2:2007 Якість води. Визначення ціанідів. Частина 2. Визначення легковивільнюваних ціанідів (ISO 6703-2:1984, IDT)

ДСТУ ISO 6703-3:2007 Якість води. Визначення ціанідів. Частина 3. Визначення хлориду ціану (ISO 6703-3:1984, IDT)

ДСТУ ISO 6228:2003 Продукти хімічні технічні. Загальний метод визначення слідів сполук сірки, у формі сульфату, відновленням і титруванням (ISO 6228:1980, IDT)

ДСТУ ISO 6878-2003 Якість води. Визначення фосфору. Спектрометричний метод із застосуванням молібдату амонію (ISO 6878:1998, IDT)

ДСТУ ISO 2294:2005 М'ясо та м'ясні продукти. Метод визначення загального вмісту фосфору (контрольний метод) (ISO 2294:1974, IDT)

ДСТУ ISO 2962:2005 Сири і плавлені сири. Визначення вмісту загального фосфору спектрометричним методом молекулярної абсорбції (ISO 2962:1984, IDT)

ДСТУ ISO 9874:2005 Молоко. Визначення вмісту загального фосфору методом спектрометричної молекулярної абсорбції (ISO 9874:1992, IDT)

ДСТУ ISO 6491:2004 Корми для тварин. Визначення вмісту фосфору. Спектрометричний метод (ISO 6491:1998, IDT)

ДСТУ EN 1136:2005 Соки фруктові та овочеві. Визначення вмісту фосфору спектрометричним методом (EN 1136:1994, IDT)

ДСТУ ISO 5553:2005 М'ясо та м'ясні продукти. Виявлення поліфосфатів (ISO 5553:1980, IDT)

ДСТУ ISO 906-2001 Кислота соляна технічна. Гравіметричний метод визначення сульфатів у перерахунку на сульфат барію

ДСТУ ISO 2480-2001 Натрію хлорид технічний. Гравіметричний метод визначання вмісту сульфату у вигляді сульфату барію (ISO 2480:1972, IDT)

ДСТУ ISO 908-2001 Кислота соляна технічна. Титриметричний метод визначення вмісту окиснювальних або відновлювальних речовин

ДСТУ ISO 910-2002 Кислота сірчана (сульфатна) та олеум технічні. Визначання загальної кислотності та розрахунок вмісту вільного триоксиду сірки в олеумі. Титрометричний метод (ISO 910:1977, IDT)

ДСТУ ISO 5522:2004 Фрукти, овочі та продукти перероблення. Визначення загального вмісту сірчистого ангідриду (ISO 5522:1981, IDT)

ДСТУ ISO 911-2002 Кислота сірчана (сульфатна) технічна. Визначання концентрації сірчаної (сульфатної) кислоти за допомогою вимірювання густини

ДСТУ ISO 5523:2007 Продукти плодоовочеві рідинні. Визначення вмісту діоксиду сірки загальним методом (ISO 5523:1981, IDT)

ДСТУ ISO 913-2002 Кислота сірчана (сульфатна) та олеум технічні. Визначання вмісту золи. Гравіметричний метод (ISO 913:1977, IDT)

ДСТУ ISO 914-2002 Кислота сірчана (сульфатна) та олеум технічні. Визначання загального вмісту азоту. Титрометричний метод після відганяння (ISO 914:1977, IDT)

ДСТУ ISO 6638-1:2007 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту мурашиної кислоти. Частина 1. Гравіметричний метод (ISO 6638-1:1985, IDT)

ДСТУ ISO 6638-2:2007 Фрукти, овочі та продукти їх перероблення. Визначення вмісту мурашиної кислоти. Частина 2. Титриметричний метод (ISO 6638-2:1984, IDT)

ДСТУ EN 1133:2005 Соки фруктові та овочеві. Визначення формольного числа (EN 1133:1994, IDT)

ДСТУ ISO 1446:2004 Кава зелена. Основний метод визначання вмісту води (ISO 1446:2001, IDT)

ДСТУ ISO 2753-2003 Сечовина (карбамід) технічна. Визначання вмісту води. Метод Карла Фішера (ISO 2753:1973, IDT)

ДСТУ ISO 1442:2005 М'ясо та м'ясні продукти. Метод визначення вмісту вологи (контрольний метод) (ISO 1442:1997, IDT)

ДСТУ ISO 6540:2007 Кукурудза. Визначення вмісту вологи (в цілих та подрібнених зернах) (ISO 6540:1980, IDT)

ДСТУ ISO 2291:2007 Какао-боби. Визначення вмісту вологи. Стандартний метод (ISO 2291:1980, IDT)

ДСТУ 3659-97 (ГОСТ 12570-98) Цукор. Метод визначення вологи та сухих речовин

ДСТУ ISO 6496:2005 Корми для тварин. Визначання вмісту вологи та інших летких речовин (ISO 6496:1999, IDT)

ДСТУ 2439-94 Елементи хімічні та речовини прості. Терміни та визначення основних понять. Умовні позначення

ДСТУ 2216-93 Реактиви та особливо чисті речовини. Позначення та методи визначення чистоти. Терміни та визначення

ДСТУ ISO 1042:2005 Посуд лабораторний скляний. Колби мірні з однією позначкою (ISO 1042:1998, IDT)

ДСТУ 2725-94 Матеріали магнітні. Терміни та визначення

ДСТУ EN 1040:2004 Засоби хімічні дезінфекційні та антисептичні. Основна бактерицидна активність. Частина 1. Метод випробування та вимоги (стадія 1) (EN 1040:1997, IDT)

ДСТУ EN 1275:2004 Засоби хімічні дезінфекційні і антисептичні. Основна фунгіцидна активність. Метод випробування та вимоги (стадія 1) (EN 1275:1997, IDT)

ISO 15883-1:2006 *Washer-disinfectors -- Part 1: General requirements, terms and definitions and tests* (Мийки-дезінфектори - Частина 1: Загальні вимоги, терміни та визначення і випробування)

ISO 15883-2:2006 *Washer-disinfectors -- Part 2: Requirements and tests for washer-disinfectors employing thermal disinfection for surgical instruments, anaesthetic equipment, bowls, dishes, receivers, utensils, glassware, etc.* (Мийки-дезінфектори - Частина 2: Вимоги та випробування мийок-дезінфекторів із використанням термічної дезінфекції хірургічних інструментів, анестезіологічного обладнання, мисок, тарілок, приймачів, посуду, виробів зі скла, і т.д.)

14.9. Загальні документи

ДСТУ IWA 1:2007 Системи управління якістю. Настанови щодо поліпшування процесів в організаціях охорони здоров'я (IWA 1:2005, IDT)

ДСТУ 1.0-2003 Національна стандартизація. Основні положення

ДСТУ 1.1-2001 Національна стандартизація. Стандартизація та суміжні види діяльності. Терміни та визначення основних понять

ДСТУ ГОСТ 1.1:2005 Міждержавна система стандартизації. Терміни і визначення (ГОСТ 1.1-2002, IDT)

ДСТУ 1.2-2003 Національна стандартизація. Правила розроблення національних нормативних документів

ДСТУ 1.3:2004 Національна стандартизація. Правила побудови, викладання, оформлення, погодження, прийняття та позначання технічних умов

ДСТУ ГОСТ 1.3:2005 Міждержавна система стандартизації. Правила і методи прийняття міжнародних і регіональних стандартів як міждержавних стандартів (ГОСТ 1.3-2002, IDT)

ДСТУ 1.5-2003 Національна стандартизація. Правила побудови, викладання, оформлення та вимоги до змісту нормативних документів (ISO/IEC Directives, part 2, 2001, NEQ)

ДСТУ ГОСТ 1.5:2004 Міждержавна система стандартизації. Стандарти міждержавні, правила та рекомендації з міждержавної стандартизації. Загальні вимоги до побудови, викладу, оформлення, змісту та позначень (ГОСТ 1.5-2001, IDT)

ДСТУ 1.6:2004 Національна стандартизація. Правила реєстрації нормативних документів

ДСТУ 1.7-2001 Національна стандартизація. Правила і методи прийняття та застосування міжнародних і регіональних стандартів (ISO/IEC Guide 21:1999, NEQ)

ДСТУ 1.10:2005 Національна стандартизація. Правила розроблення, побудови, викладання, оформлення, ведення національних класифікаторів

ДСТУ 1.11:2004 Національна стандартизація. Правила проведення експертизи проектів національних нормативних документів

ДСТУ 1.12:2004 Національна стандартизація. Правила ведення справ нормативних документів

ДСТУ 1.13-2001 Національна стандартизація. Правила надавання повідомлень торговим партнерам України

ДСТУ-П IWA 2:2007 Системи управління якістю. Настанови щодо застосування ISO 9001:2000 у сфері освіти (IWA 2:2003, IDT)

ДСТУ OIML D 2:2007 Метрологія. Узаконені одиниці фізичних величин (OIML D 2:1999, IDT)

ДСТУ-П IWA 4:2006 Системи управління якістю. Настанови щодо застосування ISO 9001:2000 в суб'єктах місцевого самоврядування (IWA 4:2005, IDT)

ДСТУ OIML D 5:2007 Метрологія. Повірочні схеми для засобів вимірювальної техніки. Правила розроблення (OIML D 5:1982, IDT)

ДСТУ ГОСТ 7.1:2006 Система стандартів з інформації, бібліотечної та видавничої справи. Бібліографічний запис. Бібліографічний опис. Загальні вимоги та правила складання (ГОСТ 7.1-2003, IDT)

ДСТУ ГОСТ 7.22:2004 Система стандартів з інформації, бібліотечної та видавничої справи. Промислові каталоги. Загальні вимоги (ГОСТ 7.22-2003, IDT)

ДСТУ ГОСТ 7.28:2004 (ИСО 5426-83, ИСО 5426-2-96) Система стандартів з інформації, бібліотечної та видавничої справи. Розширений набір символів латинської абетки для обміну інформацією (ГОСТ 7.28-2002 (ИСО 5426-83, ИСО 5426-2-96), IDT)

ДСТУ ГОСТ 7.50:2006 Система стандартів з інформації, бібліотечної та видавничої справи. Консервація документів. Загальні вимоги (ГОСТ 7.50-2002, IDT)

ДСТУ ГОСТ 7.51:2003 Система стандартів з інформації, бібліотечної та видавничої справи. Картки для каталогів і картотек. Каталогізація у виданні. Склад, структура даних та видавниче оформлення (ГОСТ 7.51-98, IDT)

ДСТУ ГОСТ 7.59:2003 (ИСО 5963-85) Система стандартів з інформації, бібліотечної та видавничої справи. Індекссування документів. Загальні вимоги до систематизації та предметизації (ГОСТ 7.59-2003 (ИСО 5963-85), IDT)

ДСТУ ГОСТ 7.71:2003 (ИСО 6862-96) Система стандартів з інформації, бібліотечної та видавничої справи. Набір закодованих математичних знаків для обміну бібліографічною інформацією (ГОСТ 7.71-96 (ИСО 6862-96), IDT)

ДСТУ ГОСТ 7.80:2007 Система стандартів з інформації, бібліотечної та видавничої справи. Бібліографічний запис. Заголовок. Загальні вимоги та правила складання (ГОСТ 7.80-2000, IDT)

ДСТУ ГОСТ 7.85:2003 (ИСО 10444-94) Система стандартів з інформації, бібліотечної та видавничої справи. Міжнародний стандартний номер технічного звіту (ГОСТ 7.85-2003 (ИСО 10444-94), IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.024:2004 Метрологія. Державна повірочна схема для засобів вимірювання густини (ГОСТ 8.024-2002, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.106-2003 Метрологія. Державна повірочна схема для засобів вимірювання енергетичної яскравості і сили випромінення теплових джерел з температурою від 220 до 1360 К (ГОСТ 8.106-2001, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.259:2007 Метрологія. Лічильники електричні індукційні активної та реактивної енергії. Методика повірки (ГОСТ 8.259:2004, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.338:2004 Метрологія. Перетворювачі термоелектричні. Методика повірки (ГОСТ 8.338-2002, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.516:2003 Метрологія. Державна повірочна схема для засобів вимірювання твердості металів за шкалою твердості Шора D (ГОСТ 8.516-2001, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.531-2003 Метрологія. Стандартні зразки складу монолітних та дисперсних матеріалів. Способи оцінювання однорідності (ГОСТ 8.531-2002, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.532-2003 Метрологія. Стандартні зразки складу речовин і матеріалів. Міжлабораторна метрологічна атестація. Зміст і порядок проведення робіт (ГОСТ 8.532-2002, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.552-2003 Метрологія. Державна повірочна схема для засобів вимірювання потоку випромінення та енергетичної освітленості в діапазоні довжин хвиль від 0,03 до 0,40 мкм (ГОСТ 8.552-2001, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.569:2003 Метрологія. Ватметри надвисокочастотні малої потужності діапазону частот 0,02-178,6 ГГц. Методика повірки та калібрування (ГОСТ 8.569-2000, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.576:2003 Метрологія. Державна повірочна схема для засобів вимірювання потоку електронів, густини потоку електронів та флюенса (переносу) електронів, потоку енергії, густини потоку енергії та флюенса (переносу) енергії електронного та гальмівного випромінень (ГОСТ 8.576-2001, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.577:2004 Метрологія. Державна повірочна схема для засобів вимірювання лінійних пришвидшень та плаского кута в разі кутового переміщування твердого тіла (ГОСТ 8.577-2002, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.581:2004 Метрологія. Джерела альфа-випромінення радіометричні еталонні. Методика повірки (ГОСТ 8.581-2003, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.582:2004 Метрологія. Джерела бета-випромінення радіометричні еталонні. Методика повірки (ГОСТ 8.582-2003, IDT)

ДСТУ ГОСТ 8.586.1:2007 (ИСО 5167-1:2003) Метрологія. Вимірювання витрати та кількості рідини і газу із застосуванням стандартних звужувальних пристроїв. Частина 1. Принцип методу вимірювання та загальні вимоги (ГОСТ 8.586.1-2005 (ИСО 5167-1:2003), IDT; ISO 5167-1:2003, NEQ)

ДСТУ ГОСТ 8.586.2:2007 (ИСО 5167-2:2003) Метрологія. Вимірювання витрати та кількості рідини і газу із застосуванням стандартних звужувальних пристроїв. Частина 2. Діафрагми. Технічні вимоги (ГОСТ 8.586.2-2005 (ИСО 5167-2:2003), IDT; ISO 5167-2:2003,

NEQ)

ДСТУ ГОСТ 8.586.3:2007 (ИСО 5167-3:2003) Метрологія. Вимірювання витрати та кількості рідини і газу із застосуванням стандартних звужувальних пристроїв. Частина 3. Сопла та сопла Вентурі. Технічні вимоги (ГОСТ 8.586.3-2005 (ИСО 5167-3:2003), IDT; ISO 5167-3:2003, NEQ)

ДСТУ ГОСТ 8.586.4:2007 (ИСО 5167-4:2003) Метрологія. Вимірювання витрати та кількості рідини і газу із застосуванням стандартних звужувальних пристроїв. Частина 4. Труби Вентурі. Технічні вимоги (ГОСТ 8.586.4-2005 (ИСО 5167-4:2003), IDT; ISO 5167-4:2003, NEQ)

ДСТУ ГОСТ 8.586.5:2007 Метрологія. Вимірювання витрати та кількості рідини і газу із застосуванням стандартних звужувальних пристроїв. Частина 5. Методика виконання вимірювань (ГОСТ 8.586.5-2005, IDT)

ДСТУ ГОСТ 9.101:2004 Єдина система захисту від корозії та старіння. Основні положення (ГОСТ 9.101-2002, IDT)

ДСТУ-Н ПМГ 22:2005 Правила розроблення програми робіт з міждержавної стандартизації (ПМГ 22-2004, IDT)

ДСТУ-Н РМГ 34:2006 Метрологія. Порядок актуалізації реєстру міждержавних стандартних зразків (РМГ 34-2001, IDT)

ДСТУ-Н ISO Guide 34:2006 Загальні вимоги до компетентності виробників стандартних зразків (ISO Guide 34:2000, IDT)

ДСТУ-Н ISO Guide 35:2006 Атестація стандартних зразків. Загальні та статистичні принципи (ISO Guide 35:1989, IDT)

ДСТУ ISO 35:2007 Латекс натурального каучуку концентрований. Метод визначення механічної стабільності (ISO 35:2004, IDT)

ДСТУ ISO 36:2007 Каучук вулканізований або термопластичний. Метод визначення зчеплення з текстильним матеріалом (ISO 36:2005, IDT)

ДСТУ-Н ISO/IEC Guide 37:2005 Настанови щодо використання продукції широкого вжитку (ISO/IEC Guide 37:1995, IDT)

ДСТУ ISO/IEC Guide 51-2002 Аспекти безпеки. Настанови щодо їх включення до стандартів (ISO/IEC Guide 51:1999, IDT)

ДСТУ-Н РМГ 51:2006 Метрологія. Документи до методик повірки засобів вимірювання. Основні положення (РМГ 51-2002, IDT)

ДСТУ ISO/IEC Guide 51-2002 Аспекти безпеки. Настанови щодо їх включення до стандартів (ISO/IEC Guide 51:1999, IDT)

ДСТУ-Н РМГ 51:2006 Метрологія. Документи до методик повірки засобів вимірювання. Основні положення (РМГ 51-2002, IDT)

ДСТУ ISO 446:2007 Мікрографія. Знак ISO та тест-об'єкт читаності ISO № 1. Описування та використання (ISO 446:2004, IDT)

ДСТУ ISO 10005:2007 Системи управління якістю. Настанови щодо програм якості (ISO 10005:2005, IDT)

ДСТУ ISO 10006:2005 Системи управління якістю. Настанови щодо управління якістю в проектуванні (ISO 10006:2003, IDT)

ДСТУ ISO 10007:2005 Системи управління якістю. Настанови щодо управління конфігурацією (ISO 10007:2003, IDT)

ДСТУ ISO 10012:2005 Системи управління вимірюваннями. Вимоги до процесів вимірювання та вимірювального оснащення (ISO 10012:2003, IDT)

ДСТУ ISO/TR 10013:2003 Настанови з розроблення документації системи управління якістю (ISO/TR 10013:2001, IDT)

ДСТУ ISO/IEC TR 10000-1:2004 Інформаційні технології. Основи та таксономія міжнародних стандартизованих профілів. Частина 1. Загальні принципи та основи документування (ISO/IEC TR 10000-1:1998, IDT)

ДСТУ ISO/IEC TR 10000-2:2004 Інформаційні технології. Основи та таксономія міжнародних стандартизованих профілів. Частина 2. Принципи та таксономія OSI профілів (ISO/IEC TR 10000-2:1998, IDT)

ДСТУ ISO/IEC TR 10000-3:2004 Інформаційні технології. Основи та таксономія міжнародних стандартизованих профілів. Частина 3. Принципи та таксономія профілів середовищ відкритих систем (ISO/IEC TR 10000-3:1998, IDT)

ДСТУ 4759:2007 Мікробіологія ветеринарної медицини. Терміни та визначення основних понять

ДСТУ 4760:2007 Біотехнологія ветеринарної медицини. Терміни та визначення

ДОДАТКИ

Додаток 1. Приготування реактивів до лабораторних робіт

1. Реактив Фелінга. Готується в такий спосіб:

Розчин №1. 34,65г невивітрених кристалів $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ розчиняють у мірній колбі на 500cm^3 спочатку у невеликій кількості дистильованої води, а після розчинення кристалів доводять до мітки.

Розчин № 2. 173г виннокам'яно-калієво-натрієвої солі (сегнетова сіль) розчиняють у мірній колбі на 500cm^3 у невеликій кількості дистильованої води, додають 62,5г натрій гідроксиду, розчиненого у 100cm^3 дистильованої води. Розчини добре перемішують і доводять водою до мітки.

Перед уживанням розчини № 1 і 2 змішують у рівних об'ємах. При цьому утворюється водорозчинний синього кольору комплексний купрум тартрат.

2. Реактив Ніландера готується в такий спосіб: 2г $\text{Bi}(\text{OH})_2\text{NO}_3$ і 4г сегнетової солі розчиняють у $100,0\text{cm}^3$ розчину NaOH ($\omega=10\%$) і кип'ятять поки розчиниться більша частина солі Бісмуту.

3. Розчин Люголя: Калій йодид масою 3г розчиняють у 70cm^3 дистильованої води у мірній колбі на 100cm^3 , додають 0,3г розтертого в ступці йоду і після розчинення йоду доводять водою до риски, перемішують. Розчин зберігають у темному місці.

4. Приготування розчину хлораміну Т ($C(1/6)\approx 0,12$ моль/ дм^3). Хлорамін Т масою 15г розчиняють у воді, переносять у мірну колбу на 1дм^3 , доводять дистильованою водою до риски, ретельно перемішують

і фільтрують крізь вату у склянку з темного скла з притертим скляним корком.

5. *Приготування розчину натрій молібдату* ($\omega=10\%$). Кристалічний $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ масою 11,2г розчиняють у 88,8см³ дистильованої води, додають 0,5см³ розчину натрій гідроксиду ($c=0,2$ моль/дм³), кип'ячать протягом 15 хвилин, потім охолоджують, доводять безамоніачною водою до 88,8см³ і зберігають в добре закритій склянці з притертим корком.

6. *Кристалічний калій сульфат* (без домішок NH_4^+). Калій сульфат х.ч. масою 200г вносять у стакан ємністю 2дм³, додають 1дм³ дистильованої води і 5см³ розчину калій гідроксиду ($\omega=20\%$). Суміш кип'ячать до тих пір, доки розчин не помутніє від солі, що випадає у осад. Розчин переносять у фарфорову чашку і випарюють до об'єму близько 100см³, потім охолоджують, прозорий розчин зливають, а залишок висушують при слабкому нагріванні і постійному перемішуванні. Суху сіль вміщують у банку з притертим корком.

7. *Приготування фосфатного буферного розчину* (рН 6,7) з калій бромідом. Висушений при 100°C KH_2PO_4 масою 52,8г і 100г КВг розчиняють разом обидві солі в безамоніачній воді, додають 80см³ розчину натрій гідроксиду ($c=2,0$ моль/дм³), доводять безамоніачною водою до 1дм³, перемішують.

8. *Приготування розчину крохмального субстрату* для визначення активності амілази у сироватці крові

У хімічний стакан об'ємом 200см³ вносять 20см³ розчину натрій хлориду ($c=0,5$ моль/дм³) і 50-60см³ дистильованої води. Нагрівають до кипіння. Окремо у хімічному стакані суспендують у холодній воді

розчинний крохмаль масою 1г. Суспензію крохмалю виливають у киплячий розчин, стакан, де був крохмаль, декілька разів ополіскують водою, води додають у киплячий розчин. Кип'ять крохмаль протягом 1 хвилини. Охолоджують. Вміст колби кількісно переносять у мірну колбу на 100см^3 , доводять об'єм дистильованою водою до 100см^3 , перемішують. В 1см^3 отриманого розчину міститься 10мг крохмалю.

9. Приготування вихідних розчинів для полімеризації гелю

Розчин №1 (рН 8,9)

Розчин хлоридної кислоти ($c=1,0\text{моль/дм}^3$) 48см^3 ;

Трисоксиметиламінометан— $36,6\text{г}$;

N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін— $0,23\text{ см}^3$;

Вода дистильована – до 100см^3 .

Розчин №2

Акриламід – 28г ; N,N'-метилен-біс-акриламід – $0,735\text{г}$; Вода дистильована – до 100 см^3 .

Розчин №3

Амоній пентаоксидсульфат $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_5$ – $0,14\text{г}$; Вода дистильована – до 100см^3 .

Розчин №4 (рН 6,9)

Розчин хлоридної кислоти ($c=1,0\text{моль/дм}^3$) – 48см^3 ;

Трис-оксиметиламінометан – $5,98\text{г}$;

N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін – $0,46\text{ см}^3$;

Вода дистильована – до 100см^3 .

Розчин №5

Акриламід – 10г ; N,N'-метилен-біс-акриламід – $2,5\text{г}$; Вода дистильована – до 100 см^3 .

Розчин №6

Рибофлавін – 0,004г; Вода дистильована – до 100см³.

Буферна система для електродних стаканів (рН 8,3)

Трис-оксиметиламінометан – 0,6г; Гліцин – 2,9г; Вода дистильована – до 100см³.

Антиконвекційне середовище

Розчин №4. Розчин сахарози ($\omega=40\%$) – 1см³; Сироватка крові – 0,1см³.

10. Приготування розчину NaBrO для лабораторної роботи „Якісні реакції на амінокислоти і білки”

Бром масою 1г розчиняють при охолодженні льодом у 50см³ натрій гідроксиду ($\omega=5\%$). Зберігають при охолодженні протягом двох тижнів.

11. Приготування реактивів для визначення активності лужної фосфатази у сироватці крові

1. Субстратно-буферний розчин β -гліцерофосфату.

Розчиняють у воді 2,15г натрій β -гліцерофосфату і 2,15г натрій барбіталу та доводять водою до 500см³ (рН 9,0). Розчин зберігають у холодильнику під шаром толуену.

2. Молібденовий реактив

Розчиняють у 60см³ дистильованої води 2,5г амоній молібдату і фільтрують у мірну колбу на 100см³. В іншій посудині готують розчин сульфатної кислоти шляхом додавання до 25см³ дистильованої води 7,5 см³ концентрованої ($d=1,84$ г/см³) кислоти. З'єднують розчини, доводять до риски водою.

12. Приготування розчинів для визначення активності холінестерази сироватки крові

1. Приготування веронал-медіналового буферного розчину (рН 8,4).

Мединал масою 2,06 г розчиняють у 100см^3 води. Цей розчин об'ємом $82,3\text{см}^3$ змішують з $17,7\text{см}^3$ розчину хлоридної кислоти ($c=0,1\text{моль/дм}^3$).

2. Приготування розчину індикатора ($\omega=0,02\%$).

Феноловий червоний масою 0,02г розчиняють у розчині хлоридної кислоти ($c=0,025\text{моль/дм}^3$) і доводять цією ж кислотою об'єм до 100см^3 .

3. Приготування основного мединалового розчину.

Мединал масою 10,3г розчиняють у 500см^3 дистильованої води, звільненої від CO_2 кип'ятінням.

13. Приготування реактивів для кількісного визначення вітаміну А в печінці

1. Приготування стандартного робочого розчину ретинолу

Використовують фармацевтичний препарат вітаміну А в олії. На упаковці вказується вміст вітаміну в міжнародних одиницях і в грамах.

У мірний циліндр об'ємом 10см^3 вносять такий об'єм препарату вітаміну, який відповідає вмісту вітаміну 200 МО, додають зневоднений хлороформ до 10см^3 . Отримують стандартний робочий розчин, який містить в 1см^3 20 МО вітаміну А.

2. Хлороформ зневоднюють над прожареним калій карбонатом. Після висушування хлороформ переганяють, збираючи фракцію при $61,2^\circ\text{C}$.

3. Діетиловий етер висушують над безводним CaCl_2 .

14. Приготування реактивів для кількісного визначення тіаміну в тканинах флуорометричним методом

Ферментний препарат фосфатази. Міцелій гриба *Penicillium* висушують при 45°C. 100 мг сухого міцелію гриба настоюють з 10 см³ розчину натрій ацетату ($c=2,5$ моль/дм³) протягом однієї години, потім фільтрують.

Препарат фосфатази можна приготувати у вигляді суспензії дріжджів з розрахунку 5 мг дріжджів в 1 см³ фосфатного буферу з рН 5.0.

Стандартний розчин тіамінхлориду.

Тіамінхлорид масою 10 мг розчиняють в 100 см³ розчину хлоридної кислоти ($c=0,01$ моль/дм³). З отриманого розчину беруть 10 см³, переносять у мірну колбу на 100 см³ і доводять дистильованою водою до риски. У 1 см³ останнього розчину міститься 1 мкг тіамінхлориду.

15. Приготування реактивів для кількісного визначення рибофлавіну в крові флуориметричним методом .

Приготування розчину натрій ацетату ($c=2,5$ моль/дм³) із вмістом у ньому ферментного препарату фосфатази.

Міцелій гриба *Penicillium* висушують при 45°C. Висушений міцелій гриба масою 100 мг настоюють на 10 см³ розчину натрій ацетату ($c=2,5$ моль/дм³) протягом однієї години після чого фільтрують.

16. Вимоги до реактивів для кількісного визначення серотоніну в нервовій тканині флуориметричним методом

н- Бутанол-ч.д.а.

н- Гептан- еталонний.

NaCl - ч.д.а.

Бутанол і гептан переганяють з дефлегматором, оскільки при такій обробці знижується інтенсивність флуоресценції реактивів.

Всі розчини готують на бідистильованій воді.

17. Приготування реактивів для кількісного визначення вмісту Йоду в організмах

1. Стандартний розчин калій йодату. Кристалічний KIO_3 масою 0,2108г розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі на 500см^3 , доводять водою до риски і перемішують. З цього вихідного розчину готують робочий розчин. У мірну колбу на 100см^3 вносять 1см^3 отриманого розчину, доводять дистильованою водою до риски, перемішують. У 1см^3 стандартного робочого розчину міститься 2,5мкг йоду у вигляді йодату ($4,216\text{мкг } KIO_3$).

2. Розчин алюмокалієвого галуноу і оцтової кислоти ($\omega=1\%$). $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ масою 10г вносять у колбу на 1дм^3 , розчиняють у дистильованій воді, додають 10см^3 льодяної оцтової кислоти х. ч., доводять дистильованою водою до 1дм^3 і перемішують.

3. Розчин манган сульфату ($\omega=10\%$). $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ масою 10г розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм дистильованою водою до 100см^3 .

4. Розчин калій перманганату ($c(1/3) \approx 0,1\text{моль/дм}^3$). $KMnO_4$ масою 5,27г розчиняють у гарячій дистильованій воді і після охолодження доводять дистильованою водою до 1дм^3 .

5. Розчин щавлевої і сульфатної кислоти ($c \approx 0,2\text{моль/дм}^3$). Щавлеву кислоту $H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$ масою 25,2г розчиняють у 500см^3 дистильованої води, додають до цього розчину 20см^3 сульфатної кислоти ($d=1,8\text{г/см}^3$), доводять об'єм дистильованою водою до 1дм^3 і перемішують.

6. Розчин фосфатної кислоти ($c=4,0\text{моль/дм}^3$). Фосфатну кислоту ($d=1,7\text{г/см}^3$) об'ємом 136см^3 розводять дистильованою водою до об'єму 500см^3 і перемішують.

18. Приготування реактивів для кількісного визначення вмісту Кальцію, Магнію, Феруму, Хлору в тканинах

1. Фосфатно – щавлево – сульфосаліциловий реактив. Щавлеву кислоту масою 30г, амонійдигідрофосфат масою 30г, сульфосаліцилову кислоту масою 30г разом розчиняють у воді і доводять водою об'єм розчину до 1дм³.

2. Водний розчин метилового червоного. Метилрот масою 0,1г розтирають у ступці з 7,5см³ розчину натрій гідроксиду ($c=0,05$ моль/дм³) і отриманий розчин доводять дистильованою водою до 50см³. Для приготування змішаного індикатора додають 0,05г метиленового синього.

3. Стандартний розчин солі Fe (III). Перекристалізований залізоамонійний галун $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ масою 1,7214г розчиняють у невеликій кількості дистильованої води, переносять у мірну колбу на 1дм³, додають 20см³ сульфатної кислоти (1:9), доводять дистильованою водою до риски і перемішують. У 1см³ отриманого розчину міститься 0,2 мг Fe^{3+} .

4. Титрований розчин калій перманганату ($c(1/5)=0,05$ моль/дм³). KMnO_4 масою 3,2г розчиняють у гарячій дистильованій воді, доводять об'єм водою до 2дм³, дають постояти 2–3 дні і зливають прозорий розчин чи фільтрують через скляний фільтр. Молярну концентрацію еквівалента розчину калій перманганату встановлюють за допомогою щавлевої кислоти. Для цього готують розчин щавлевої кислоти з ($c(1/2)=0,05$ моль/дм³). Кристалічну кислоту $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ масою 0,7875г розчиняють у дистильованій воді, переносять у мірну колбу на 250см³, доводять розчин водою до риски і перемішують. Отриманий розчин об'ємом 25см³ переносять у колбу для титрування, додають

5см³ розчину сульфатної кислоти (1:9), нагрівають до 70–75 °С і титрують розчином калій перманганату до появи рожевого забарвлен-

ня, яке не зникає протягом 30 секунд. Молярну концентрацію еквівалента розчину калій перманганату розраховують за формулою:

$$C = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2}, \text{ де}$$

C – молярна концентрація еквівалента титрованого розчину калій перманганату, моль/дм³;

C_1 – молярна концентрація еквівалента розчину щавлевої кислоти, моль/дм³;

V_1 – об'єм розчину щавлевої кислоти, взятий для титрування, см³;

V_2 – об'єм розчину калій перманганату, затрачений на титрування щавлевої кислоти, см³;

Титровані розчини сульфатної кислоти ($c(1/2) = 0,1$ моль/дм³) і натрій гідроксиду ($c = 0,1$ моль/дм³) готують з фіксаналів.

19. Приготування реактивів для кількісного визначення Купруму і Цинку спектрофотометричним або колориметричним методом

1. Стандартний розчин солі Купруму. Кристалогідрат $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ масою 0,3930г розчиняють у дистильованій воді, очищеній від присутніх йонів металів дітізоном, переносять розчин у мірну колбу на 500см³, додають розчин хлоридної кислоти (1:1) об'ємом 1см³, доводять дистильованою, очищеною дітізоном водою до риски і перемішують. У 1см³ такого розчину міститься 0,2 мг Cu^{2+} . З цього розчину готують робочий розчин, розбавляючи його в 100 разів. Для цього в мірну колбу на 500см³ вносять 5см³ вихідного розчину, доводять очищеною дітізоном водою до риски і перемішують. У 1см³ цього розчину міститься 2 мкг Cu^{2+} .

2. Стандартний розчин солі Цинку. Кристалогідрат $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ х.ч. масою 0,4398г розчиняють у 500см³ дистильованої води. У 1см³ цього розчину міститься 0,2мг Zn^{2+} . З отриманого розчину готують

робочий розчин розведенням у 100 разів. Для цього у мірну колбу на 500см^3 вносять 5см^3 вихідного розчину солі Цинку, доводять очищеною дітізоном водою до риски і перемішують. У 1см^3 цього розчину міститься 2 мкг Zn^{2+} .

3. Дистильована вода, очищена від слідів металів. Звичайну дистильовану воду можна очистити від наявних у ній йонів металів дітізоном. Для цього до дистильованої води у ділильній лійці додають розчин дітізону ($\omega=0,001\%$) у чотирохлористому вуглеці з розрахунку

5см^3 на 1дм^3 води, енергійно збовтують протягом 3хв., дають відстоятися і зливають органічну фазу. Воду фільтрують через беззольний фільтр, який попередньо промитий розчином хлоридної кислоти ($c=0,1\text{моль/дм}^3$). Першу частину фільтрату відкидають, а іншу зберігають у колбі з притертим корком.

4. Ацетатний буферний розчин (рН 4,75). Натрій ацетат $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ масою 7,5г розчиняють у дистильованій воді, вносять $2,7\text{см}^3$ льодяної оцтової кислоти, доводять водою до 500см^3 і перемішують. Розчин очищають дітізоном. Для цього розчин переносять у ділильну лійку, додають 5см^3 розчину дітізону ($\omega=0,01\%$) в чотирохлористому вуглеці і енергійно збовтують протягом 3хв., дають відстоятися, органічну фазу зливають, а водну, якщо потрібно, обробляють ще раз розчином дітізону. Потім водну фазу фільтрують через беззольний фільтр, попередньо промитий розчином хлоридної кислоти ($c=0,1\text{моль/дм}^3$) і очищеною водою.

5. Розчин натрій цитрату ($\omega=10\%$). Натрій цитрат тризаміщений $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3\cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$ масою 10г і лимонну кислоту масою 0,5г розчиняють у дистильованій воді і доводять об'єм водою до 100см^3 . Розчин переносять у ділильну лійку і видаляють йони важких металів, струшуючи з невеликими частками розчину дітізону ($\omega=0,01\%$) у чотирохлористому вуглеці до тих пір, доки зелене забарвлення не буде змінюватися. Розчин фільтрують через паперовий фільтр, попередньо

промийтий розчином хлоридної кислоти ($c = 0,1$ моль/ дм^3) і очищеною водою.

6. Розчин натрій діетилдітіокарбамату ($\omega = 0,1\%$). Кристалогідрат натрій діетилдітіокарбамату $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NS}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ масою $0,1\text{г}$ розчиняють у 100см^3 дистильованої води. Зберігають у склянці з темного скла.

7. Розчин індикатора крезолового червоного ($\omega = 0,1\%$). Крезоловий червоний – індикатор з інтервалом рН переходу забарвлення $7,2-8,8$ від жовтого до червоного. Індикатор масою $0,1\text{г}$ розтирають у ступці з розчином натрій гідроксиду ($c = 0,1$ моль/ дм^3) об'ємом 3см^3 , переносять у мірну колбу на 100см^3 , доводять дистильованою водою до риски і перемішують.

8. Хлороформ. Хлороформ марки ч.д.а. можна використовувати без очищення. Для регенерації вже використаного хлороформу його відділяють від водної фази. Промивають у ділильній лійці концентрованою сульфатною кислотою порціями по $5-10\text{см}^3$ до знебарвлення. Потім струшують з кальцій оксидом. Вносять у колбу для відгонки і перегоняють, нагріваючи на водяній бані. Збирають фракцію, що кипить при температурі $61-61,5^\circ\text{C}$.

9. Чотирихлористий вуглець. Чотирихлористий вуглець марки ч.д.а. можна використовувати без очищення. Для регенерації вже використаного чотирихлористого вуглецю його відділяють від водної фази і, якщо рідина мутна, фільтрують через паперовий фільтр. Для руйнування дітізонатів збовтують у ділильній лійці з концентрованою сульфатною кислотою по $5-10\text{см}^3$ до тих пір, доки нова порція кислоти буде безбарвною. Потім CCl_4 промивають у ділильній лійці дистильованою водою для видалення кислоти, струшують з розчином натрій гідроксиду ($\omega = 1\%$), знову промивають водою і перегоняють, нагріваючи перегінну колбу на водяній бані. У перегінну колбу з CCl_4 вносять CaO .

10. Дітізон. Препарат очищають перекристалізацією. Для цього кристалічний дітізон масою 1г розчиняють у 50см³ хлороформу. Фільтрують через паперовий фільтр і додають при помішуванні 150см³ петролейного ефіру. При цьому дітізон випадає в осад у вигляді синьо-чорних кристалів. Фільтрують, кристали висушують на повітрі або у вакуум-ексикаторі. Дітізон нерозчинний у воді, мало розчиняється в етиловому спирті і діетиловому етері. У 100г хлороформу при кімнатній температурі розчиняється близько 2г, а в 100г чотирихлористого вуглецю –близько 0,05г дітізону.

11. Розчин дітізону в чотирихлористому вуглеці ($\omega=0,02\%$). Зважують на аналітичних терезах препарат масою 20мг, переносять у мірну колбу на 100см³, розчиняють у чотирихлористому вуглеці, доводять цим же розчином до риски і перемішують. Розчин зберігають у темному місці при температурі 5°C. З цього розчину в день використання готують 0,01%-ний і 0,001%-ний розчини розведенням у 2 рази і в 10 разів чотирихлористим вуглецем.

12. Розчин амоніаку. Розчини амоніаку, що надходять у продаж, майже завжди містять в значній кількості йони металів, які взаємодіють з дітізоном, особливо Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} . Тому розчин амоніаку необхідно очистити від домішок. Дуже чистий розчин амоніаку отримують методом ізотермічної дифузії. Для цього в порожній ексикатор вміщують два стакани – один з 25%-ним розчином амоніаку з продажу, інший на дві третини об'єму наповнений двічі перегнаною водою і залишають на 2-3 дні. Кришка ексикатора повинна герметично закривати посуд, щоб амоніак не виходив з ексикатора в атмосферу. Амоніак поглинається водою до тих пір, доки не настане рівновага. Отриманий розчин амоніаку в бідистильованій воді зберігають у склянці з притертим корком.

13. Нітратна кислота. Концентровану нітратну кислоту ($d=1,40$) наливають у колбу апарата Сокслета, ставлять на плитку і відганяють

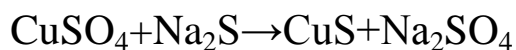
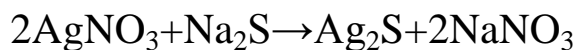
у верхню частину апарата об'єм рідини, що не досягає верхньої частини сифона на 10-15мм. Потім охолоджують, знімають екстрактор і перегнану кислоту виливають у склянку з притертим корком. Масова частка HNO_3 в отриманому розчині становить 68,4%.

14. Хлоридна кислота. У хлоридній кислоті здебільшого містяться значні кількості Zn^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} й інших металів, тому її треба очищати. Гідроген хлорид з водою утворює азеотропну суміш з температурою кипіння 110°C , яка містить 20,2% HCl . Для очищення перегонкою беруть хлоридну кислоту ($d=1,19$), розводять її в 2 рази дистильованою водою і переганяють в апараті Сокслета аналогічно як і при очищенні нітратної кислоти. Зберігають у склянці з притертим корком.

Перегнана в апараті Сокслета хлоридна кислота має концентрацію близько 6 моль/дм³. З цього розчину готують розчини кислоти з $c=1,0$ моль/дм³, $c=0,1$ моль/дм³, $c=0,01$ моль/дм³ шляхом розведення його очищеною дітізоном водою.

20. Виготовлення мініатюрних Ag_2S , $\text{Ag}_2\text{S-CuS}$ -електродів на основі полімерного зв'язуючого бакелітового лаку для кількісного визначення Купруму в тканинах за допомогою йон-селективних електродів

Для виготовлення мініатюрних йон-селективних до Cu^{2+} сенсорів спочатку синтезуються електродно-активна речовина: Ag_2S та CuS .



Утворений осад Ag_2S відфільтровують і промивають ацетоном. CuS і Ag_2S сушать у сушильній шафі при 110°C . Потім їх старанно усереднюють і змішують у співвідношенні: $\text{CuS} : \text{Ag}_2\text{S} = 70\% : 30\%$.

За основу електродів беруть звичайні медичні голки. Спочатку їх оброблюють сумішшю концентрованих HCl і HNO_3 (3:1), промивають

дистильованою водою. Для нейтралізації кислот обробляють розчином NaOH, ($\omega=10\%$), знову промивають дистильованою водою. Після цього знежирюють поверхню майбутнього електрода в ацетоні.

Бакелітовий лак (спиртовий розчин резольної смоли з полівінілбутиралем) змішують з ацетоном і співвідношенні 1:1. До цієї суміші додають подрібнену суміш CuS з Ag₂S. Ретельно перемішують і наносять скляною паличкою на попередньо підготовлену поверхню голки.

Потім проводять полімеризацію. Перші сім діб – на повітрі при кімнатній температурі, а потім – у сушильній шафі. При цьому температуру у шафі піднімають щоденно на 10°C до 150°C. Після полімеризації кінець голки і канюлю ізолюють клеєм із органічного скла.

Для побудови графіка залежності електродної функції мініатюрного електрода Ag₂S – CuS від концентрації йонів Cu²⁺ готують стандартні розчини Cu(NO₃)₂ з концентрацією Cu²⁺ від 1·10⁻¹ до 1·10⁻⁷ моль/дм³. Вимірювальна система складається з голчастого електрода-селектора (Ag₂S – CuS) і хлорсрібного електрода порівняння.

У хімічний стакан вносять розчин, що містить Cu²⁺ певної концентрації, занурюють йон-селективний до Cu²⁺ електрод, хлорсрібний електрод порівняння. Вимірювання потенціалів здійснюють цифровим рН-метром мілівольтметром типу рН-637М (або іншим мілівольтметром). На осі ординат калібрувального графіка відкладають Δφ (в мВ), а на осі абсцис – концентрацію йонів Cu²⁺ ($-\lg C(\text{Cu}^{2+})$, моль/дм³).

Виготовлені таким способом мініатюрні електроди Ag₂S-CuS чутливі до йонів Cu²⁺ в межах концентрації від 1·10⁻¹ до 1·10⁻⁷ моль/дм³. Вони мають високі експлуатаційні характеристики, але після тривалих вимірювань електродно-активна речовина з матриці вимивається і електроди стають непридатними для вимірювань. Для захисту електродно-активної речовини від агресивної дії досліджуваних розчинів електроди після полімеризації можна вкрити тонким ша-

ром клею БФ-6. Сушку цих сенсорів проводять при кімнатній температурі. Після такої обробки сенсори мають набагато кращі експлуатаційні можливості. Після багаторазових вимірювань рівноважний потенціал відтворюється протягом декількох місяців, тоді як сенсори $\text{Ag}_2\text{S-CuS}$, які не мають клеєвого покриття, після 100 вимірювань повністю змінюють числові значення рівноважних потенціалів внаслідок вимивання електродно-активної речовини з полімерного зв'язуючого електродів. Незважаючи на переваги покриття з клею БФ-6, спостерігається зниження чутливості сенсорів до Cu^{2+} . Але цей недолік компенсується за рахунок довготривалої експлуатації електродів та відтворення рівноважних потенціалів протягом 100 і більше вимірювань.

Клей БФ-6 можна використати і як матрицю для $\text{Ag}_2\text{S-CuS}$ -електродів замість бакелітового лаку. Голчасті $\text{Ag}_2\text{S-CuS}$ - електроди з матрицею на основі клею БФ-6 повністю відповідають вимогам до гетерогенних йон-селективних до Cu^{2+} електродів. Лінійна ділянка знаходиться в межах від $1 \cdot 10^{-1}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³, що відповідає характеристикам інших відомих сенсорів. Крутизна складає $30 \pm 3,7$ мВ, що перевищує теоретичне значення (29 мВ). Замість хлорсрібного електрода порівняння можна застосувати Ag_2S -електрод. При застосуванні електродної системи $\text{Ag}_2\text{S-CuS}/\text{Ag}_2\text{S}$ з матрицею на основі клею БФ-6 підвищується чутливість електрода до Cu^{2+} , зменшується вплив рН середовища, йонної сили та сполук, що заважають аналізу. Крім того, система, у якій використовуються два мініатюрні електроди ($\text{Ag}_2\text{S-CuS}$ і Ag_2S) потребує менших об'ємів проб (до 1 см^3), що важливо для досліджень біологічних об'єктів.

21. Приготування розчинів для визначення активності креатинкінази в м'язах

Тріс-(оксиметил)-амінометан-НСІ-буфер (0,005 М), рН 7,2. Готують розчин тріс-(оксиметил)-амінометану, ($c=0,2$ моль/дм³). Для цього 24,33г речовини розчиняють в 1000 см³ дистильованої води. Для приготування буферу з рН 7,2 змішують 25см³ розчину тріс-(оксиметил) амінометану ($c=0,2$ моль/дм³) з 45см³ розчину хлоридної кислоти ($c=0,1$ моль/дм³).

Розчин α -нафтолу ($c=0.07$ моль/дм³). 100мг α -нафтолу розчиняють в 10см³ лужного розчину, що містить рівні об'єми розчину карбонату ($c=1,5$ моль/дм³) і розчину натрій гідроксиду ($c=1,5$ моль/дм³).

22. Приготування реактивів для визначення активності амілази в сироватці крові

Приготування розчину крохмального субстрату. У хімічний стакан об'ємом 200см³ вносять 20см³ розчину натрій хлориду($c=0,5$ моль/дм³) і 50-60см³ дистильованої води. Нагрівають до кипіння. Окремо у хімічному стакані суспендують у холодній воді розчинний крохмаль масою 1г. Суспензію крохмалю виливають у киплячий розчин, стакан, де був крохмаль, декілька разів ополіскують водою, води додають у киплячий розчин. Кип'ятять крохмаль протягом 1 хвилини. Охолоджують. Вміст колби кількісно переносять у мірну колбу на 100см³, доводять об'єм дистильованою водою до 100см³, перемішують. В 1см³ отриманого розчину міститься 10мг крохмалю.

23. Приготування реактивів для визначення активності ліпази крові

1. Приготування стабілізованої емульсії оливкової олії. Змішують 93см³ дистильованої води, 0,2г натрій бензоату і 7г гуміарабіку. Повільно при перемішуванні додають 93см³ оливкової олії і суміш

емульгують протягом 15 хвилин в гомогенізаторі. Емульсія стабільна протягом декількох місяців.

2. Приготування розчину індикатора тимолфталейну. Кристалічний тимолфталейн масою 0,1г розчиняють в етиловому спирті ($\omega=95\%$) і доводять спиртом до 100см^3 .

3. Приготування буферного розчину рН 8,0, ($c=0,2$ моль/дм³). Розчин триоксиметиламінометану (тріс) ($c=0,4$ моль/дм³) об'ємом 50см^3 змішують з $26,8\text{см}^3$ розчину хлоридної кислоти ($c=0,4$ моль/дм³) і доводять дистильованою водою до 100см^3

24. Приготування реактиву „Наді”. Змішують у рівних об'ємах спиртовий розчин α -нафтолу ($\omega=1\%$), розчин n -фенілендіаміну ($\omega=1\%$) і розчин натрій карбонату ($\omega=1,5\%$). Реактив нестійкий і для роботи придатний лише свіжоприготований.

25. Приготування реактивів для визначення активності альдолази сироватки крові

1. Приготування розчину фруктозо–1,6–дифосфату (рН 8,2). Барієву сіль фруктозо–1,6–дифосфату масою 250мг розчиняють у 70см^3 води, додають 410мг гідразинхлориду і доводять дистильованою водою до 100см^3 .

2. Приготування розчину 2,4–дінітрофенілгідразину.

2,4–Дінітрофенілгідразин масою 100 мг розчиняють у хлоридній кислоті ($c = 2,0$ моль/дм³) і доводять розчином цієї кислоти до об'єму 100 см^3 .

26. Приготування розчину для флуоресценції для визначення активності фумаратгідратази у сироватці крові флуорометричним методом

Готують розчин натрій гідроксиду ($c=0,004$ моль/дм³). У цьому розчині розчиняють β -нафтол із вмістом останнього 56мг%.

Далі готують розчин сульфатної кислоти –7:1. Для цього 875см³ сульфатної кислоти (d=1,84) змішують з 125см³ води.

Потім 1 об'єм розчину β-нафтолу змішують з 25 об'ємами приготованого розчину сульфатної кислоти. В'язкий реактив для флуоресценції рекомендується брати піпеткою із шприцом.

Флуоресценція реактиву (в основному за рахунок β-нафтолу) еквівалентна приблизно $2 \cdot 10^{-9}$ моль/см³ малату. Оскільки контроль і розчин, що містить малат, мають різні спектри флуоресценції, вплив флуоресценції контролю зводиться до мінімуму вторинними флуорометричними фільтрами. При необхідності вплив флуоресценції контролю можна зменшити, проводячи флуоресценцію з меншим об'ємом проби або розбавляючи її перед відліком сульфатною кислотою (7:1).

Реакція малату дуже специфічна. Флуоресценція ацетату, малонату, сукцинату, fumarату, цис-аконітату, α-кетоглутарату, гліцину, аланіну, аденіну, урацилу, ксилози складає менше 1% флуоресценції еквімолярної кількості малату. А флуоресценція глюкози, фруктози, лактату, цитрату, пірувату, оксалоацетату, аспарагінату, глутамату складає 1-3% флуоресценції еквімолярної кількості малату.

Активність ферменту виражається в мкмоль малату/100см³ сироватки крові за одну годину.

27. Приготування реактивів для кількісного визначення адреналіну в крові флуорометричним методом

1. Приготування алюміній оксиду для хроматографії. Алюміній оксид х.ч. масою 50г вносять у фарфорову чашку. Заливають розчином хлоридної кислоти ($c=2,0$ моль/дм³) об'ємом 200см³ і кип'ятять протягом 30-40хв. при постійному перемішуванні скляною паличкою. Після припинення нагрівання і відстоювання осаду рідину зливають і повторюють цю процедуру. Потім надосадову рідину зливають і додають до осаду 100см³ бідистильованої води. Суміш переносять на

лійку Бюхнера, відсмоктують рідину, а алюміній оксид на лійці промивають декілька разів, доки рН промивних вод не стане 6,0. Алюміній оксид висушують у сушильній шафі при температурі від 200 до 500°C протягом 4 годин.

2. Приготування амоніачної води. До 5см³ бідистильованої води додають декілька крапель розчину амоніаку (с=0,5моль/дм³) до рН 8,0.

Всі реактиви для флуорометричного визначення адреналіну готують на бідистильованій воді.

28. Приготування діфеніламінового реактиву

Діфеніламін, вдвічі перекристалізований з 70%-ного спирту або петролейного ефіру, масою 1г розчиняють у суміші 2,75 см³ концентрованої сульфатної кислоти (d=1,84) і 100 см³ льодяної оцтової кислоти.

29. Приготування реактивів для виявлення глікопротеїнів у сироватці крові

Приготування розчину фуксинсірчистої кислоти. У 200см³ киплячої дистильованої води розчиняють 1г основного фуксину, струшують протягом 5хв. і після цього охолоджують точно до 50°C. Фільтрують розчин і до фільтрату додають 20см³ розчину хлоридної кислоти (с=1,0 моль/дм³). Охолоджують до 25°C і додають 1г натрій чи калій метабісульфіту. Розчин залишають у темному місці на 24 години, потім додають 2г активованого вугілля і струшують протягом 1хв. Фільтрують. Зберігають у темряві при 0-4°C. Перед використанням доводять до кімнатної температури.

30. Приготування реактивів для визначення активності аденозинтрифосфатази із м'язів

1. Приготування розчину натрій аденозинтрифосфату. У 10см^3 дистильованої води розчиняють $0,1102\text{г}$ АТФ-На з відотною молекулярною масою $551,16$ Да.

2. Приготування гліцинового буферного розчину (рН 7,4). До розчину гліцину ($c=0,1\text{моль/дм}^3$) додають розчин натрій гідроксиду ($c=0,1\text{ моль/дм}^3$) до рН 7,4.

Додаток 2. Характеристика деяких індикаторів

Таблиця 31. Характеристика найуживаніших індикаторів

Назва	Інтервал рН переходу забарвлення	Забарвлення у вказаних межах рН	Приготування розчинів індикаторів
Тимоловий синій(перший перехід)	1,2-2,8	Червоне-жовте	1. 100 мг + 4,3 см ³ розчину NaOH (с=0,05 моль/дм ³) + вода до 100 см ³ 2. 0,1% у 20 %-ному спирті
Резоловий червоний (перший перехід)	1,9-3,1	Жовтогаряче-жовте	1. 100 мг + 5,3 см ³ розчину NaOH (с=0,05 моль/дм ³) + вода до 100 см ³ 2. 0,1% у 20%-ому спирті
Метилловий оранжевий	3,1-4,4	Червоне-жовтогаряче	0,1% у воді
Бромфеноловий синій	3,0-4,6	Жовте-синє	1. 100 мг + 3 см ³ розчину NaOH (с=0,05 моль/дм ³) + вода до 100 см ³ 2. 0,1% у 20%-ному спирті
Метилловий червоний	4,2-6,2	Червоне-жовте	0,1% у воді або 60%-ому спирті
Бромтимоловий синій	6,0-7,6	Жовте-синє	1. 100 мг + 3,2 см ³ розчину NaOH (с=0,05 моль/дм ³) + вода до 100 см ³ 2. 0,05% у 20%-ному спирті
Феноловий червоний	6,4-8,0	Жовте-червоне	1. 100 мг + 5,7 см ³ розчину NaOH (с=0,05 моль/дм ³) + вода до 100 см ³ 2. 0,1% у 20%-ному спирті
Крезоловий червоний (другий перехід)	7,4-9,0	Бурштиново-жовте-пурпурово-червоне	1. 100 мг + 5,3 см ³ розчину NaOH (с=0,05 моль/дм ³) + вода до 100 см ³ 2. 0,1% у 20%-ному спирті
Фенолфталеїн	8,2-10,0	Безбарвне-малиново-червоне	0,1% у 90%-ному спирті
Тимолфталеїн	9,3-10,5	Безбарвне-синє	0,1% у 90%-ному спирті
Алізариновий жовтий	10,1-12,1	Жовте-фіолетове	0,1% у воді

Додаток 3. Буферні системи

Na₂HPO₄-лимонна кислота-буфер; рН 2,2-8,0

1. (Na₂HPO₄·2H₂O, M=178,05 г/моль; розчин з с=0,2 моль/дм³ містить 35,61г в 1000 см³)

2. Лимонна кислота · 2H₂O, M=210,14 г/моль; розчин з с=0,1 моль/дм³ містить 21,01г в 1000 см³.

Таблиця 32. Na₂HPO₄-лимонна кислота-буфер; рН 2,2-8,0

рН	Розчин Na ₂ HPO ₄ с=0,2моль/дм ³ , см ³	Лимонна кисло- та с=0,1моль/дм ³ , см ³	рН	Розчин Na ₂ HPO ₄ с=0,2моль/дм ³ , см ³	Лимонна кисло- та с=0,1моль/дм ³ , см ³
2,2	0,40	19,60	5,2	10,72	9,28
2,4	1,24	18,76	5,4	11,15	8,85
2,6	2,18	17,82	5,6	11,60	8,40
2,8	3,17	16,83	5,8	12,09	7,91
3,0	4,11	15,89	6,0	12,63	7,37
3,2	4,94	15,06	6,2	13,22	6,78
3,4	5,70	14,30	6,4	13,85	6,15
3,6	6,44	13,56	6,6	14,55	5,45
3,8	7,10	12,90	6,8	15,45	4,55
4,0	7,71	12,29	7,0	16,47	3,53
4,2	8,28	11,72	7,2	17,39	2,61
4,4	8,82	11,18	7,4	18,17	1,83
4,6	9,35	10,65	7,6	18,73	1,27
4,8	9,86	10,14	7,8	19,15	0,85
5,0	10,30	9,70	8,0	19,45	0,55

Ацетатний буфер

($c=0,2$ моль/дм³); рН 3,6-5,8

1. $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $M=136,09$ г/моль; розчин з $c=0,2$ моль/дм³ містить 27,22 г в 1000 см³.

2. Оцтова кислота CH_3COOH , $M=60$ г/моль; розчин з $c=0,2$ моль/дм³ містить 11,43 см³ льодяної кислоти в 1000 см³.

Таблиця 33. Ацетатний буфер

Розчин натрій ацетату, $c=0,2$ моль/дм ³ , см ³	Розчин оцтової кислоти, $c=0,2$ моль/дм ³ , см ³	рН при 18°C
0,75	9,25	3,6
1,20	8,80	3,8
1,80	8,20	4,0
2,65	7,35	4,2
3,70	6,30	4,4
4,90	5,10	4,6
5,90	4,10	4,8
7,00	3,00	5,00
7,90	2,10	5,2
8,60	1,40	5,4
9,10	0,90	5,6
9,40	0,60	5,8

Фосфатний буфер ($c=0,1$ моль/дм³); рН 5,8-8,0

Таблиця 34. Тріс-(оксиметил)–амінометан-НСІ–буфер

Розчин Na_2HPO_4 , $c=0,2$ моль/дм ³ , см ³	Розчин NaH_2PO_4 , $c=0,2$ моль/дм ³ , см ³	Вода, см ³	рН
8,0	92,0	До 200	5,8
12,3	87,7	До 200	6,0
18,5	81,5	До 200	6,2
26,5	73,5	До 200	6,4
37,5	62,5	До 200	6,6
49,0	51,0	До 200	6,8
61,0	39,0	До 200	7,0
72,0	28,0	До 200	7,2
81,0	19,0	До 200	7,4
87,0	13,0	До 200	7,6
91,5	8,5	До 200	7,8
94,7	5,3	До 200	8,0

Фосфатний буфер; рН 4,49 – 9,18

1. ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $c=1/15$ моль/дм³; розчин з $c=1/15$ моль/дм³ містить 11,876г в 1000см³)

2. (KH_2PO_4 , $c=1/15$ моль/дм³; розчин з $c=1/15$ моль/дм³ містить 9,078г в 1000 см³)

Таблиця 35. Фосфатний буфер; рН 4,49 – 9,18

Розчин Na_2HPO_4 , см ³	Розчин KH_2PO_4 , см ³	рН	Розчин Na_2HPO_4 , см ³	Розчин KH_2PO_4 , см ³	рН
0,00	10,00	4,49	6,00	4,00	6,98
0,10	9,90	4,94	7,00	3,00	7,17
0,25	9,75	5,29	8,00	2,00	7,38
0,50	9,50	5,59	9,00	1,00	7,73
1,00	9,00	5,91	9,50	0,50	8,04
2,00	8,00	6,24	9,75	0,25	8,34
3,00	7,00	6,47	9,90	0,10	8,67
4,00	6,00	6,64	10,00	0,00	9,18
5,00	5,00	6,81			

Тріс-(оксиметил)-амінометан-НСІ-буфер;

($c=0,05$ моль/дм³); рН 7,2-9,1

1. Тріс-(оксиметил)-амінометан, $M=121,14$ г/моль; розчин з $c=0,2$ моль/дм³ містить 24,33 г в 1000 см³)

2. Хлоридна кислота ($c=0,1$ моль/дм³), $M=36,5$ г/моль

Таблиця 36. Тріс-(оксиметил)-амінометан-НСІ-буфер

Розчин „тріс” $c=0,2$ моль/дм ³ , см ³	Розчин НСІ, $c=0,1$ моль/дм ³ , см ³	Вода, см ³	рН при $t=23^{\circ}\text{C}$
25	5	До 100	9,10
25	7,5	До 100	8,92
25	10,0	До 100	8,74
25	12,5	До 100	8,62
25	15,0	До 100	8,50
25	17,5	До 100	8,40
25	20,0	До 100	8,32
25	22,5	До 100	8,23
25	25,0	До 100	8,14
25	27,5	До 100	8,05
25	30,0	До 100	7,96
25	32,5	До 100	7,87
25	35,0	До 100	7,77
25	37,5	До 100	7,66
25	40,0	До 100	7,54
25	42,5	До 100	7,36
25	45,0	До 100	7,20

Цитратний буфер; рН 3,0-6,6

1. (Лимонна кислота·2H₂O, M=210,14г/моль; розчин з c=0,1моль/дм³ містить 21,01г в 1000см³).

2. Na₃-цитрат·2H₂O, M=294,12г/моль; розчин з c=01моль/дм³ містить 29,4г в 1000см³).

Таблиця 37. Цитратний буфер; рН 3,0-6,6

Розчин Na ₃ -цитрату, c=0,1 моль/дм ³ , см ³	Розчин лимонної к-ти, c=0,1 моль/дм ³ , см ³	рН
1,4	18,6	3,0
2,8	17,2	3,2
4,0	16,0	3,4
5,1	14,9	3,6
6,0	14,0	3,8
6,9	13,1	4,0
7,7	12,3	4,2
8,6	11,4	4,4
9,7	10,3	4,6
10,8	9,2	4,8
11,8	8,2	5,0
12,7	7,3	5,2
13,6	6,4	5,4
14,5	5,5	5,6
15,3	4,7	5,8
16,2	3,8	6,0
17,2	2,8	6,2
18,0	2,0	6,4
18,0	1,4	6,6

Таблиця 38. Веронал –Na₂CO₃ –HCl буфер; рН 7,5 - 10,7

Розчин Na-вероналу с=0,1моль/дм ³ , см ³	РозчинNa ₂ CO ₃ , с=0,1моль/дм ³ , см ³	Розчин HCl, с=0,1моль/дм ³ , см ³	Вода, см ³	рН при t=22°C
25	25	49,4	До 100	7,5
25	25	46,8	До 100	7,6
25	25	45,0	До 100	7,7
25	25	42,1	До 100	7,8
25	25	39,9	До 100	7,9
25	25	37,8	До 100	8,0
25	25	35,8	До 100	8,1
25	25	34,1	До 100	8,2
25	25	32,4	До 100	8,3
25	25	31,0	До 100	8,4
25	25	29,5	До 100	8,5
25	25	28,4	До 100	8,6
25	25	27,3	До 100	8,7
25	25	26,4	До 100	8,8
25	25	25,6	До 100	8,9
25	25	25,0	До 100	9,0
25	25	23,6	До 100	9,1
25	25	22,6	До 100	9,2
25	25	21,4	До 100	9,3
25	25	20,2	До 100	9,4
25	25	19,0	До 100	9,5
25	25	17,8	До 100	9,6
25	25	16,5	До 100	9,7
25	25	15,0	До 100	9,8
25	25	13,3	До 100	9,9
25	25	11,7	До 100	10,0
25	25	10,1	До 100	10,1
25	25	8,8	До 100	10,2
25	25	7,5	До 100	10,3
25	25	6,1	До 100	10,4
25	25	5,0	До 100	10,5
25	25	3,7	До 100	10,6
25	25	2,5	До 100	10,7

Додаток 4. Спектрофотометричний і фотометричний аналізи

Установлено, що оптична густина розчину прямо пропорційна концентрації речовини у розчині. Її можна виразити графічно і за проміжними значеннями знайти концентрацію, яку визначають.

Оптичну густина забарвленого розчину вимірюють за допомогою спектрофотометра (СФ) або фотоелектроколориметра (ФЕК). Фотоелементи реєструють інтенсивність світлового потоку, який проходить через них. Знаючи концентрацію стандартного розчину, за результатами спектрофотометрії (колориметрування) вираховують концентрацію досліджуваного розчину. Досліджуваний і стандартний розчини готують однаково.

Принцип роботи СФ і ФЕК ґрунтується на стійкості інтенсивності двох світлових потоків. Світловий потік, що попадає на фотоелементи, збуджує електричний струм, сила якого залежить від інтенсивності освітлення. Якщо у одній кюветі знаходиться забарвлений розчин, а у другій – чистий розчинник, то у фотоелементах виникає різниця фотоелектричних струмів, яка реєструється гальванометром.

Вибір світлофільтра і довжини хвилі (λ)

Максимум пропускання променя світлофільтром повинен співпадати з максимумом поглинання його розчином. Світлофільтри ФЕК установлюють з різною довжиною хвилі в області максимуму пропускання. Світлофільтри пропускають лише ту частину спектра, яка поглинається забарвленим розчином, але затримує іншу частину. Кожний світлофільтр повинен мати своє забарвлення.

Таблиця 39. Характеристики і підбір світлофільтрів

Забарвлення розчину	Забарвлення світло-фільтра	Область максимального пропускання, λ , нм
Червоний	Синьо - зелене	825
Жовтий	Синє	400-500
Синій	Жовте	550-650
Жовто – зелений	Блакитне	400-500
Пурпуровий	Зелене	500-600
Зелено - синій	Оранжеве	600-750

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аналітична хімія: Навч.-метод. посібник для студентів напряму підготовки «Хімія» / М.В. Шевряков, М.В. Повстяний, Б.В. Яковенко, Т.А. Попович. – Херсон: Айлант, 2011. – 404 с.
2. Биологическая химия: Учебник / Под общ. ред. С.Е. Северина. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 624 с.
3. Биологическая химия: Учебник / А.Я. Николаев. – Москва: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. – 568 с.
4. Биологическая химия: Практикум / Под общ. ред. Ю.В. Хмелевского. -К:Вища шк. – 1985. – 208с.
5. Біологічна хімія з основами фізичної і колоїдної хімії: лабораторно-практичні заняття. Методичні вказівки для ВНЗ аграрного профілю. – Київ: НАУ, 1998. – 147 с.
6. Біологічна хімія: Лабораторний практикум / За заг. ред. проф. Я.І. Гонського –Тернопіль: Україна, 2001. – 288с.
7. Біохімія: Підручник / М.Е.Кучеренко та ін. – К.: Либідь, 1995 – 464 с.
8. Биохимия человека: в 2 томах / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуелл. – Москва: Мир; БИНОМ, Б63 Лаборатория знаний, 2009. – 795 с.
9. Боечко Ф.Ф. Біохімічні поняття, визначення, терміни / Ф.Ф. Боечко, Л.О. Боечко – К.: Вища школа, 1993. – 528 с.
10. Ветеринарна клінічна біохімія : Навч. посіб. / Д.О. Мельничук, С.Д. Мельничук, В.А. Грищенко [та ін.]. – К.: Видавничий центр НУБіП України, 2010. – 464 с.
11. Глазко В.И. Введение в генетику, биоинформатика, ДНК-технология, генная терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболита: Навч. посіб. / В.И. Глазко, Г.В. Глазко; Ин-т агроэкологии и

- биотехнологии УААН. – 2-е изд., испр. и доп. – К.: КВІЦ, 2003. – 640 с.
12. Збарский Б.И. Практикум по биологической химии / Б.И. Збарский, И.Б. Збарский, А.И. Солнцев – М.: Гос. изд-во мед. л-ры. – 1982. – 280 с.
 13. Кольман Я. Наглядная биохимия. 3-е изд.: Пер. с нем. / Я. Кольман, К.-Г. Рем– Москва: Мир, 2009. – 469 с.
 14. Кононський О. І. Біохімія тварин. – К.: Вища шк., 2006. – 454 с.
 15. Кушманова О. Д. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. / О.Д. Кушманова, Г.М. Ивченко – М.: Медицина, 1983. – 294 с.
 16. Кучеренко Н.Е. Биохимия: Практикум / Н.Е. Кучеренко, Ю.Д. Бабенюк, А.Н. Васильев [и др.] / – К: Вища шк., 1988. – 128 с.
 17. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині : довідник / В.В. Влізла, Р.С. Федорук, І.Б. Ратич та ін.; за ред. В.В. Влізла. – Львів : СПОЛОМ, 2012. – 764 с.
 18. Ленинджер А. Биохимия. – М.: Мир, 1985. – т 1-3. – 1056 с.
 19. Малькольм Лав Р. Химическая биология рыб. – М.: Мир, 1980. – т. 1. – 408 с.
 20. Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия: Руководство для врачей / В.Дж. Маршалл, С.К. Бангерт. – Москва-Санкт-Петербург: Изд-во БИНОМ – Диалект, 2011. – 408 с.
 21. Мельничук М.Д. Біотехнологія рослин / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. – К., Поліграфконсалтинг, 2003. – 520 с.
 22. Мецлер Д. Биохимия: В 3-х т. – М.: Мир, 1980. – т. 1. – 408 с. –Т. 2. -608с. – т. 3 – 488с.
 23. Молекулярная биология клетки: Руководство для врачей / Д.М. Фаллер, Д. Шилдс. – Москва: Изд-во БИНОМ, 2011. – 256 с.
 24. Негруцкий С.Ф. Физиология и биохимия низших растений – К.: Вища шк., 1990. – 192 с.

25. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV группы патогенности: Методические указания МУ 1.3.2569-09. – М.: Госсанэпиднадзор, 2009.
26. Основы биохимии / А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман – М.: Мир, 1981. – 1880с.
27. Полімеразна ланцюгова реакція у практиці ветеринарної медицини та біологічних дослідженнях : наук.-метод. посіб. / Б. Т. Стегній, А. П. Герілович, О. Ю. Лиманська ; ред. Б. Т. Стегній , А. П. Герілович ; НААНУ, Нац. наук. центр "Ін-т експерим. клініч. вет. мед. - Х. : НТМТ, 2010. – 227с.
28. Починок Х. Н. Методы биохимического анализа растений. - К.: Наукова думка, 1976. – 334 с.
29. Практикум з органічної хімії / Під ред.. Д.О. Мельничука – Київ: Вид.центр НАУ, 2002. – 136 с.
30. Практикум по биохимии животных / Е.С. Савронь, В.И. Воронянский, Г.И. Киселев, А.В. Чечеткин., Н.Л. Докторович– М.: Высшая шк., 1967. – 240 с.
31. Практикум по биохимии сельскохозяйственных животных./ Чечеткин А.В. [и др.] – М.: Высшая шк., 1980. - 304с.
32. Романенко В.Н. Полимеразная цепная реакция: принципы, достижения, перспективы использования в диагностике инфекций / В.Н. Романенко, И.В. Свистунов, О.А. Лавриненко // Лабораторная диагностика. – 1998. – № 4. – С. 45 – 51.
33. Стайер. Биохимия: В 3-х т.- М.: Мир., 1984 – т. 1. - 227 с. – т. 2 – 308с. –т. 3. – 397с.
34. Фізіологія риб: Практикум. / П.А. Дехтярьов, І.М. Шерман, Ю.В. Пилипенко, О.О. Яржамбек, С.Г. Вовченко – К.: Вища школа, 2001. – 126 с.

35. Филиппович Ю. Б. Основы биохимии. – М.: Высшая шк., 1986. – 623с.
36. Филиппович Ю.Б. Практикум по общей биохимии / Ю.Б. Филиппович, Т.А.Егорова, Г.А. Севастьянова; Под ред. Ю.Б. Филипповича. – М.: Просвещение, 1982. – 318с.
37. Шевряков М.В. Практикум з біохімії. / М.В. Шевряков, Б.В. Яковенко, О.Ф. Явоненко–Суми: Університетська книга, 2003. – 204с.
38. Шмидт –Ниельсен К. Физиология животных (Приспособление и среда). – М.: 1982. – 800с.
39. *Berg J.M. Biochemistry / J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer – New York: W H Freeman; 2002. 1515 p.*
40. Sambrook J. Molecular cloning / J. Sambrook, D. Russel. – N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. – 2222 p.

ЗМІСТ

ПЕРЕДМОВА	3
1. ОСНОВНІ ВИМОГИ І ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ У БІОХІМІЧНИЙ ЛАБОРАТОРІЇ	5
2. ОСОБЛИВОСТІ ВІДБОРУ ПРОБ РІЗНИХ БІОБ'ЄКТІВ ДЛЯ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	7
3. ВУГЛЕВОДИ ОРГАНІЗМІВ.....	10
3.1. Будова та метаболізм моносахаридів	11
3.2. Будова та властивості дисахаридів	21
3.3. Будова та метаболізм полісахаридів.....	21
3.4. Біоресурси полісахаридів у природі.....	25
<i>ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ. Вуглеводи організмів</i>	<i>34</i>
<i>Лабораторна робота 1. Загальні властивості моносахаридів</i>	<i>34</i>
<i>Лабораторна робота 2. Реакція Селіванова на кетогексози</i>	<i>42</i>
<i>Лабораторна робота 3. Ензиматичний метод кількісного визначення глюкози у біологічних рідинах</i>	<i>44</i>
<i>Лабораторна робота 4. Кількісне визначення глюкози у крові спектрофотометричним методом за реакцією з пікриною кислотою (метод Покровського і Крайко)</i>	<i>47</i>
<i>Лабораторна робота 5. Кількісне визначення глюкози у крові за методом Хагедорна-Йенсена</i>	<i>48</i>
<i>Лабораторна робота 6. Загальні властивості дисахаридів</i>	<i>52</i>
<i>Лабораторна робота 7. Якісні реакції на пентози</i>	<i>54</i>
<i>Лабораторна робота 8. Кількісне визначення пентоз за методом Мейбаум.....</i>	<i>56</i>
<i>Лабораторна робота 9. Кількісне визначення цукрів за методом Фелінга</i>	<i>58</i>
<i>Лабораторна робота 10. Дослідження властивостей крохмалю</i>	<i>59</i>

<i>Лабораторна робота 11. Кількісне визначення вмісту крохмалю йодометричним методом</i>	<i>62</i>
<i>Лабораторна робота 12. Дослідження властивостей глікогену</i>	<i>65</i>
<i>Лабораторна робота 13. Визначення вмісту глікогену в тканинах.....</i>	<i>66</i>
ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ВУГЛЕВОДИ ОРГАНІЗМІВ”	70
4. ЛІПІДИ	72
4.1. Загальна характеристика ліпідів і біоресурси їх у природі.....	72
4.2. Біологічна роль та метаболізм холестеролу.....	82
4.3. Основні біологічні функції ліпідів.....	83
<i>ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ. Ліпіди.....</i>	<i>85</i>
<i>Лабораторна робота 1. Дослідження властивостей жирів</i>	<i>85</i>
<i>Лабораторна робота 2. Визначення загального вмісту вільних ліпідів у тканинах за допомогою апарату Сокслета</i>	<i>95</i>
<i>Лабораторна робота 3. Дослідження властивостей фосфатидів і стеринів</i>	<i>99</i>
<i>Лабораторна робота 4. Кількісне визначення фосфатидилхолінів у сироватці крові за фосфором</i>	<i>104</i>
<i>Лабораторна робота 5. Кількісне визначення холестеролу у сироватці крові</i>	<i>107</i>
<i>Лабораторна робота 6. Визначення фракцій ліпідів у м'язах методом тонкошарової хроматографії.....</i>	<i>109</i>
ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ЛІПІДИ”	113
5. БІЛКИ ТА АМІНОКИСЛОТИ	115
5.1. Будова та властивості амінокислот і білків	115
5.2. Фізико-хімічні та колоїдні властивості білків	119
5.3. Заряд білкових молекул та суть електрофоретичного розділення їх суміші	124

5.4. Реакції осадження білків	126
5.5. Класифікація білків. Характеристика окремих класів	129
5.6. Функції білків в організмі.....	135
5.7. Біоресурси нітрогеновмісних речовин у природі.....	136
<i>ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ. Білки та амінокислоти.....</i>	<i>139</i>
<i>Лабораторна робота 1. Фізико-хімічні властивості білків.....</i>	<i>139</i>
<i>Лабораторна робота 2. Якісні реакції на амінокислоти.....</i>	<i>146</i>
<i>Лабораторна робота 3. Якісні реакції на білки.....</i>	<i>153</i>
<i>Лабораторна робота 4. Кількісне визначення білка сироватки крові біуретовим методом</i>	<i>159</i>
<i>Лабораторна робота 5. Кількісне визначення білка за методом Лоурі</i>	<i>160</i>
<i>Лабораторна робота 6. Визначення фракцій білків сироватки крові методом електрофорезу в поліакриламідному гелі.....</i>	<i>162</i>
<i>Лабораторна робота 7. Розділення суміші амінокислот хроматографічним методом</i>	<i>168</i>
<i>Лабораторна робота 8. Визначення небілкового і білкового Нітрогену водоростей</i>	<i>183</i>
<i>Лабораторна робота 9. Виявлення глікопротеїнів у сироватці крові.....</i>	<i>188</i>
ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „БІЛКИ ТА АМІНОКИСЛОТИ“.....	191
6. НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ ТА НУКЛЕОПРОТЕЇНИ.....	194
6.1. Загальна характеристика	194
6.2. Значення нуклеотидів, нуклеозидів, нітрогеновмісних основ у метаболічних процесах	196
6.3. Нуклеопротеїни	197
6.4. Методологічні аспекти проведення полімеразної ланцюгової реакції у лабораторній практиці	198

<i>ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ. НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ ТА НУКЛЕОПРОТЕЇНИ</i>	212
<i>Лабораторна робота 1. Виділення нуклеопротеїнів з печінки та дослідження їх хімічного складу</i>	212
ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „НУКЛЕЇНОВІ КИСЛОТИ ТА НУКЛЕОПРОТЕЇНИ”	216
7. ФЕРМЕНТИ	218
7.1. Загальна характеристика ферментів.....	218
7.2. Класифікація ферментів та характеристика окремих ензимів	222
<i>ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ. Ферменти</i>	244
<i>Лабораторна робота 1. Фізико-хімічні властивості ферментів .</i>	244
<i>Лабораторна робота 2. Визначення активності лужної фосфатази сироватки крові</i>	249
<i>Лабораторна робота 3. Визначення активності холінестерази сироватки крові</i>	251
<i>Лабораторна робота 4. Визначення активності креатинкінази в м'язах</i>	252
<i>Лабораторна робота 5. Визначення активності амілази в сироватці крові</i>	254
<i>Лабораторна робота 6. Визначення активності ліпази у сироватці крові</i>	255
<i>Лабораторна робота 7. Визначення активності фосфорилази печінки</i>	256
<i>Лабораторна робота 8. Визначення активності аланінамінотрансферази і аспартатамінотрансферази в сироватці крові</i>	258
<i>Лабораторна робота 9. Кількісне визначення каталази крові....</i>	262
<i>Лабораторна робота 10. Дослідження цитохромоксидази м'язів.....</i>	264

<i>Лабораторна робота 11. Визначення активності альдолази сироватки крові</i>	<i>266</i>
<i>Лабораторна робота 12. Визначення активності фумаратгідратази у сироватці крові флуорометричним методом.....</i>	<i>267</i>
<i>Лабораторна робота 13. Визначення активності сукцинатдегідрогенази у м'язах</i>	<i>268</i>
ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ФЕРМЕНТИ”	272
8. ВІТАМІНИ	274
8.1. Жиророзчинні вітаміни	274
8.2. Водорозчинні вітаміни	291
ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ. Вітаміни	307
<i>Лабораторна робота 1. Якісні реакції на жиророзчинні вітаміни.....</i>	<i>307</i>
<i>Лабораторна робота 2. Кількісне визначення вітаміну К</i>	<i>310</i>
<i>Лабораторна робота 3. Кількісне визначення вітаміну D в печінці.....</i>	<i>311</i>
<i>Лабораторна робота 4. Кількісне визначення каротинів</i>	<i>314</i>
<i>Лабораторна робота 5. Кількісне визначення вітаміну А в печінці.....</i>	<i>315</i>
<i>Лабораторна робота 6. Якісні реакції на водорозчинні вітаміни.</i>	<i>317</i>
<i>Лабораторна робота 7. Кількісне визначення тіаміну в тканинах флуорометричним методом</i>	<i>319</i>
<i>Лабораторна робота 8. Кількісне визначення вітаміну С</i>	<i>322</i>
<i>Лабораторна робота 9. Кількісне визначення рибофлавіну в крові тварин та ікрі риб флуорометричним методом</i>	<i>325</i>
ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ВІТАМІНИ”	330
9. ГОРМОНИ	332
9.1. Характеристика окремих гормонів	332

<i>ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ</i>	339
<i>Лабораторна робота 1. Якісні реакції на гормони</i>	339
<i>Лабораторна робота 2. Кількісне визначення серотоніну в нервовій тканині тварин флуорометричним методом</i>	341
<i>Лабораторна робота 3. Кількісне визначення адреналіну спектрофотометричним методом</i>	343
<i>Лабораторна робота 4. Кількісне визначення адреналіну в крові в умовах стресу флуорометричним методом</i>	344
ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ГОРМОНИ”	349
10. ВОДА І МІНЕРАЛЬНІ РЕЧОВИНИ В ОРГАНІЗМІ	351
10.1. Вода	350
10.2. Загальна характеристика мінеральних речовин	355
10.3. Роль Йоду в процесах життєдіяльності	367
10.4. Роль Купруму в процесах життєдіяльності	368
10.5. Роль Фосфору в організмах	370
10.6. Характеристика мінеральних речовин	371
10.7. Іонний обмін	373
<i>ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ. Вода і мінеральні речовини</i>	377
<i>Лабораторна робота 1. Визначення рН розчинів різними методами</i>	377
<i>Лабораторна робота 2. Кількісне визначення вмісту йоду в організмах</i>	379
<i>Лабораторна робота 3. Кількісне визначення вмісту Феруму, Магнію і Кальцію в тканинах</i>	383
<i>Лабораторна робота 4. Кількісне визначення хлоридів у крові</i> ...	388
<i>Лабораторна робота 5. Кількісне визначення Купруму і Цинку спектрофотометричним методом</i>	389
<i>Лабораторна робота 6. Кількісне визначення Купруму в тканинах за допомогою йон-селективних електродів</i>	399

<i>Лабораторна робота 7. Кількісне визначення Фосфору в сироватці крові</i>	401
ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „ВОДА І МІНЕРАЛЬНІ РЕЧОВИНИ”	404
11. БІОЛОГІЧНЕ ОКИСНЕННЯ. ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ОБМІН	406
11.1. Участь молочної кислоти у процесах біологічного окиснення.....	406
11.2. Будова та роль АТФ у процесах метаболізму.....	411
11.3. Білки м'язів та енергетика м'язового скорочення.....	413
ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ	415
<i>Лабораторна робота 1. Кількісне визначення молочної кислоти у сироватці крові спектрофотометричним методом</i>	415
<i>Лабораторна робота 2. Виявлення молочної кислоти в м'язах</i> ...	417
<i>Лабораторна робота 3. Кількісне визначення АТФ у біологічному матеріалі</i>	418
<i>Лабораторна робота 4. Визначення активності аденозинтрифосфатази із м'язів</i>	421
ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „БІОЛОГІЧНЕ ОКИСНЕННЯ. ЕНЕРГЕТИЧНИЙ ОБМІН”	424
12. БІОХІМІЯ КРОВІ	427
12.1. Загальна характеристика крові	427
12.2. Загальні відомості про гемоглобін	429
12.3. Техніка взяття крові	436
ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ. Біохімія крові	438
<i>Лабораторна робота 1. Способи взяття крові</i>	438
<i>Лабораторна робота 2. Отримання сироватки та плазми крові.</i>	440
<i>Лабораторна робота 3. Виявлення гемуму в гемоглобіні крові за реакцією з бензидином і гваяколом</i>	442
<i>Лабораторна робота 4. Кількісне визначення гемоглобіну крові</i> ..	443

ЗАВДАННЯ І ВПРАВИ ДО РОЗДІЛУ „БІОХІМІЯ КРОВІ”	445
13. СТАНДАРТИ І СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	446
14. ПЕРЕЛІК НАЙУЖИВАНІШИХ СТАНДАРТІВ У БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРНІЙ ПРАКТИЦІ	448
14.1. Вуглеводи	448
14.2. Жири	453
14.3. Вітаміни	459
14.4. Амінокислоти.....	461
14.5. Протеїни	462
14.6. Ензими	465
14.7. Нуклеїнові кислоти	467
14.8. Вода і мінеральні речовини	469
14.9. Загальні документи	480
ДОДАТКИ	488
Додаток 1. Приготування реактивів до лабораторних робіт	488
Додаток 2. Характеристика деяких індикаторів	508
Додаток 3. Буферні системи	509
Додаток 4. Спектрофотометричний і фотометричний аналізи	515
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	517